

Comparison of the effect of 6-week aerobic and high intensity interval training on expression of uPA and uPAR in the tumor tissue of female mice with breast cancer

Gita Fardad¹, Abasali Gaeini^{2*}, Reza Nouri², Parisa Pournemati²

1. Department of Sport Sciences, University of Tehran, Kish International Campus, Kish, Iran
2. Department of Exercise Physiology, Faculty of Sport Sciences and Health, University of Tehran, Tehran, Iran

* Corresponding author e-mail: Abasali Gaeini (aagaeni@ut.ac.ir)

Abstract

Background and Objective: In the past few decades, research on the role of physical activity in the prevention of cancer and disease progression has been the subject of attention of many researchers. The aim of this study was to compare the effect of 6 weeks of aerobic training and high intensity interval training on the expression of uPA and uPAR in the tumor tissue of female mice with breast cancer.

Materials and Methods: 24 female Balb c mice with breast cancer were randomly divided into 3 groups: tumor (T), tumor + aerobic training (T+AE) and tumor + high intensity interval training (T+HIIT). The T+AE group had incremental endurance treadmill running for 6 weeks/5 days/60 minutes. The T+HIIT group had a 6-week/3-day/60 min high intensity interval training protocol. Then, the mice were killed, the tumor tissue was removed and frozen in liquid nitrogen. The expression of uPA and uPAR genes was measured by Real Time-PCR method. Δ CT, $\Delta \Delta$ CT, fold change, one-way ANOVA and Tukey's tests were performed at a significant level $P < 0.05$ with GENEX software .

Results: The results of the present study showed that in the T+AE group compared to the T group, the expression of uPA and uPAR decreased ($P=0.00$) 2.07 and 2.55 times. In the T+HIIT group compared to the T group, the expression of uPA and uPAR decreased 4.25 and 7.74 times ($P=0.00$), and in the T+HIIT group compared to the T+AE group, the expression of uPA and uPAR decreased 2.04 and 3.03 times ($P=0.00$).

Conclusion: Aerobic training and high intensity interval training are probably effective in preventing the progression of breast cancer by reducing the expression of uPA and uPAR.

Keywords: Breast cancer, Aerobic exercise, High intensity interval training, Urokinase-type plasminogen activator, Urokinase-type plasminogen activator receptor

Received: Jul 31, 2023

Revised: Dec 16, 2023

Accepted: Dec 30, 2023

How to cite this article: Fardad G, Gaeini A, Nouri R, Pournemati P. Comparison of the effect of 6-week aerobic and high intensity interval training on expression of uPA and uPAR in the tumor tissue of female mice with breast cancer. Daneshvar Medicine 2024; 31(5):23-34. doi: 10.22070/DANESHMED.2024.18022.1381

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

مقایسه تأثیر ۶ هفته تمرین هوازی و تمرین تناوبی خیلی شدید بر بیان uPA و uPAR در بافت تومور موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان

گیتا فرداد^۱، عباسعلی گائینی*^۲، رضا نوری^۲، پرینا پورنعمتی^۲

۱. گروه علوم ورزشی، دانشگاه تهران پردیس بین‌المللی کیش، کیش، ایران
۲. گروه فیزیولوژی فعالیت ورزشی، دانشکده علوم ورزشی و تندرستی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

Email: aagaeini@ut.ac.ir

*نویسنده مسئول: عباسعلی گائینی

چکیده

مقدمه و هدف: در چند دهه گذشته، پژوهش در زمینه نقش فعالیت بدنی در پیشگیری از ابتلا به سرطان و پیشرفت بیماری، موضوع مورد توجه بسیاری از پژوهشگران بوده است. هدف از این پژوهش، مقایسه تأثیر ۶ هفته تمرین هوازی و تمرین تناوبی خیلی شدید بر بیان uPA و uPAR در بافت تومور موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان بود.

مواد و روش‌ها: ۲۴ سر موش balb c ماده مبتلا به سرطان پستان، به‌طور تصادفی به ۳ گروه تومور (T)، تومور+تمرین هوازی (T+AE) و تومور+تمرین تناوبی شدید (T+HIIT) تقسیم شدند. گروه T+AE، تمرین استقامتی فزاینده دویدن روی نوارگردان را به مدت ۶ هفته/۵ روز/۶۰ دقیقه اجرا کردند. گروه T+HIIT، ۶ هفته/۳ روز/۶۰ دقیقه، پروتکل تمرین تناوبی خیلی شدید را اجرا کردند. سپس موش‌ها کشته شدند، بافت تومور برداشته و در نیتروژن مایع فریز شد. بیان ژن‌های uPA و uPAR به روش Real Time-PCR سنجیده شد. $\Delta\Delta CT$ ، ΔCT ، Fold change، آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون توکی، در سطح معناداری ($P < 0/05$) با نرم‌افزار GENEX محاسبه شد.

