

شیفت اکسیداتیو ایزوآنزیم‌های LDH متعاقب تمرین استقامتی در تومور موش‌های مبتلا به سرطان سینه

ملیحه آوسه^۱، روح‌الله نیکویی^۲، محمد رسول سمندری^۳

۱- دانشجوی دکتری فیزیولوژی ورزشی دانشگاه شیراز

۲- استادیار دانشگاه شهید باهنر کرمان

۳- موسسه فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

* نشانی نویسنده مسئول: کرمان، بلوار ۲۲ بهمن، پردیسه افصلی پور، دانشکده تربیت بدنی

Email: r_nikooie@uk.ac.ir

پذیرش: ۹۳/۱۲/۰۹

اصلاح: ۹۳/۰۵/۲۰

وصول: ۹۳/۰۳/۰۳

چکیده

مقدمه و هدف: شناخت روش‌های درمانی که بتواند از پیشرفت سرطان سینه جلوگیری کند حائز اهمیت است. هدف از مطالعه حاضر تعیین تاثیر تمرین استقامتی بر بیان ایزوفرم‌های لاکتات دهیدروژناز (LDH) در تومور موش‌های balb/c مبتلا به سرطان سینه بود.

روش‌شناسی: مطالعه حاضر از نوع تجربی بود. ۲۵ راس موش ماده نژاد balb/c به طور تصادفی به دو گروه کنترل سرطانی (n = ۱۲) و تمرینی سرطانی (n = ۱۳) تقسیم شدند. سرطان از طریق تزریق سلول سرطانی MC4L2 در پد چربی پستان موش ایجاد و پروتکل تمرین استقامتی به مدت هفت هفته بر گروه تجربی اعمال گردید. غلظت لاکتات تومور با روش RDI (Radioimmunoassay)، بیان ایزوفرم‌های LDH-A و LDH-B در تومور بوسیله تکنیک وسترن بلات و ایزوآنزیم‌های LDH (LDH1-LDH5) تومور در ژل آگاروز جدا و اندازه‌گیری شدند. معنی‌دار بودن تفاوت بین گروه‌ها با آزمون آماری t-student تعیین گردید.

یافته‌ها: بعد از هفت هفته تمرین استقامتی به طور معناداری غلظت لاکتات تومور در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل کاهش یافت (P < ۰/۰۵). این تغییر با کاهش معنی‌دار در بیان LDH-A (P < ۰/۰۵) و افزایش همزمان در بیان LDH-B (P < ۰/۰۵) تومور در گروه تمرینی همراه بود. در پایان دوره تمرین، در تومور گروه تمرینی ایزوآنزیم‌های LDH1 و LDH2 و در گروه کنترل ایزوآنزیم‌های LDH4 و LDH5 بیان بیشتری داشتند.

بحث و نتیجه‌گیری: تمرین استقامتی می‌تواند با تغییر در ایزوفرم‌های لاکتات دهیدروژناز و تعدیل متابولیسم لاکتات تومور ابزاری مفید برای درمان یا پیشگیری از سرطان سینه باشد.

واژه‌های کلیدی: تمرین استقامتی، سرطان سینه، لاکتات، لاکتات دهیدروژناز.

تنظیم مثبت HER2، Normal breast-like و Basal-like تقسیم می‌شود. با وجود متفاوت بودن پروفایل ژنی در انواع مختلف سرطان سینه، رشد سلول‌های غیر طبیعی (نئوپلاسم) مهمترین ویژگی بیولوژیکی در تمامی انواع این بیماری است (۱). این ویژگی بواسطه تغییر در متابولیسم سلولی سرطانی که راهکاری اساسی در زنده ماندن و ادامه حیات این سلول‌ها می‌باشد، حمایت می‌شود (۲). گلیکولیز هوازی و یا اثر

مقدمه

سرطان سینه، به عنوان سرطانی رایج در زنان، یک بیماری پیچیده است که در نتیجه‌ی تغییرات متعدد در فیزیولوژی سلول ایجاد و در نهایت منجر به ایجاد تومور می‌شود. بر اساس پروفایل ژنی این بیماری به دسته‌های لامینال A (تنظیم مثبت گیرنده استروژن)، لامینال B (تنظیم مثبت گیرنده استروژن)،

LDH برای حفظ تومور مورد نیاز است، این آنزیم و ایزوآنزیم‌های آن به هدفی جهت درمان سرطان تبدیل شده است.

