

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی، گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه تخصصی تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

<sup>۳</sup> 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

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

### چکیده

**زمینه:** سرطان ملانوما شدیدترین زیر مجموعه سرطان پوست است که قدرت تهاجم بالا و متاستاز سریع به سایر اندامها را دارد. اخیراً نقش تمرینات ورزشی در پیشگیری و درمان سرطان بسیار مورد توجه قرار دارد. آناناس نیز متعلق به خانواده برومولیاسه و زیر خانواده برومولوئید 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 آنتیپی ملانوما و تمایز دایی 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 موش‌های نژاد C57 در چهار گروه شامل کنترل، تمرین مقاومتی، عصاره آناناس و تمرین مقاومتی- آناناس انجام شد. پس از القای توموریه موش ها، برنامه تمرین مقاومتی و عصاره دهی آناناس به میزان ۳۰۰ mg/kg بصورت گاواژ به مدت شش هفته اجرا شد. وزن و حجم تومور موش‌ها اندازه گیری 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  $p \leq 0.05$  نظر گرفته 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-2, MMP-9

## مقدمه

آنژیوتیک 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 و MMP9 را مهار کنند (۸). سرطان بیماری بسیار پیچیده‌ای 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) مهاجم سلولهای توموری کاملاً اثبات شده است مشخص شده که این آنزیم‌ها با تسهیل شکستن اتصالات بین سلولی بافت همبند و هضم ترکیبات ماتریکس خارج سلولی به این فرایند کمک می‌کنند.

(۱۰-۱۲). 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 مهاجم 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 می‌باشند. همچنین این آنزیم‌ها برای فعالیت به یون روی ( $2+Zn$ ) به عنوان کوفاکتور وابسته هستند و به چند گروه اصلی تقسیم بندی می‌شوند (۱۴-۱۶). از بین MMP ها، ماتریکس متالوپروتئیناز-۹ (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 سرطانی شدن سلولها و تغییر رفتار آنها نقش مهمی داشته باشد (۱۷، ۱۸) افزایش غلظت پلاسمايي MMP9 در انواعی از تومورهای بدخیم مانند سرطان معده، سرطان پستان، سرطان کولون، 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

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 ملانوسیت‌ها 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، سابقه‌ی ملانومای قبلی، سرکوب ایمنی و خال‌های غیرطبیعی است (۲). ماتریکس متالوپروتئینازها (MMPs) خانواده‌هایی از آندوپیتیدازهای وابسته به عناصر روی و کلسیم می‌باشند که توانایی پروتئولیز بسیاری از ترکیبات ماتریکس خارج سلولی را دارند (کلاژنها، پروتئوگلیکانها و گلیکو پروتئین‌ها) و با این کار سبب تشدید روند پاسخ‌های التهابی می‌شوند (۴.۳) در شرایط پاتولوژیک نظیر بیماری سرطان، آرتریت روماتوئید، بیماری‌های قلبی-عروقی و سایر بیماری‌های التهابی تجزیه بیش از حد ماتریکس خارج سلولی موجب تخریب بافت می‌گردد 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 می‌شوند، لذا مهارکننده‌های طبیعی MMPs در کنترل فعالیت التهاب نقش به‌سزایی دارند (۵.۶).

فرآیند آنژیوژنز نه تنها در القای رشد تومور بلکه در فرآیند پیچیده گسترش و متاستاز تومورها که شامل دور شدن 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، سلول‌های تومور بیشتری از دیواره نفوذپذیر عروق عبور می‌کنند و وارد گردش خون می‌شوند. بنابراین درمان‌های آنتی