نتایج: پژوهش حاضر نشان داد در گروه T+AE در مقایسه با گروه T، بیان uPA و uPAR، به ترتیب ۲/۰۷ و ۲/۵۵ برابر کاهش ($P = 0/00$) یافت. در گروه T+HIIT در مقایسه با گروه T، بیان uPA و uPAR، به ترتیب ۴/۲۵ و ۷/۷۴ برابر کاهش ($P = 0/00$) و در گروه T+HIIT در مقایسه با گروه T+AE، بیان uPA و uPAR، به ترتیب ۲/۰۴ و ۳/۰۳ برابر کاهش ($P = 0/00$) یافت.

نتیجه‌گیری: تمرین هوازی و تمرین تناوبی خیلی شدید احتمالاً با کاهش بیان uPA و uPAR، در پیشگیری از پیشرفت بیماری سرطان پستان مؤثر است.

واژه‌های کلیدی: سرطان پستان، تمرین هوازی، تمرین تناوبی خیلی شدید، فعال‌کننده پلاسمینوژن یوروکیناز، گیرنده فعال‌کننده پلاسمینوژن یوروکیناز

وصول مقاله: ۱۴۰۲/۰۵/۰۹

اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۲/۰۹/۲۵

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۹

مقدمه

سرطان به عنوان مهم ترین عامل مرگ در جهان شناخته شده است. با توجه به آخرین آمار جهانی که در سال ۲۰۲۰ ارائه شده است، تقریباً ۶۸۵۰۰۰ نفر، به علت ابتلا به سرطان پستان فوت کردند. سرطان پستان، در سال ۲۰۲۰ در اکثر کشورها، اصلی ترین عامل مرگ ناشی از سرطان در زنان گزارش شد. در ایران نیز اصلی ترین عامل مرگ ناشی از سرطان در زنان، سرطان پستان بوده است (۱).

سلول های سرطانی به دلیل جهش های تصادفی یا جهش هایی که در اثر عواملی مانند تشعشعات الکترومغناطیسی (اشعه ایکس، مایکروویو، پرتوهای گاما، اشعه ماوراءبنفش و غیره)، تشعشعات هسته ای، قارچ ها، ویروس ها، باکتری ها، انگل ها و یا به دلیل رادیکال های آزاد، پیری DNA و RNA، مواد شیمیایی موجود در هوا، آب و مواد غذایی اتفاق می افتند، به وجود می آیند (۲).

ژن های زیادی در ایجاد تومورها و متاستاز نقش دارند. سیستم گیرنده فعال کننده پلاسمینوژن از نوع یوروکیناز (شامل فعال کننده پلاسمینوژن یوروکیناز^۱ (uPA) و گیرنده اش^۲ (uPAR))، در بسیاری از بافت های تومور بیان می شوند و در فرایندهای وابسته به پیشرفت تومور، مانند تکثیر سلول های تومور، چسبندگی، متاستاز، گلیکولیز، ریزمحیط تومور و آنژیوژنز تومور نقش دارد (۳، ۴). واسالی^۳ و همکارانش، در سال ۱۹۸۵، گیرنده فعال کننده پلاسمینوژن یوروکیناز (uPAR) که با نام CD-87 نیز شناخته می شود، کشف کردند. uPAR، پروتئین تک زنجیره ای گلیکوزیله غنی از سیستئین با وزن مولکولی نسبی ۵۰ تا ۶۰ کیلو دالتون است. پروتئینی متشکل از ۳۳۵ اسید آمینه که ۲۲ اسید آمینه در انتهای N و ۳۰ اسید آمینه در انتهای C دارد که از راه لنگر گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول^۴ (GPI) به غشای سلولی متصل می شود (۵). در اوایل سال ۱۹۹۱، سوتسکی^۵ و همکارانش کشف کردند uPAR ارتباط نزدیکی با سرطان دارد (۳). فعال کننده پلاسمینوژن یوروکیناز (uPA) را فیروبلاست ها،