در حال حاضر تمرین به عنوان ابزاری مفید در درمان و پیشگیری از اکثر بیماری‌ها معرفی گردیده است. همچنین اثرات مفید تمرین استقامتی بر سرطان سینه نیز به وفور گزارش شده است که طیف آن از تعدیل هیپوکسی (۱۴)، کاهش رگزایی و تعدیل آنژیوژنز تومور (۱۵) تا بهبود متابولیسم تومور و ارتباط آن با ریسک فاکتورهای مرتبط (۱۶) گسترده است. انجام تمرین استقامتی با افزایش در توان اکسیداتیو بدن همراه است. بخشی از این سازگاری تمرینی با افزایش در محتوا و عملکرد میتوکندریایی در بافت‌هایی نظیر عضله اسکلتی و قلبی انجام می‌پذیرد و بخشی دیگر بواسطه اثر تمرین بر آنزیم LDH و ایزوآنزیم‌های آن واسطه‌گری می‌شود (۱۲-۱۳). به عنوان مثال، Hervé Dubouchaud و همکاران (۲۰۰۰) اثر تمرین استقامتی بر توزیع نسبی ایزوآنزیم‌های LDH در عضله پهن جانبی انسان را بررسی و کاهش در درصد ایزوفرم LDH-5 در عضله را گزارش نمودند (۱۲). جونز و همکاران اثر تمرین هوازی بر فیزیولوژی تومور از جمله هیپوکسی، آنژیوژنز و متابولیسم را بررسی کردند و افزایش هیپوکسی و آنژیوژنز تومور بیشتری را در گروه تمرینی مشاهده کردند که نشان از تعدیل رگزایی به سطوح نرمال در تومور بود (۱۵). همچنین آلمیدا و همکاران نشان دادند که شش هفته تمرین شنا باعث کاهش چشمگیر ماکروفاژها و به نسبت کمتر نوتروفیل‌ها در بافت توموری موش‌های تمرینی می‌شود که نتیجه غایی آن کاهش رشد تومور است (۱۶). علی‌رغم وجود این تحقیقات مبنی بر تاثیر مفید تمرین استقامتی بر فیزیولوژی تومور، تاکنون تحقیقی مبنی بر تاثیر تمرین استقامتی بر ایزوفرم‌های LDH و ارتباط آن با سرطان سینه گزارش نشده است. در نتیجه هدف از تحقیق حاضر تاثیر تمرین استقامتی بر ایزوفرم‌های LDH در تومور سرطان سینه موش BALB/c میباشد. در شکل ایده‌آل امید آن می‌رود که تمرین بتواند با تغییر در ایزوفرم‌های مختلف به سوق هوازی متابولیسم تومور منجر و به بهبود آن کمک نماید.

وربورگ نمونه‌ای از این تغییر متابولیسمی است که بیان می‌دارد سلول‌های تومور با وجود اکسیژن کافی فعالیت گلیکولیتیکی بالایی از خود نشان می‌دهند (۲). گلیکولیز هوازی در سلول‌های سرطانی شامل برداشت بالای گلوکز به همراه تولید اسید لاکتیک در حضور اکسیژن می‌باشد. این فنوتیپ متابولیکی اساس ایجاد اکثر تومورها می‌باشد (۲).

در نتیجه گلیکولیز هوازی اسید لاکتیک زیادی تولید گردیده و باعث ایجاد یک همزیستی مسالمت‌آمیز بین سلول‌های تومور گردیده که در نهایت به زنده ماندن سلول‌های سرطانی کمک می‌نماید (۳). این اتفاق با انتقال لاکتات بین سلول‌های سرطانی رخ می‌دهد: لاکتات عمدتاً در سلول‌های دور از عروق که خاصیت گلیکولیتیکی بالایی دارند تولید و در سلول‌های مجاور عروق که توان اکسیداتیو زیادی دارند مصرف می‌شود (۴، ۵). تغییر در متابولیسم لاکتات در سلول‌های تومور بیشتر از طریق تغییر در بیان آنزیم لاکتات دهیدروژناز (LDH) و ایزوآنزیم‌های آن انجام می‌شود. LDH آنزیمی تترامریک است که شامل دو زیر واحد مهم است (A و B)، این دو با دو ژن متفاوت کد گذاری می‌شود که آن‌ها را با LDH-A و LDH-B می‌شناسند (۶). هر زیر واحد خصوصیات ویژه‌ای دارند: LDH-A بیشتر تمایل به تبدیل پیرووات به لاکتات دارد در حالی که LDH-B عمدتاً تبدیل لاکتات به پیرووات را انجام می‌دهد. زیر واحدهای این آنزیم تلفیقی از پنج ایزوآنزیم متفاوت (LDH-1 تا LDH-5) هستند که به نسبت‌های مختلف در هر زیر واحد وجود دارند (۷). این ایزو آنزیم‌ها وظیفه متابولیکی هر زیر واحد را تعریف می‌کنند: هر چه میزان بیان LDH-5 در یک زیر واحد بیشتر باشد آن زیر واحد نماینده گلیکولیتیکی بیشتری خواهد داشت و برعکس بیان بیشتر LDH-1 در یک زیر واحد به آن خاصیت اکسیداتیو بیشتری می‌بخشد (۷). در اکثر سرطان‌های سینه که فنوتیپی گلیکولیتیک را برای خود اتخاذ می‌کنند بیان LDH-A و LDH-5 در سلول افزایش می‌یابد (۸، ۹). افزایش بیان LDH نه تنها باعث افزایش سرعت تولید ATP در جهت تکثیر سلول‌های سرطانی می‌شود، بلکه باعث تولید NAD برای تداوم گلیکولیز می‌شود (۱۰). علاوه بر این افزایش بیان LDH-A، تولید لاکتات را افزایش می‌دهد که برای تخریب ماتریکس خارج سلولی و رگزایی مهم و در متاستاز سرطان اهمیت زیادی دارد (۱۱). لذا به دلیل این که فعالیت