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

پوست در معرض عوامل متعددی از جمله دود، میکروارگانیزم ها و یا اشعه ماوراءبنفش که می توانند باعث ایجاد پاسخ های بیولوژیکی شده و از طریق تولید گونه های اکسیژن فعال (Reactive Oxy- gen Species) منجر به آسیب پوست شوند در مقابل این عوامل، آنتی اکسیدان ها ترکیب هایی هستند که به مهار بسیاری از واکنش های اکسیداسیون که توسط رادیکال های آزاد ایجاد می شوند، کمک نموده و بدین وسیله آسیب وارده به سلول ها و بافت ها را مهار کرده یا به تأخیر می اندازند. از جمله مکانیسم های عملکردی آن ها واکنش جمع آوری گونه های رادیکال آزاد اکسیژن و نیتروژن می باشد (۲۰). شواهد گسترده ای برای استفاده از آنتی اکسیدان ها در سرطان وجود دارد. ارزش پتانسیلی آنتی اکسیدان ها، محققان را بر آن داشته تا به جستجوی ترکیب های طبیعی با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا و سمیت کم پردازند (۲۱). مطالعات اخیر نشان داده که تعدادی از محصولات گیاهی شامل: پلی فنل ها، فلاونوئیدها، کومارین ها، کورکومین ها، ترپن ها و انواع عصاره های گیاهی، فعالیت آنتی اکسیدانی از خود نشان می دهند. همچنین نشان داده شده که یک سری از ترکیبات طبیعی از جمله گیاهان باعث القاء مسیره های آپوپتوز می شوند که در سلول های سرطان مهار شده اند. توانایی القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی و توقف تکثیر این سلول ها موضوع بسیاری از تحقیقات ایمونوفارماکولوژی می باشد. از جمله علل اصلی بروز سرطان ها می توان به تأثیر عوامل محیطی در ایجاد جهش و تغییرات ژنتیکی مسئول بروز بدخیمی ها اشاره کرد. فرآورده های طبیعی به ویژه گیاهان دارای پتانسیل بالایی برای ساخت ترکیبات دارویی می باشند (۲۲، ۲۳). آناناس با نام علمی *comosus Ananas* و نام انگلیسی *pineapple* متعلق به خانواده برومولیاسه وزیر خانواده برومولوئیده می باشد. این میوه یکی از پرطرفدارترین میوه های استوایی است (۲۴). از نظر ترکیبات شیمیایی در هر صد گرم قسمت قابل مصرف میوه رسیده و خام به صورت متوسط: ۸۵ گرم آب، ۴/۰ گرم پروتئین، ۲/۰ گرم چربی، ۱۳ گرم مواد قندی، ۱۷ میلی گرم کلسیم، ۸ میلی گرم فسفر، ۰/۵ میلی گرم آهن، ۱ میلی گرم سدیم، ۱۴۶ میلی گرم پتاسیم، ۰/۹ میلی گرم تیامین، ۰/۰۳ میلی گرم ریوفلاوین، ۰/۰۲ میلی گرم نیاسین، آنزیم برومیلین، وانیلین، اسیدهای آزاد آلی، ۱۷ میلی گرم ویتامین C و ۷۰ واحد بین المللی ویتامین A، B و B2 وجود دارد. آنزیم برومیلین به دست آمده از عصاره آناناس به صورت گسترده در طب سنتی استفاده می شود 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 ضد سرطانی آناناس را بر سرطان پستان بررسی نموده و به نتایج ارزشمندی در راستای نابودی این سلولها دست یافتند (۲۶). با توجه به قابلیت های برومیلین و تعداد اندک مطالعات انجام شده پیرامون سلول های سرطانی، هنوز مطالعات بیشتری لازم است تا بتوان قابلیت های این ترکیب را بررسی کرد. از اصلی ترین مشکلاتی که در درمان سرطان وجود دارد این است که داروهای درمانی در بافت های توموری باقی نمی ماندند و داروهای بافت های سالم بدن را نیز تحت تاثیر قرار می دهند (۲۷)، درمان های مختلفی که امروزه برای سرطان وجود دارد مثل پرتودرمانی و یا سایر داروهای رایج، همگی برای سلول های سالم بدن نیز سمی هستند و علاوه بر هزینه های بالا عوارض جانبی بالایی دارند (۲۸). بنابراین احساس می شود که نیاز مبرمی به روش های جدید برای درمان سرطان به عنوان روش های درمانی هدفمند سرطان وجود دارد که بتواند جایگزین خوبی برای روش های شیمی درمانی فعلی باشد (۲۹). لذا در این مطالعه در نظر است تمرین مقاومتی و مصرف عصاره آناناس بر بیان ژن متالوپروتئین های بافت کبد و حجم تومور موش های مبتلا به سرطان ملانوما گزارش گردد تا شاید بتوان از اثربخشی و نقش آنتی اکسیدانی و ضد التهابی آناناس در کنار طراحی برنامه ورزشی برای سرطانی ها 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 موش های نر C57BL/6 تشکیل می دادند که از بین آنها، ۳۲ سر موش نر شش تا هشت هفته های با دامنه وزنی ۱۲ تا ۱۴ گرم که با ترازوی دیجیتال اندازه گیری 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. موش ها 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 حلقه های نازک برش زده شد و در مکان سایه روشن به دور از آلودگی خشک شد. سپس از میوه خشک شده، پودر یکنواخت تهیه می گردد، جهت عصاره گیری میوه آناناس از روش خیساندن در دمای ۴ درجه سانتیگراد استفاده می شود. به ازای هر ۷ گرم پودر آناناس، ۵۰ میلیلیتر اتانول ۸۵٪