سلول های اندوتلیال و کراتینوسیت ها^۶ تولید می کنند و به عنوان گلیکوپروتئین تک زنجیره ای با وزن مولکولی ۵۵ کیلو دالتون سنتز می شود. uPA با اتصال به گیرنده فعال کننده پلاسمینوژن خاص خود از نوع یوروکیناز (uPAR)، فعال می شود و تولید پلاسمین را تحریک می کند (۶). در این سال ها، مطالعات گوناگون گزارش کرده اند، مقدار بیان uPAR و uPA در بیماران مبتلا به سرطان پستان، سرطان پروستات، سرطان مثانه و سرطان کولورکتال در حد بارزی فراتر از مقادیر بیان شده در بافت های طبیعی است (۳). به علاوه، بیمارانی که میزان بیان ژن زیادتری از بیان uPAR و uPA دارند، در مقایسه با بیمارانی که بیان ژن کمتری دارند، نرخ زنده ماندن کمتری دارند (۳ و ۶). از بین بردن ژن uPAR در موش به توقف G2/M منجر می شود و در نتیجه مانع از تکثیر سلولی می شود (۷). در مقابل، افزایش بیان uPAR و uPA، به تومورزایی و متاستاز تومور منجر می شود (۸).

uPAR در تکثیر سلول های تومور نقش دارد و این عملکرد uPAR به تازگی در پژوهشی اثبات شده است. در این پژوهش که با سیستم CRISPR/Cas9، uPAR را از بین بردند، نتایج نشان می دهد که با حذف uPAR، تکثیر سلول های سرطانی انسان مهار می شود. مهار کردن uPAR می تواند بیان پروتئین های^۷ MMP2،^۸ MMP9^۹ و P-ERK را در سلول تومور، مهار کرده و تکثیر سلولی را کاهش دهد (۹). علاوه بر تنظیم تکثیر سلولی توسط uPAR، که در بالا توضیح داده شد، uPAR چسبندگی سلولی را نیز تنظیم می کند. uPAR چسبندگی سلول را با القای پروتئولیز ماتریکس خارج سلولی (ECM) و انتقال سیگنال های درون سلولی تنظیم می کند. uPAR با اتصال مستقیم به ویترونکتین و با تشکیل کمپلکس با اینتگرین، چسبندگی سلول را تنظیم می کند (۱۰). همچنین، پژوهش های گوناگونی تأکید می کند آثار تنظیمی uPAR بر متاستاز تومور از راه مسیرهای پیام رسانی مانند مسیرهای