روش‌شناسی

حیوان: مطالعه حاضر به صورت تجربی انجام شد. ۲۵ موش BALB/c (سن سه هفتگی) از انستیتو پاستور تهران خریداری شد و در شرایط هوایی آزمایشگاه تحت سیکل ۱۲:۱۲ ساعت تاریکی - روشنایی در محیط بدون استرس نگهداری (۲۲ °C) و با غذای مخصوص موش و آب تغذیه شدند. بعد از یک هفته نگهداری و آشناسازی با محیط آزمایشگاه موش‌ها به طور تصادفی به دو گروه تمرینی (n=۱۳) و کنترل (n=۱۲) تقسیم و بر اساس وزن همسان‌سازی شدند و علائم بالینی آن‌ها در طی تحقیق چک می‌گردید. مجوز اخلاق جهت انجام تحقیق حاضر از کمیته اخلاقی مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان اخذ گردید.

نحوه‌ی ایجاد سرطان: سرطان در تحقیق حاضر از طریق تزریق زیرپوستی سلول سرطانی MC4-L2 در پد چربی پهلو راست سینه رت بوجود آمد. لاین سلولی مورد نظر از انستیتو پاستور ایران خریداری و سلول‌ها در محیط DMEM high glucose، 10% fetal calf serum (FCS) و 1% penicilin / streptomycin کشت و تحت شرایط ۵% CO₂، ۹۵% O₂ و دمای 37 c نگهداری شدند (۱۷). سلول‌های MC4L2 کشت داده شده پس از تریپسینه شدن و شستشو با بافر PBS با لام نئوبار شمارش شدند و جهت القاء سرطان سینه، تعداد ۱/۲×۱۰^۶ سلول در حجم ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS تهیه و به صورت زیرپوستی به ناحیه پد سینه راست موش تزریق شد (۱۸). ۱۰ روز بعد از تزریق، تومور با چشم قابل رؤیت شد. با توجه به اینکه در چهار سر از موش‌ها تومور ایجاد نگردید و تعداد سه سر موش در طول دوران تحقیق از بین رفتند، اندازه‌گیری نهایی متغیرهای تمرین بر روی نه موش از هر گروه انجام گرفت.

پروتکل تمرینی: تمرین استقامتی به مدت هفت هفته، پنج روز در هفته بر گروه تمرینی اعمال شد (جدول ۱). تمرینات در هفته اول با دوییدن روی تردمیل موش سرعت ۱۵ متر بر ثانیه به مدت ۲۰ دقیقه شروع و در نهایت در هفته هفتم به ۵۵ دقیقه

دویدن با سرعت ۲۰ متر بر ثانیه رسید. در دو هفته آخر نیز تمامی متغیرهای تمرینی ثابت نگه داشته شدند تا سازگاری‌های انجام شده در زمان تشریح به حالت یکنواخت خود برسند.

واسترن بلات: جهت تهیه هموزن از بافت تومور، حدود ۲۰۰ - ۱۵۰ میلی گرم از بافت تومور با روش هاون کوبی پودر و به نسبت یک به پنج در بافر لیزکننده RIPA (۵۰ میلی مولار تریس هیدروکلرید (Tris-HCl)، ۱۵۰ میلی مولار سدیم کلرید (NaCl)، ۱٪ NP40 (Nonidet P-40)، ۱٪ سدیم دئوکسی کولات (Na deoxycholate)، ۱۰٪ سدیم دودسیل سولفات (SDS)، ۰/۰۱ مولار فنیل متیل سولفونیل فلوراید (PMSF)، یک میلی-مولار EDTA، pH = ۷/۲) لیز و به طور کامل هموزن شد. محلول حاصله سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای چهار درجه نگهداری و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ rpm، ۴۰ سانتیفریژ شد. سوپرناتانت برداشته و در دمای ۸۰ - درجه سانتی گراد نگهداری شد. بخشی از این هموزن جهت انجام وسترن بلات به شرح زیر و بقیه برای سنجش ایزوآنزیم‌های LDH استفاده شد.

تعیین غلظت پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش بردفورد و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد انجام گرفت. وسترن بلات بدین صورت بود که میزان ۲۰ میکروگرم پروتئین در هر چاهک ریخته شد و جدا سازی پروتئین با استفاده از تکنیک PAGE SDS با ژل ۱۲/۵ درصد انجام شد. پروتئین‌های جدا شده به غشای PVDF با منافذ ۰.۴۵ میکرون انتقال داده شدند. سپس مرحله بلاکینگ غشاء با محلول محتوی ۵۰ میلی مولار تریس هیدروکلراید، ۰/۱٪ تویین ۲۰ (Tween20)، ۱۵۰ میلی مولار سدیم کلرید، ۵٪ اسکیم میلک (BSA)، pH=۷/۴، به مدت ۱/۵ ساعت خوابانده شد. سپس غشاء در طول شب در محلول محتوی آنتی‌بادی اولیه با غلظت یک میکروگرم/میلی لیتر که در بافر محتوی ۱٪ BSA و ۲٪ اسکیم میلک رقیق شده بود، قرار گرفت. پس از انجام شستشوی غشاء جهت رفع آنتی بادی‌های غیر متصل، غشاء در معرض