محل بخیه جراحی با بتادین ضد عفونی 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 همگنس‌سازی 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 (۳۰، ۳۱).

### اندازه‌گیری 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 دیجیتالی 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 همگنس‌سازی وزن به چهار گروه، کنترل، تمرین مقاومتی، آناناس و گروه تمرین مقاومتی+ آناناس تقسیم می‌شوند.

### زمانبندی تمرینی

موش‌ها در هفته دوم آزمایشگاه برای اجرای پروتکل‌های پژوهشی تمرین و گاوآژ 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 جلسه تمرین و به منظور انجام تکرار اول، ۲۵ درصد وزن بدن موش‌ها به دشمن وزنه متصل می‌شود و به ترتیب ۵۰ درصد سپس ۷۵ و ۱۰۰ درصد برای هر تکرار افزایش می‌یابد. اگر موش

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 بر کیلوگرم در وزن بدن) به وسیله گاوآژ به موش‌های مورد نظر خوراندن خواهد شد (۲۹).

### کشت رده سلولی

رده سلول سرطانی ملانوما B16F10 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 ۲-۳ 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 موش‌ها 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 به 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.

صورت گرفت به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر Master Mix (AMPLIQON RealQ Plus 2x 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 (QIAGEN) real-time PCR cycler Q طبق برنامه مورد نظر که شامل یک مرحله Enzyme Activation به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و ۴۰ سیکل شامل Denatur-ation به مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، 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)

### روشهای آماری تجزیه و تحلیل دادهها

دادهها با استفاده از نرم افزار 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 یک-راهه 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 متغیرهای مستقل استفاده گردید. آنالیز آماری بیان ژن MMP2 و MMP9 با استفاده از نرم افزار نسخه ۲۲ انجام شد. سطح معنی داری  $p \leq 0.05$  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  $\pm$  انحراف معیار در جدول ۴ گزارش شده است. نمودار ۱ و ۲ و ۳ تغییرات حجم تومور و بیان ژن MMP2 و MMP9

قادر به حمل بار بود، با هر تکرار موفق، ۳ گرم به کیسه حاوی وزنه اضافه شده تا حیوان به واماندگی برسد. وزنه حمل شده قبل از واماندگی، به عنوان وزنه حداکثر، برای طراحی پروتکل جلسه بعد استفاده می شود. بنابراین برای جلسه های بعدی تمرین به ترتیب ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ درصد وزنه حداکثر جلسه قبل و به ازای هر تکرار موفق ۳ گرم اضافه در نظر گرفته می شود. با این تفاوت که بعد از واماندگی هر موش با ۷۰ درصد حداکثر وزنه به تمرین ادامه می دهد، به طوریکه هر جلسه 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 می شود. پس از اتمام استراحت، وزنه مورد نظر به کیسه متصل به دم موش اضافه می شود و موش به پایین نردبان انتقال می یابد. در صورت نیاز نیز دم موشها به منظور ایجاد انگیزگی لمس می شود (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 ریل تایم درون RNA later قرار داده شد و سپس در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی گراد 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 نرم افزار Primer3 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

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

جدول ۲. الگوی پرایمرهای مورد استفاده در پژوهش

Gen	Primer	Product size
MMP2-F	CGATGTCGCCCTAAACAG	176
MMP2-R	GCATGGTCTCGATGGTGTTTC	
MMP9-F	CGTCATTCGCGTGGATAAGG	119
MMP9-R	TTTGAAACTCACACGCCAG	