¹ urokinase-type plasminogen activator

² urokinase-type plasminogen activator receptor

³ Vassalli

⁴ Glycosyl phosphatidyl inositol

⁵ sutski

⁶ keratinocyte

⁷ Mitochondrial Membrane Potential 2

⁸ Mitochondrial Membrane Potential 9

⁹ Extracellular signal-regulated kinase Protein

تعامل دارد (۱۳). *VEGF*، عامل اصلی آنژیوژنزی است که رگ‌زایی را آغاز می‌کند، به تخریب پروتئولیزی ماتریکس برون سلولی توسط سیستم *uPA/uPAR* و تنظیم مهاجرت سلولی، از راه تعامل اینتگرین-ماتریکس نیاز دارد. شواهد نشان می‌دهد که *VEGF-E*، *VEGF165*، *FGF-2*^۵ و *EGF*^۶ از راه پیوند خوردن *pro-uPA* به *uPAR*، باعث فعال شدن *PI3K* می‌شود، که پیامد آن افزایش فعالیت فیبرینولیزی سطح سلولی است. بنابراین، *uPAR* مثل یک میانجی مرکزی، برای فاکتورهای رشد عمل می‌کند. همچنین، تصور می‌شود *uPAR* اندوتلیالی سازوکاری تنظیمی را در رگ‌زایی تأمین می‌کند. شواهد نشان می‌دهد *TGF-β* بیان *uPAR* را برای تنظیم فعالیت‌های پیش رگ‌زایی تنظیم می‌کند (۳). مطالعات جدید نشان می‌دهد مهار رشد تومورها و متاستاز، با هدف قراردادن مهم‌ترین عوامل درگیر در مراحل گوناگون سرطان، روش ارزشمندی در درمان سرطان است. با وجود این، سازوکار مسئول آثار فعالیت ورزشی بر مهار پیشرفت تومور چندان شناخته نشده است. پژوهش‌های بالینی آثار فعالیت ورزشی بر بیماران مبتلا به سرطان پستان، برخی مسیرهای درگیر را شناسایی کرده‌اند، اما گوناگونی مراحل تومور، نوع و شدت فعالیت ورزشی و ویژگی‌های بیماران، حاکی از عوامل مداخله‌گر زیادی است که شناسایی سازوکارهای مولکولی و بیولوژیکی آثار فعالیت ورزشی بر پیشرفت تومور را پیچیده کرده است. تمرین‌های ورزشی، به صورت تمرین‌های تکراری تعریف می‌شوند که هموستاز کل بدن را تغییر داده و منجر به سازگاری در سلول‌ها، بافت‌ها و سیستم‌های بدن می‌شوند. سازگاری‌های متابولیک و بیومکانیک ناشی از فعالیت ورزشی در عضلات اسکلتی، بافت چربی، قلب و عروق، نسبت به تومورها بیشتر شناخته شده است. با وجود ناهمگونی قابل توجه در بیش از ۱۰۰ پژوهش مرتبط با بررسی تأثیر فعالیت ورزشی در بیماران مبتلا به سرطان، به طور کلی بیان شده است که تمرین‌های ورزشی منجر به تغییرات مثبتی در وضعیت فیزیولوژیکی (افزایش آمادگی قلبی ریوی، عملکرد فیزیکی و بهبود ترکیب بدنی) و کیفیت زندگی بیماران (مانند

مربوط به *ECM*، اینتگرین‌ها و *TGF-β1*^۱ انجام می‌شود. *ECM* برای بی‌حرکت ماندن سلول ضروری است و مانعی فیزیکی برای حرکت سلول است. مهاجرت سلولی اغلب شامل تجزیه پروتئین‌های *ECM* می‌شود. در بافت‌های تومور، تعامل *uPA* و *uPAR* به پروتئولیز *ECM* از طریق یک واکنش آبشاری منجر می‌شود (۱۱، ۱۲). به جز نقش *uPAR* در تنظیم تکثیر سلولی، تنظیم چسبندگی و تنظیم متاستاز، *uPAR* نقش مهمی در گلیکولیز دارد. سلول‌های طبیعی برای تولید *ATP* به فسفوریلاسیون اکسایشی میتوکندریایی متکی‌اند، درحالی‌که سلول‌های سرطانی که تحت تأثیر فشار اندک اکسیژن قرار دارند، از راه گلیکولیز، با تحریک فاکتور القاشونده هیپوکسی (*HIF-1α*)^۲، انرژی به دست می‌آورند. در اوایل سال ۱۹۹۷، آنچینی^۳ و همکارانش کشف کردند *uPAR* نقش مهمی در گلیکولیز دارد. تعامل *uPA* با *uPAR* به سرعت باعث فعال شدن ناقل گلوکز می‌شود (۳). در انتها، علاوه بر همه نقش‌های کلیدی *uPAR* و *uPA* در تکثیر سلولی، تنظیم چسبندگی، تنظیم متاستاز، تنظیم گلیکولیز و تنظیم ریز محیط تومور، پژوهش‌ها عملکرد مهم این دو فاکتور را در آنژیوژن تومور نیز نشان داده‌اند. فعال شدن *uPAR* در نتیجه پیوند *uPA* را می‌توان، به نوعی "سوئیچ رگ‌زایی" در نظر گرفت. آنژیوژن نقش مهمی در فرایندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیک تومور ایفا می‌کند. رگ‌های خونی به خون اجازه می‌دهند تا به همه قسمت‌های توده تومور در حال رشد، جهت تأمین مواد مغذی، اکسیژن و انتقال سلول‌های تومور مهاجم برای رسیدن به مکان‌های دور برای متاستاز برسند. در هنگام آنژیوژن، سلول‌های اندوتلیالی (*ECs*)، غشای پایه را تخریب می‌کنند، از راه *ECM* دست به مهاجرت می‌زنند، تکثیر می‌شوند و در عروق جدید سازمان‌دهی می‌شوند. *uPAR* بر فعالیت پروتئولیزی *uPA* در سطح سلول‌های اندوتلیال متمرکز است؛ بنابراین آنژیوژن را به روشی وابسته به پروتئاز القا می‌کند. در سلول‌های اندوتلیالی، *uPAR* با *VEGFR2* که میانجی پیام‌رسانی *VEGF*^۴ است و رگ‌زایی را القا می‌کند،

¹ Transforming growth factor-β

² Hypoxia-inducible factor-1α

³ Anichini

⁴ Vascular endothelial growth factor

⁵ Epidermal Growth Factor2

⁶ Epidermal Growth Factor

موش‌ها نیز آزادانه به وسیله بطری‌های ویژه در دسترس قرار داشت.