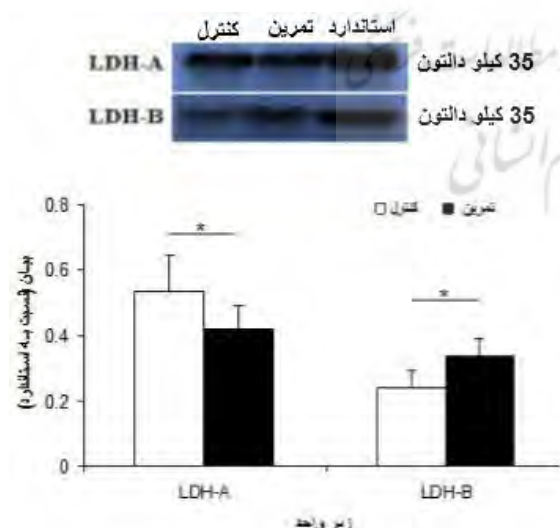
جدول ۱: مشخصات پروتکل تمرینی

زمان	آشنا سازی ۵ روز	هفته ۱	هفته ۲	هفته ۳	هفته ۴	هفته ۵	هفته ۶	هفته ۷
سرعت (متدر در دقیقه)	۱۵	۱۵	۱۷	۱۷	۱۸	۲۰	۲۰	۲۰
مدت (دقیقه)	۲۰	۳۰	۴۰	۴۰	۵۰	۵۰	۵۵	۵۵

روش آماری: داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند، داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد (means \pm SE) بیان شد. بعد از چک کردن نرمالیتی توزیع با استفاده از آزمون کلموگروف - اسمیرنوف سنجیده شد. جهت تعیین معنی دار بودن تفاوت متغیرها بین گروه‌های تحقیق از آزمون آماری تی مستقل استفاده گردید. سطح معنی داری در تمامی مقایسه‌ها برابر با $\alpha = 0.05$ انتخاب شد.

یافته‌ها

در ابتدا جهت بررسی تغییرات تمرین بر فنوتیپ متابولیکی تومور، غلظت لاکتات تومور اندازه‌گیری شد. تمرین استقامتی به طور معناداری غلظت لاکتات تومور را در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل کاهش داد ($P < 0.05$). میانگین غلظت لاکتات تومور در گروه کنترل $1.34 \pm 11/2$ و در گروه تمرینی $0.97 \pm 1/04$ میکرو مول در میلی گرم بود. سپس برای تعیین این که آیا تغییر در تولید لاکتات تومور مربوط به تغییر ایزوفرم‌های LDH است یا خیر، ایزوفرم‌های LDH اندازه‌گیری شد. متابولیک تغییر یافته تومور در گروه تمرینی با کاهش معنی داری در بیان LDH-A در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل همراه بود ($P < 0.05$) (شکل ۱). همچنین افزایش همزمان در بیان LDH-B تومور نیز در گروه تمرینی نسبت به گروه کنترل مشاهده شد ($P < 0.05$) (شکل ۱).



شکل ۱: بیان LDH-A و LDH-B در تومور در گروه‌های تحقیق. مقادیر برابر با میانگین \pm SD، گروه کنترل ($n=12$)، تمرینی ($n=13$)
 $=$ اختلاف معنی دار بین دو گروه ($P < 0.05$)

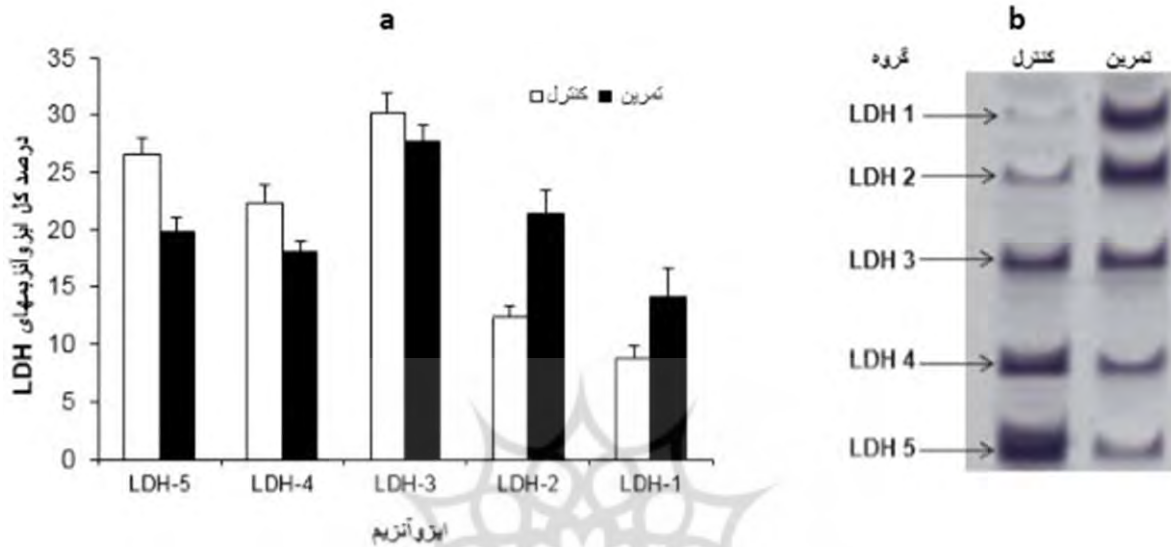
آنتی‌بادی ثانویه HRP قرار گرفته و مجددا شسته شد. بیان پروتئین با استفاده از روش Enhanced ECL Chemiluminescence اندازه‌گیری شد. غشاء در معرض فیلم رادیوگرافی قرار گرفت و ظهور باندها بر روی فیلم در تاریک-خانه به انجام رسید. از تکنیک چگالی سنجی چگالی باندهای MCT1 و MCT4 تعیین شد و جهت نیمه‌ کمی کردن بیان MCT1 و MCT4 از میزان بیان MCT1 در غشای اریتروسیت استفاده گردید. در این روش میزان باند MCT1 حاصل از پنج میکروگرم پروتئین mouse erythrocyte ghost به عنوان مبنا در نظر گرفته شد و بقیه باندها در مقایسه با آن به مقادیر کمی تبدیل شدند (۱۲).