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 رت های حامل تومور می شود. علاوه بر این، تمرینات ورزشی با افزایش معنادار بقا در مقایسه با گروه کنترل تومور همراه بود. این نتایج نشان می دهد که انواع مختلف تمرینات ورزشی می تواند نقش موثری در سرکوب رشد تومور داشته باشد (۳۴). همه این یافته ها 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 به دنبال تمرینات هوازی در موش های سرطانی به افت عوامل التهابی نسبت دادند گفته می شود که این کاهش التهاب، احتمالاً در اثر کاهش رهایش سایتوکاین ها از قبیل IL-6 در پاسخ به انقباض عضلانی منظم است (۳۵). یافته های پژوهش حاضر موافق با یافته های مورفی بود و در هر دو پژوهش کاهش حجم تومور بعد از یک دوره تمرین استقامتی مشاهده شد و احتمالاً اگر طول مدت تمرین در پژوهش حاضر با مداخلات تغذیه ای همراه ادامه می یافت کاهش حجم تومور در گروه تمرین نیز شاید معنی دار

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

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

روشهای آماری تجزیه و تحلیل دادهها

بافت کبد موش های گروه های 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

یافته های پژوهش حاضر نشان داد که تمرین مقاومتی و عصاره آناناس منجر به کاهش وزن و کاهش معنی دار حجم تومور و بیان ژن MMP2 و MMP9 در گروه های تجربی شد. نتایج وزن موش ها نشان داد که وزن موش ها در گروه های تجربی نسبت به کنترل کاهش داشت که در گروه تمرین - آناناس میزان کاهش وزن بیشتر بود. همچنین نتایج نشان داد حجم تومور در گروه های تجربی کاهش معنی دار داشته، ولی تمرین - عصاره آناناس

جدول ۴. جدول توصیفی سطوح متغیرهای مورد بررسی در گروه های پژوهش (انحراف معیار ± میانگین)

گروه	وزن موش ها (گرم)	حجم تومور (میلی متر 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)

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

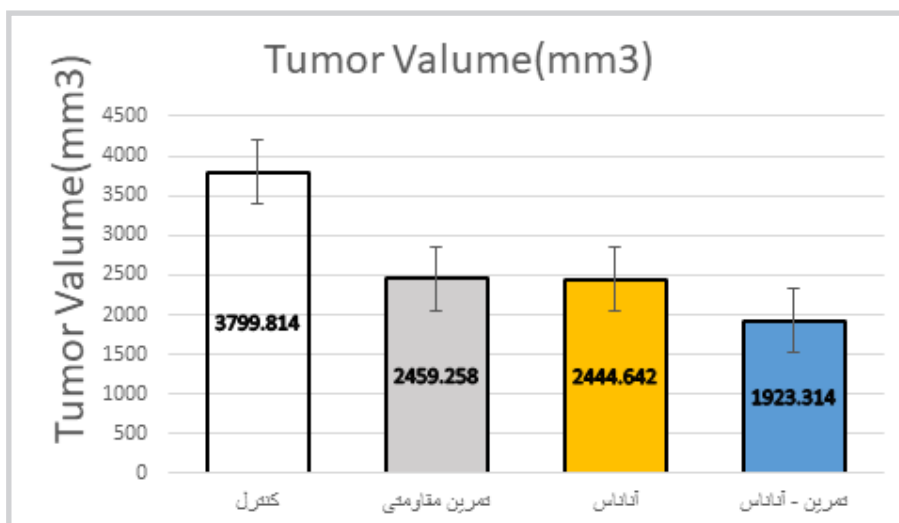
جدول ۶. نتایج تحلیل واریانس دو عاملی و نیز اندازه اثر گروه‌ها را نشان می‌دهد