کشت سلول و نحوه ایجاد تومور

با تزریق یک میلیون سلول آدنوکارسینومای گیرنده استروژن مثبت (*ER+M4-L2*) به صورت زیرجلدی، تومور در موش‌ها ایجاد شد. سلول‌های (*ER+M4L2*) در فلاسک‌های *T75* حاوی استراپتومايسن ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، محیط کشت *DMEM/F-12*، *FBS 10* درصد و پنی‌سیلین ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر، کشت داده شد و پس از تکثیر سلول‌ها، مایع رویی از سطح فلاسک، خارج و سلول‌ها با *PBS* شستشو شده، سپس با آنزیم تریپسین ۰/۰۲۵، سلول‌ها از کف فلاسک جدا و پس از ختنی‌سازی آنزیم با محیط کشت حاوی ۱۰ درصد *FBS*، کلیه محتویات فلاسک به لوله فالکون منتقل شد و آن را حدود ۳ تا ۵ دقیقه، در دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ کرده، سپس مایع رویی برداشته شده و پلاک سلولی در داخل محیط کشت حاوی ۱۰ درصد *FBS* حل شد. بعد از شمارش سلول‌ها، یک میلیون سلول به روش زیرجلدی و متمرکز، در پهلوی راست هر موش تزریق شد. قبل از تزریق سلول‌های سرطانی، ترکیب زایلازین و کتامین به صورت زیرجلدی، برای بی‌هوش کردن موش‌ها تزریق شد (۱۴).

پروتکل تمرین هوازی

موش‌ها برای سازگار شدن با تردمیل در هفته اول، ۳ روز در هفته، ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰ تا ۱۵ متر/دقیقه روی تردمیل دویدند. سپس تمرین هوازی به صورت فزاینده، به مدت ۶ هفته و هر هفته، ۵ روز اجرا شد. موش‌ها در هفته اول پروتکل، با سرعت ۶ تا ۱۴ متر/دقیقه به مدت ۳۳ تا ۴۵ دقیقه، هفته دوم با سرعت ۸ تا ۱۶ متر/دقیقه به مدت ۴۸ تا ۶۰ دقیقه و در هفته سوم تا هفته ششم با سرعت ۱۰ تا ۲۰ متر/دقیقه به مدت ۶۰ دقیقه (اجرای پروتکل تمرین در نیم ساعت ابتدایی پروتکل با سرعت متوسط ۱۴ متر در دقیقه و در نیم ساعت پایانی پروتکل تمرینی با سرعت متوسط ۱۸ متر در دقیقه اجرا شد) روی تردمیل دویدند (۱۵).

خستگی، کیفیت خواب و احساس توانمندسازی) شده است. پژوهش‌های جدید نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی به طور مستقیم بر بافت تومور تأثیر دارد و در نتیجه می‌تواند نتایج بالینی را بهبود بخشد (۹). با وجود اهمیت خیلی زیاد سیستم گیرنده فعال‌کننده پلاسمینوژن از نوع یوروکیناز در همه مراحل رشد و متاستاز تومور، پژوهشی که تأثیر فعالیت ورزشی را بر این عوامل در بافت تومور، بررسی کرده باشد، یافت نشد. لذا هدف از این پژوهش مقایسه تأثیر ۶ هفته تمرین هوازی و تمرین تناوبی خیلی شدید بر بیان *uPA* و *uPAR* در بافت تومور موش‌های ماده مبتلا به سرطان پستان است.