نحوه‌ی اندازه‌گیری لاکتات تومور: جهت اندازه‌گیری لاکتات تومور حدود ۵۰ میلی گرم تومور با روش هاون کوبی پودر گردید و به نسبت یک به هشت در پرکلریک اسید ۷٪ به مدت ۱۰ دقیقه خوابانده، سپس در 4°C , 10 min, 1500 g سانتریفیوژ و سوپرناتانت به عنوان نمونه جهت اندازه‌گیری لاکتات تومور مورد استفاده قرار گرفت (۱۹). اندازه‌گیری لاکتات با استفاده از lactic acid assay kit, cat: K607-100, company: biovision طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت.

جدا سازی ایزوآنزیم‌های LDH و تجزیه و تحلیل آن به روش الکتروفورز: ایزوآنزیم‌های LDH موجود در هموژن تومور الکتروفورز شده، در ژل آگاروز (یک درصد) با استفاده از دستگاه Bio-Rad SubCell system جدا شدند. نمونه شامل ۱۵ میکروگرم از پروتئین کل و LDH Ladder (K770049, LDH Isotrol, Sigma) با استفاده از الکتروفورز در 90°V به مدت ۳۰ دقیقه جدا شد. باندهای LDH با استفاده از کیت الکتروفورز ایزوآنزیم‌های LDH (SRE612K, interlab) با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده رنگ‌آمیزی و مشاهده شدند. ژل در استیک اسید پنج درصد ثابت شد. باندهای مختلف با استفاده از نرم افزار ImageJ کمی سنجی و اسکن شد. برای آنالیز چگالی سنجی، فقط آن دسته از نمونه‌ها انتخاب شدند که در آن تمام پنج باند ایزوفرم LDH به طور مجزا قابل مشاهده بود. توزیع ایزوآنزیم LDH با تقسیم منطقه \times میانگین چگالی برای هر ایزوآنزیم تقسیم بر مجموع مساحت \times میانگین چگالی هر پنج ایزوآنزیم محاسبه شد. نتایج به صورت درصد از تمام ایزوفرم‌های LDH بیان شده است.

تومور شامل دو ناحیه با اکسیژن کافی (هوایی) و با اکسیژن کم (هیپوکسی) است که هرکدام از نواحی به ترتیب گلوکز را برای متابولیسم اکسیداتیو و گلیکولیتیکی استفاده می‌کنند (۴، ۵، ۲۲). برداشت لاکتات و استفاده از آن توسط سلول‌های تومور با اکسیژن کافی دسترسی سلول‌های تومور هیپوکسی به گلوکز را

در آخر برای روشن شدن مکانیسم این تغییر ایزوفرم، ایزوآنزیم‌های LDH ارزیابی شدند. تومور موش‌های گروه تمرینی عمدتاً شامل LDH1 و LDH2 بودند، در حالی که تومور حیوانات گروه کنترل بیان بالاتری از ایزوآنزیم‌های LDH4 و LDH5 را دارا بود (شکل ۲).



شکل ۲: (a) میانگین ایزوفرم‌های LDH نشان دهنده کاهش بیان LDH5 در گروه تمرینی پس از تمرین استقامتی است. مقادیر به صورت میانگین \pm SD گزارش شده است، گروه کنترل ($n=12$)، تمرینی ($n=13$). (b): نمونه‌ای از تومور یک موش که ایزوآنزیم‌های LDH آن در ژل آگاروز جدا شده‌اند.

افزایش می‌دهد به زنده ماندن و تکثیر آن‌ها کمک می‌کند (۴، ۲۲). از دیدگاه متابولیک، تمرین استقامتی با کاهش در غلظت لاکتات تومور این همزیستی بین سلول‌های تومور را تا حدودی کاهش و به جلوگیری از پیشرفت تومور کمک نماید (کاهش وزن و حجم تومور در تحقیق حاضر، داده‌های گزارش نشده). از طرف دیگر، کاهش ناشی از ورزش در غلظت لاکتات تومور، نقش این فاکتور در تخریب ماتریکس خارج سلولی و رگزایی را که در متاستاز سرطان اهمیت بسیار زیادی دارد کم رنگ‌تر می‌سازد (۱۱).