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

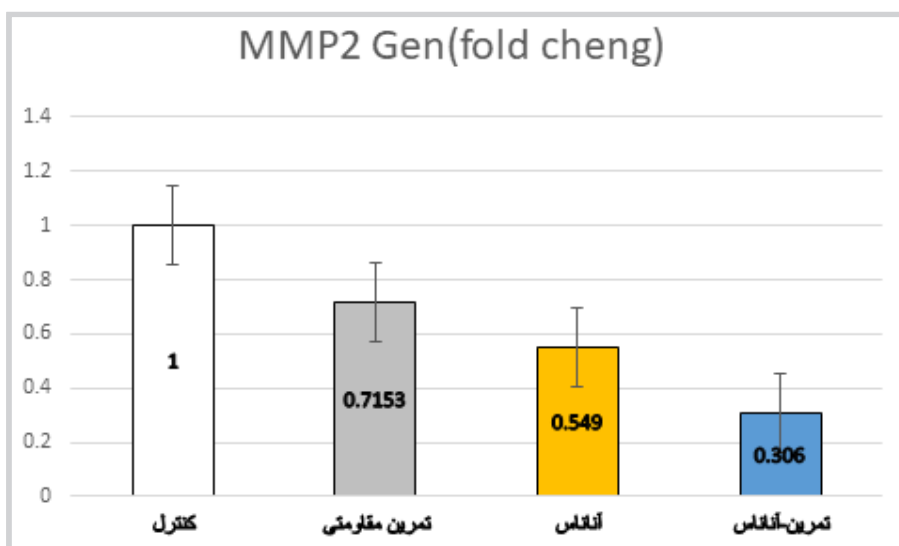
\*P<۰,۰۵, \*\*P<۰,۰۱

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 می‌دهند. 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).  
 بیان ژن MMP2 در گروه‌های عصاره آناناس و تعاملی آناناس-تمرین مقاومتی روند کاهشی داشت. یافته‌ها نشان می‌دهد 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 می‌شود (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

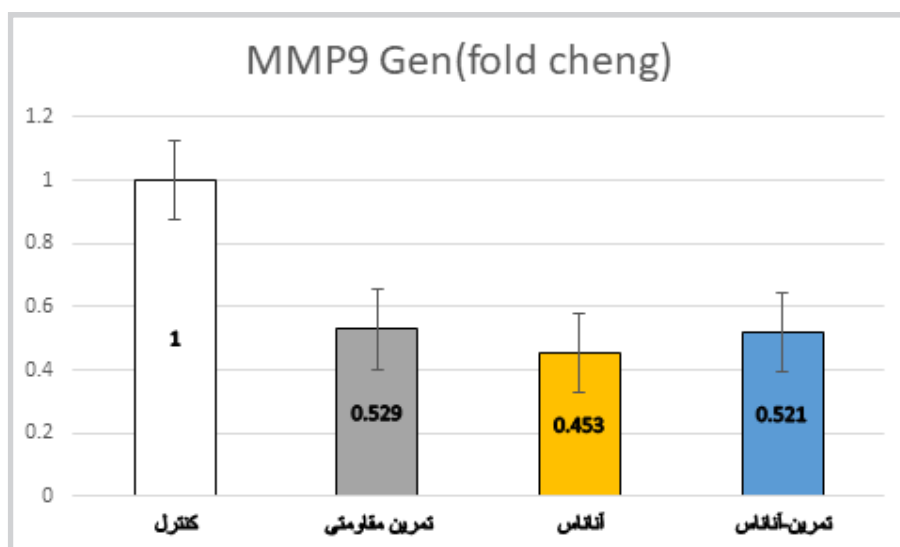
می‌شد اما در گروه آناناس کاهش معنی‌دار بوده و تأثیر بیشتری بر حجم تومور داشته که تأثیر خود را در گروه تعاملی تمرین - آناناس نشان داده و حجم تومور را نسبت به تمرین بیشتر کاهش داده است. البته تومور مورد بررسی در پژوهش حاضر متفاوت از پژوهش‌های فوق بود و مدت زمان دوره تمرین در پژوهش حاضر (شش هفته) به خاطر 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 هر حال 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 صورتی که این تعادل از بین برود زمینه برای بروز برخی بیماری‌ها از جمله رشد و متاستاز تومور فراهم می‌شود (۳۷). متاستاز نقش ویژه در گسترش 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