مواد و روش‌ها

نوع پژوهش حاضر، توسعه‌ای و روش آن تجربی است و به روش آزمایشگاهی انجام شد و در آن همه اصول اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی مورد تأیید کمیته اخلاق پژوهشگاه علوم ورزشی به شماره *IR/ssri.rec.2022.13082.1902* رعایت شد. ۲۴ سر موش ماده *balb c* با میانگین سنی ۵ تا ۶ هفته و میانگین وزن ۲۰ گرم، از مرکز انستیتو پاستور تهیه شد و پس از انتقال به محیط آزمایشگاه و تزریق سلول‌های سرطانی، به حیوان‌خانه منتقل شدند. سپس، تصادفی به ۳ گروه تومور (*T*) (ایجاد تومور سرطان پستان با تزریق سلول سرطانی)، گروه تومور+ تمرین هوازی (*T+AE*) (ایجاد تومور سرطان پستان با تزریق سلول سرطانی و انجام پروتکل تمرین هوازی)، و گروه تومور + تمرین تناوبی خیلی شدید (*T+HIIT*) (ایجاد تومور سرطان پستان با تزریق سلول سرطانی و انجام پروتکل تمرین تناوبی خیلی شدید) تقسیم شدند. پس از انتقال موش‌ها به حیوان‌خانه، به مدت یک هفته به منظور ریکاوری و آشنایی با محیط جدید، در گروه‌های ۸ سر موش در محیطی با شرایط استاندارد (چرخه تاریکی به روشنایی ۱۲:۱۲ ساعته، دمای ۲۰ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۴۵ تا ۵۵ درصد) و در قفسه‌های پلکسی‌گلاس با درب توری و ابعاد ۲۵×۲۷×۴۳ سانتی‌متر نگهداری شدند. حیوانات به صورت آزاد از غذای ساخت شرکت به پرور به صورت پلت، تغذیه و آب مورد نیاز

پروتکل تمرین تناوبی خیلی شدید

موش‌ها در این گروه، مشابه گروه تمرین هوازی، فرایند سازگاری با تردمیل را گذراندند. سپس برای به دست آوردن حداکثر سرعت اجرای تمرین ورزشی، آزمون ظرفیت ورزشی انجام شد. در این آزمون، موش‌ها ابتدا با سرعت ۸ متر/دقیقه روی تردمیل شروع به دویدن کردند و هر ۲ دقیقه سرعت نوارگردان، ۱ متر/دقیقه تا زمان وقوع خستگی افزایش یافت. سرعتی که با وجود شوک الکتریکی، موش‌ها به جای دویدن بر روی تردمیل، در قسمت انتهایی تردمیل بیش از ۱۰ ثانیه باقی بمانند، به عنوان خستگی تعریف می‌شود. در حالت خستگی، زمان و سرعت ثبت شد. تمرین تناوبی خیلی شدید، به مدت ۶ هفته، ۳ روز در هفته و به مدت ۱ ساعت در هر جلسه، به صورت دویدن روی تردمیل اجرا شد. هر جلسه تمرین تناوبی خیلی شدید، با ۲ دقیقه دویدن در حداکثر سرعت به دست آمده در آزمون تعیین ظرفیت ورزشی، شروع شده و بعد از هر مرحله ۲ دقیقه‌ای دویدن، مرحله ۲ دقیقه‌ای استراحت اجرا شد. در هفته اول، موش‌ها ۲ دقیقه با حداکثر سرعت دویدند و بعد از ۲ دقیقه استراحت، در سرعت ۱۵ متر بر دقیقه در تناوب‌های ۲ دقیقه تمرین و ۲ دقیقه استراحت، به مدت ۶۰ دقیقه بر روی تردمیل دویدند. سرعت اجرای تمرین، ۱ متر در دقیقه هر هفته افزایش یافت (۱۶).

تجزیه و تحلیل آزمایشگاهی

هر ۳ گروه پژوهش، در شرایط پایه و پس از ۱۲ تا ۱۴ ساعت ناشتایی (۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرین ورزشی) در شرایط یکسان و استاندارد، با تزریق زیر صفاقی کتامین و زایلوزین (دز کتامین ۸۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن + دز زایلوزین به مقدار ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) بی‌هوش شدند. بافت تومور موش‌ها برداشته و در میکرو تیوب‌های ۰/۵ میلی‌لیتری قرار داده شد و بی‌فاصله در نیتروژن مایع فریز شده و در دمای ۷۰- نگهداری شد. سپس در آزمایشگاه بافت تومور، هموژن شد. با توجه به پروتکل تراپزول ساخت شرکت لایف تکنولوژی کشور آمریکا، مراحل استخراج RNA انجام شد و برای رونویسی RNA به cDNA، طبق دستورالعمل کیت سنتز cDNA، Regent RT PrimerScript تاکارا کشور ژاپن، میزان بیان عوامل مورد نظر سنجیده شد. بر اساس دستورالعمل SYBER-Green شرکت تاکارا کشور ژاپن، مراحل Real Time-PCR انجام شد. از ژن ACT-b به عنوان ژن رفرنس استفاده شد. پرایمرهای استفاده شده در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. توالی پرایمرهای ژن‌ها