به منظور شناخت دلایل احتمالی تغییرات لاکتات تومور، در تحقیق حاضر تغییرات ایزوفرم‌های LDH بررسی و کاهش در بیان LDH-A متعاقب تمرین استقامتی گزارش شد. افزایش سطوح LDH-A یکی از نشانه‌های تومور به ویژه آن‌هایی که شاخص گلیکولیتیکی بالایی دارند، می‌باشد و نقش مهمی در

بحث و نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر تأثیر تمرین استقامتی بر بیان ایزوفرم‌های LDH (A و B) در تومور موش‌های balb/c مبتلا به سرطان سینه ارزیابی شد. مهمترین نتایج تحقیق این بود که تمرین استقامتی با سوق ایزوآنزیم‌های LDH به سمت LDH1 باعث کاهش بیان LDH-A و افزایش بیان LDH-B در تومور گردیده که نتایج غایی این تغییرات کاهش در غلظت لاکتات تومور می‌باشد.

مکانیسم تأثیر مفید تمرین استقامتی بر پیشرفت سرطان سینه بسیار پیچیده است (۲۰، ۲۱). کاهش غلظت لاکتات تومور در تحقیق حاضر، به عنوان دیگر اثر مفید تمرین، می‌تواند اثرات مفیدی در پیشگیری یا درمان سرطان سینه داشته باشد. لاکتات نقش مهمی در پیشرفت سرطان بازی می‌کند.

آزاد شدن لاکتات خارج سلولی موثر باشد در نتیجه از اسیدیته و تهاجم سلول‌های توموری جلوگیری می‌کند. اما این تفسیر باید با احتیاط گفته شود زیرا غلظت لاکتات تومور ممکن است تحت تاثیر مصرف لاکتات، تولید غیر هوازی لاکتات و یا هردو قرار بگیرد. به طور مثال، میتوکندری نقش مهمی در اکسیداسیون لاکتات دارد که تغییر فعالیت آن در سلول‌های سرطانی ممکن است نقش مهمی در گسترش تومور داشته باشد. فعالیت زنجیره انتقال الکترون، مصرف اکسیژن سلولی و میزان سنتز ATP در سلول‌های سرطان سینه بسیار پایین است (۹، ۲۶). تمرین نه تنها تعداد میتوکندری را افزایش می‌دهد، بلکه عملکرد و تاثیرگذاری آن را نیز بهبود می‌بخشد. بنابراین ممکن است برخی از تغییرات مشاهده شده در غلظت لاکتات تومور مربوط به تأثیر تمرین استقامتی بر عمل میتوکندریایی باشد.

مکانیسمی که توسط آن تمرین استقامتی ایزوآنزیم‌های LDH و متعاقب آن رشد تومور را تغییر می‌دهد در این تحقیق مورد بررسی قرار نگرفت. اگرچه تحقیقات ژنتیکی اخیر نشان داده‌اند که کاهش بیان زیرواحد LDH-B در تومور سرطان سینه انسان احتمالاً به دلیل متیلاسیون پروموتور LDH-B است (۲۷، ۲۸). متیلاسیون ناهنجار DNA ممکن است باعث غیر فعال شدن ژن‌های مرتبط با بازدارندگی تومور از قبیل CACNA2D3 و L3MBTL1 شود (۲۸). مطالعات گذشته نشان دادند که تمرین استقامتی می‌تواند وضعیت متیلاسیون این ژن‌های خاص را کاهش دهد و تاثیر مثبتی بر علیه تومورزایی داشته باشد (۲۹، ۳۰). مکانیسمی مشابه در مورد تمرین در افزایش بیان LDH-B وجود دارد، اما تاکنون گزارشی در این مورد انجام نشده است. تحقیقات آتی می‌تواند روشن‌گر این مسیر باشد.

به طور خلاصه، نتایج تحقیق حاضر اثر مفید تمرین استقامتی بر کاهش غلظت لاکتات تومور را گزارش نمود که به طور همزمان با کاهش بیان LDH-A و افزایش بیان LDH-B اتفاق می‌افتد. نتیجه نهایی این تغییرات شیفت ایزوآزیم‌های لاکتات به سمت LDH1 است که می‌تواند از فنوتیپ اسیدی تومور بکاهد. این نتایج شواهدی از فواید درمانی تمرین استقامتی در سرطان سینه می‌باشد. در نتیجه تمرین استقامتی با

پیشرفت تومور ایفا می‌کند. در تحقیقی سرکوب LDH-A سطح ATP را کاهش و باعث ایجاد استرس اکسایشی گردید که این عامل باعث مرگ سلول و جلوگیری از پیشرفت سرطان پانکراس گردید (۲۳). تحقیقات دیگر، نتایجی مشابه را با خاموش کردن LDH-A در سرطان سینه گزارش کرده‌اند (۹). این نتایج نشان می‌دهد که افزایش بیان LDH-A در سلول‌های سرطانی فنوتیپی گلیکولیتیکی قوی را ایجاد می‌کند که باعث کاهش وابستگی تومور به اکسیژن موجود می‌شود. نتایج ما برای اولین بار نشان می‌دهد که تغییرات ناشی از تمرین با افزایش بیان LDH1 و LDH2 از تولید لاکتات تومور جلوگیری می‌کند که این تغییر همزمان با کاهش بیان LDH-A در تومور اتفاق می‌افتد، بنابراین برخی از تغییرات ایزوآنزیم‌های LDH با کاهش LDH-A توجیه می‌شود.