نمودار ۱. تغییرات حجم تومور گروه‌ها



نمودار ۲. تغییرات بیان ژن MMP2 گروه‌ها



نمودار ۳. تغییرات بیان ژن MMP9 گروه‌ها



شدن MMP-9 شده و باعث افزایش قابل توجه غلظت سرمی MMP-9 می‌شود (۴۲). کادوگلو و همکاران نشان دادند که ورزش سطح رسمی MMP-9 را کاهش می‌دهد، اما سطح MMP-2 را در بیماران مبتلا به دیابت نوع دو کاهش نمی‌دهد (۴۳). جینگا و همکاران عملکرد گردش MMP-2 و MMP-9 را در بیماران سرطان سینه مطالعه و نشان دادند افزایش بیان و فعالیت MMP-9 در تومورهای بدخیم و افزایش فعالیت MMP-2 در تومورهای بدخیم که بیان گیرنده استروژن بالا را نشان می‌دهند. این مطالعات نشان می‌دهد که سطح رسمی MMP-2 یا MMP-9 ممکن است نشانگرهای مفیدی برای مرحله‌بندی و پیش‌آگهی باشد (۴۴). کسکین و همکاران نشان دادند تمرینات استقامتی باعث کاهش غلظت MMP-9 و کاهش سطح پلاسمایی MMP-2 در افراد دارای شرایط پاتولوژیک می‌شود (۴۵). اورسو و همکاران نیز بیان کردند که تغییرات در سطوح رسمی MMP-2 و MMP-9 به رژیم‌های مختلف تمرینی وابسته است (۴۶). تأثیر ورزش بر تولید شاخص‌های التهابی ممکن است تغییرات در سطوح رسمی MMPs را منعکس کند. این فرضیه وجود دارد که ورزش باعث کاهش رادیکال‌های آزاد و افزایش دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌شود که ممکن است بر شرایط التهابی تأثیر گذاشته و متعاقباً غلظت‌های رسمی MMPs را تغییر دهد. تغییرات رسمی MMP-2 و MMP-9 ممکن است با پاسخ‌های متفاوت وابسته به دوز به تمرین مرتبط باشد (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 مهارکننده‌های بافتی MMPs تنظیم می‌شود توسط چندین گروه تحقیقاتی نشان داده شده است که MMPهای 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. فعال‌سازی MMP با حذف N ترمینال دامنه پروپیتید از طریق اگزوزن یا لایه اتوکاتالیتیکی انجام می‌شود. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که پروتئازهای سرین مانند پلاسمین بیشتر MMPها را از طریق این مکانیسم فعال می‌کنند MMP-2 که به وفور در مراحل اولیه تبدیل بدخیم بیان می‌شود برای فعال‌سازی به روشی مرتبط با غشاء در اندوتلیال سلول‌ها و سلول‌های تومور ملانوما شناخته شده است. علاوه بر این، متالوپروتئیناز ماتریکس

غشایی مرتبط با سطح سلول (MMP-MT1) 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 آنزیم‌ها می‌باشد با فنوتیپ‌های تهاجمی و متاستاتیک ملانوم مرتبط است. گزارش‌های قبلی نشان داد که MMP-2 و MMP-9 به طور اساسی در ملانوم‌های بدخیم بیان می‌شوند و بیان آنها به شدت با آنتی‌ملانوما 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 یافته‌ای را در برابر بسترهای آن نشان می‌دهد. سلول‌های ملانوما بدخیم با بیان تعدادی از MMPها از جمله MMP-14، MMP-13، MMP-9، MMP-2، MMP-1 و 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 و تکثیر ملانوسیت‌ها که به طور طبیعی در لایه سلولی پایه اپیدرمیس قرار دارند، ایجاد می‌شود. از سوی دیگر بررسی ترکیبات موجود در عصاره‌های گیاهی و تأیید اثرات ضدسرطانی‌ها آن محققان بر 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 برومیلین جزء اصلی فعال در میوه آناناس بوده و از دسته آنزیم‌های پروتئولیتیک محسوب می‌شود. پژوهش این محقق نشان دهنده بازدارنده واضح برومیلین 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 برومیلین به دست آمده از میوه آناناس بودند، پاسخ مهارتی تأخیر رشد القای اتوفازی را نشان دادند که این مساله به علت نقش برومیلین 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 تأیید شد لذا از تمام همکاران پژوهشی و پرسنل آزمایشگاهی تقدیر و تشکر می‌شود.

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. Mroczo B, Lukaszewicz-Zajac 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. Etehad 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, Dagleish 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://hrcaak.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 Lotfabad N, Haghiralessadat 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. Khorri 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, Aghaalienejad H, Alizadeh S, Kazmi A, Saei MA, 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, Pastuszczyk 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 dalooi 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 Appl Physiol*. 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, Höyhty M, Turpeenniemi-Hujanen T, Martikala 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 Appl Physiol*. 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: Spontaneous Resolution or a Result of Treatment with Antioxidants, Green Tea, and Pineapple Cores? A Case 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.