نام ژن	آغازگر جلویی	آغازگر برگشتی
uPA	TTGCTCACCACAACGACATT	GGCAGGCAGATGGTCTGTAT
uPAR	GCCCAATCCTGGAGCTTGA	TCCCCTTGAGCTGTAACACT
ACT-b	CTGTGCGAGTCGCGTCCAC	TCATCCATGGCGAACTGGTG

بود، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد (مقدار P آنالیز واریانس یک‌طرفه در جدول ۳، نتایج آزمون توکی در جدول ۴). سطح معناداری ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. تمامی مراحل تجزیه و تحلیل با نرم‌افزار جنکس نسخه ۶/۱ (نرم‌افزار تخصصی تجزیه و تحلیل داده‌های Real Time-PCR) انجام شد.

نتایج

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در گروه T+AE در مقایسه با گروه T، بیان uPA و uPAR، به ترتیب ۲/۰۷ و ۲/۵۵ برابر کاهش (معنادار) یافت (جدول‌های ۳ و ۴،

تجزیه و تحلیل داده‌ها

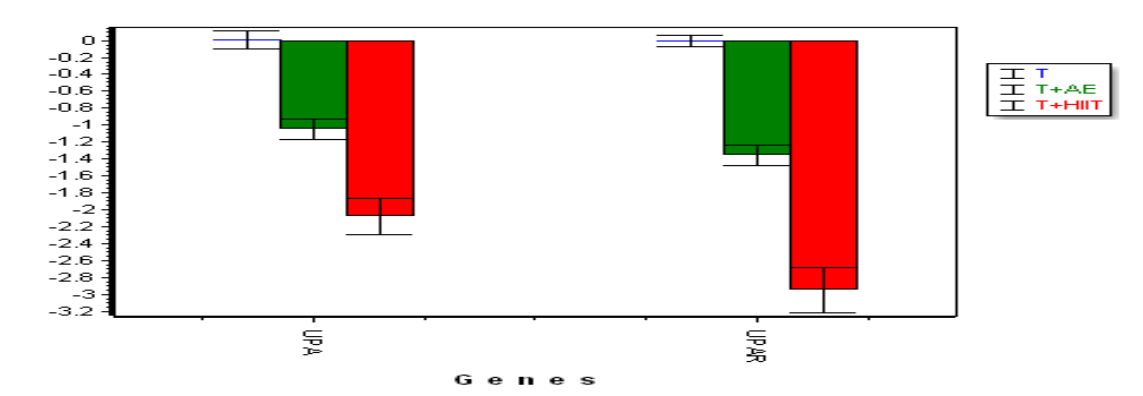
با تفریق CT ژن مربوطه و CT ژن ACT-b (ژن رفرنس)، ΔCT ژن مورد نظر در هر نمونه محاسبه شد و با تفریق ΔCT ‌های به دست آمده و ΔCT گروه تومور، $\Delta\Delta CT$ محاسبه شد. ($\Delta\Delta CT$ گروه تومور صفر می‌شود؛ زیرا گروه کنترل است و با تفریق ΔCT گروه تومور از خودش که گروه کنترل است، صفر حاصل می‌شود)، (نمودار ۱) و (جدول ۲). پس از آن با فرمول ۲ به توان $-\Delta\Delta CT$ ، مقدار Fold Change (با مفهوم چند برابر بیان شدن ژن گروه تجربی نسبت به گروه کنترل) محاسبه شد (جدول ۳) و (نمودار ۲، ۳ و ۴). با توجه به اینکه توزیع داده‌ها طبیعی

نمودارهای ۱ و ۲). در گروه T+HIIT در مقایسه با گروه T+AE، بیان uPA و T، بیان uPA و uPAR، به ترتیب ۴/۲۵ و ۷/۷۴ برابر کاهش (معیار) (جدول‌های ۳ و ۴، نمودارهای ۱ و ۳) و

در گروه T+HIIT در مقایسه با گروه T+AE، بیان uPA و uPAR، به ترتیب ۳/۰۳ و ۲/۰۴ برابر کاهش (معیار) (جدول‌های ۳ و ۴، نمودارهای ۱ و ۳).