با این وجود از نتایج ما کاملاً مشخص بود که کاهش بیان LDH-A نمی‌تواند تمام تغییرات شیفت پیدا کردن به سمت LDH-1 را توضیح دهد. تغییرات مشاهده شده در بیان LDH-B تومور دلالت بر این داشت که افزایش بیان LDH-B نیز می‌تواند به عنوان عاملی دیگر در شیفت ایزوآنزیم‌های LDH مطرح شود. مطالعات پیشین نقش تمرین بر افزایش بیان LDH-B در عضله اسکلتی انسان را گزارش کرده‌اند (۱۲، ۲۳) اما شواهدی مبنی بر تاثیر تمرین استقامتی بر بیان LDH-B در تومور گزارش نشده است. افزایش بیان LDH-B در تومور بعد از تمرین استقامتی که در تحقیق حاضر برای اولین بار گزارش شده است، نقش فیزیولوژیکی مهمی در پیشرفت تومور دارد. تنظیم کاهشی LDH-B نسبت به LDH-A تاثیر زیادی بر تولید لاکتات دارد (۲۵، ۲۶). جلوگیری از LDH-B می‌تواند آغازگر و همچنین عاملی در جهت حفظ شیفت متابولیکی به سمت گلیکولیز هوازی توسط فعال کردن گلیکولیز و همچنین جلوگیری از تنفس میتوکندریایی باشد، که این عوامل می‌تواند عامل بالقوه‌ای برای تهاجم سلول‌های سرطانی باشد (۲۶). بنابراین کاهش LDH-A و همزمان با آن افزایش در بیان LDH-B توسط تمرین استقامتی توضیحی برای تأثیر مفید تمرینات با شدت متوسط بر رشد تومور می‌باشد. تغییرات ایزوآنزیمی LDH مشاهده شده در این تحقیق همزمان با کاهش غلظت لاکتات تومور بود. بنابراین می‌توان بر این گمان بود که شیفت ایزوآزیم‌های LDH می‌تواند بر جلوگیری از تولید لاکتات و

تعدیل متابولیسم لاکتات تومور می‌تواند ابزاری مفید برای درمان یا پیشگیری از سرطان سینه باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدینوسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از پژوهشکده مرکز تحقیقات علوم اعصاب کرمان به جهت حمایت آزمایشگاهی از انجام تحقیق حاضر ابراز می‌دارند.

منابع

- Seyfried TN, Shelton LM. Cancer as a metabolic disease. *Nutr Metab (Lond)* 2010; 27: 7-17.
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956; 24:309-14.
- Nihed D, Olivier F. Lactate shuttles at a glance: from physiological paradigms to anti-cancer treatments. *Disease Models & Mechanisms* 2011; 4: 727-732 .
- Sonveaux P, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *Journal of Clinical Investigation* 2008; 1; 118(12): 3930-3942.
- Semenza GL. Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *Journal of Clinical Investigation*. *J Clin Invest* 2008;118(12):3835-7.
- Markert CL. Lactate Dehydrogenase Isozymes: Dissociation and Recombination of Subunits. *Science* 1963; 140: 1329-1330.
- Markert CL, Shaklee JB, Whitt GS. Evolution of a gene. Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function and regulation. *Science* 1975; 189: 102-114.
- Hussien R, Brooks GA. Mitochondrial and plasma membrane lactate transporter and lactate dehydrogenase isoform expression in breast cancer cell lines. *Physiol Genomics* 2011; 16:43(5):255-64.
- Wang ZY, Loo TY, Shen JG, Wang N, Wang DM, Yang DP, et al. LDH-A silencing suppresses breast cancer tumorigenicity through induction of oxidative stress mediated mitochondrial pathway apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 131: 791-800.
- Granchi C, Bertini S, Macchia M, Minutolo F. Inhibitors of lactate dehydrogenase isoforms and their therapeutic potentials. *Curr Med Chem* 2010; 17:672-697.
- Elias AP, Dias S. Microenvironment changes (in pH) affect VEGF alternative splicing. *Cancer Microenviron* 2008; 1(1):131-139.
- Dubouchaud H, Butterfield GE, Wolfel EE, Bergman BC, Brooks GA. Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278(4):E571-9.
- McClelland GB, Brooks GA. Changes in MCT 1, MCT 4, and LDH expression are tissue specific in rats after long-term hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 2002; 92(4):1573-84.
- Kossmann DA, Williams NI, Domchek SM, Kurzer MS, Stopfer JE, Schmitz KH. Exercise lowers estrogen and progesterone levels in premenopausal women at high risk of breast cancer. *J Appl Physiol* 2011; 111:1687-1693.
- Schroeder, James EH, Mark WD, Stephen TK, Stephen JF, Michael QP, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *J Appl Physiol* 2010; 108:343-348 .
- Almeida PW, Gomes-Filho A, Ferreira AJ, Rodrigues CE, Dias-Peixoto MF, Russo RC, et al. Swim training suppresses tumor growth in mice. *J Appl Physiol* 2009;107(1):261-5.
- Friedenreich CM, Orenstein MR. Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr* 2002; 132: S3456- S3464.
- Shalini SK, Radhakrishnan AK, Cheong SK. Immune responses in the microenvironment of a metastatic 4T1 mouse model. *Egypt Acad J biolog* 2010; 2 (2): 19- 26.
- Steiner JL, Davis JM, McClellan JL, Enos RT, Murphy EA. Effects of voluntary exercise on tumorigenesis in the C3(1)/SV40Tag transgenic mouse model of breast cancer. *Int J Oncol* 2013; 42(4):1466-72.
- McTiernan A. Cancer Prevention and Management Through Exercise and Weight Control. *Physical Therapy* 2007; 87. 5 615.
- Eickmeyer SM, Gamble GL, Shahpar S, Do KD. The role and efficacy of exercise in persons with cancer. *PM R* 2012; 4(11):874-81.
- Feron O. Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol* 2009; 92:329-33.
- Le A, Cooper CR, Gouw AM, Dinavahi R, Maitra A, Deck LM, et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 2037-2042.
- Hittel DS, Kraus WE, Tanner CJ, Houmard JA, Hoffman EP. Exercise training increases electronand substrate shuttling proteins in muscle of overweight men and women with the metabolic syndrome. *J Appl Physiol* 2005;98: 168-179.
- Gatenby RA, Gillies RJ. Why do cancers have high aerobic glycolysis?. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 891-899.
- Kim JH, Kim EL, Lee YK, Park CB, Kim BW, et al. Decreased lactate dehydrogenase B expression enhances claudin 1-mediated hepatoma cell invasiveness via mitochondrial defects. *Exp Cell Res* 2011; 317: 1108-1118.
- Leiblich A, Cross SS, Catto JWF, Phillips JT, Leung HY, Hamdy FC, et al. Lactate Dehydrogenase-B Is Silenced by Promoter Methylation in a High Frequency of Human Breast Cancers. *PLoS ONE* 2013; 2, e57697.

28. Ntanasis-Stathopoulos J, Tzanninis JG, Philippou A, Koutsilieris M. Epigenetic regulation on gene expression induced by physical exercise. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2013; 2: 133-146.
29. Yuasa Y, Nagasaki H, Akiyama Y, Hashimoto Y, Takizawa T, Kojima K, et al (). DNA methylation status is inversely correlated with green tea intake and physical activity in gastric cancer patients. *Int J Cancer* 2009; 11: 2677-2682.
30. Zeng H, Irwin ML, Lu L, Risch H, Mayne S, Mu L, et al. Physical activity and breast cancer survival: an epigenetic link through reduced methylation of a tumor suppressor gene L3MBTL1. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133: 127-135.



Oxidative shift of LDH isoenzymes after endurance training in tumors of mice with breast cancer

Aveseh M¹, Nikooie R^{2*}, Samandari MR³

1. Shiraz University

2. University of Kerman

3. Kerman Neuroscience Research Center, Kerman University of Medical Sciences

Received: 2015/05/25

Revised: 2015/08/11

Accepted: 2016/02/28

* Correspondence:

Email:

r_nikooie@uk.ac.ir

Abstract

Introduction: Determination of treatment methods that can prevent breast cancer progression is important. The objective of the present study was to investigate the effects of endurance training on Lactate Dehydrogenase (LDH) isoenzymes expression in tumor of balb/c mice bearing breast cancer.

Methods: In this experimental study, twenty five female balb/c mice were randomly divided in two experimental [n=13] and control [n=12] groups. Breast cancer was induced by subcutaneous injection of MC4L2 cells in mammary pad region of each mouse and the experimental group was exposed to seven weeks of endurance training. Tumor lactate concentration was measured by RDI (Radioimmunoassay), LDH-A and LDH-B expression in solid tumor were measured by western blotting and LDH isoenzymes expression were separated and measured in Agarose gel. The statistical difference between groups was determined by t- test .

Results: After seven weeks of endurance training, tumor lactate concentration significantly decreased in experimental group in comparison to control group ($p < 0.05$). This change was associated with significant decrease in tumor expression of LDH-A ($p < 0.05$) and concurrent increase in LDH-B ($p > 0.05$) in experimental group. At the end of the experiment, there was more expression of LDH1 and LDH2 in solid tumors of experimental group whereas solid tumors of control group had more expression of LDH4 and LDH5.

Conclusions: By changing the isoforms of lactate dehydrogenase and alleviation of tumor lactate metabolism, endurance training can be a useful method in prevention or treatment of breast cancer.

Keywords: BALB/c, breast cancer, lactate dehydrogenase.