جدول ۲. مقادیر میانگین و انحراف استاندارد (CTΔΔ-) متغیرهای پژوهش

uPA	uPAR	
۰/۰۰ ± ۰/۱۲	۰/۰۰ ± ۰/۰۶	تومور (T)
-۱/۰۵ ± ۰/۱۲	-۱/۲۵ ± ۰/۱۱	تومور+هوازی (T+AE)
-۲/۰۸ ± ۰/۲۱	-۲/۹۵ ± ۰/۲۶	تومور+ HIIT (T+HIIT)

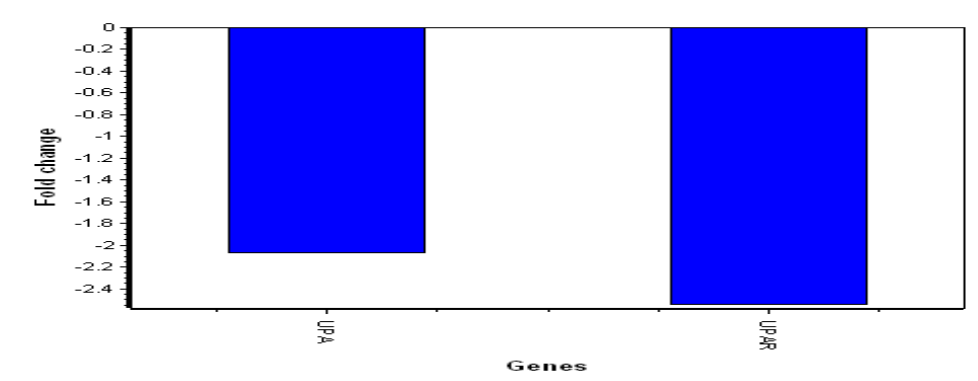


نمودار ۱. مقادیر میانگین و انحراف استاندارد (CTΔΔ-) متغیرهای پژوهش

جدول ۳. نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+هوازی (T+AE) و گروه تومور+تناوبی خیلی شدید (T+HIIT) در مقایسه با گروه تومور (T)، نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+تناوبی خیلی شدید (T+HIIT) در مقایسه با گروه تومور+هوازی (T+AE)، مقدار p و نتیجه تغییرات متغیرهای پژوهش

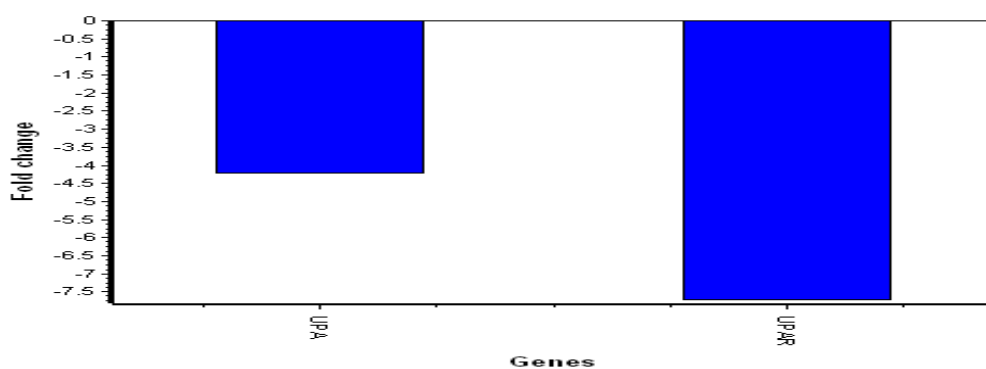
نام ژن	uPAR	uPA
Fold Change گروه تومور+هوازی (T+AE) نسبت به گروه تومور (T)	-۲/۵۵	-۲/۰۷
Fold Change گروه تومور+HIIT (T+HIIT) نسبت به گروه تومور (T)	-۷/۷۴	-۴/۲۵
Fold Change گروه تومور+HIIT (T+HIIT) نسبت به گروه تومور+هوازی (T+AE)	-۲/۰۳	-۲/۰۴
P	*۰/۰۰	*۰/۰۰
نتیجه	اختلاف معنادار	اختلاف معنادار

* نشانگر معنادار بودن اختلاف است. (>P۰/۰۵)

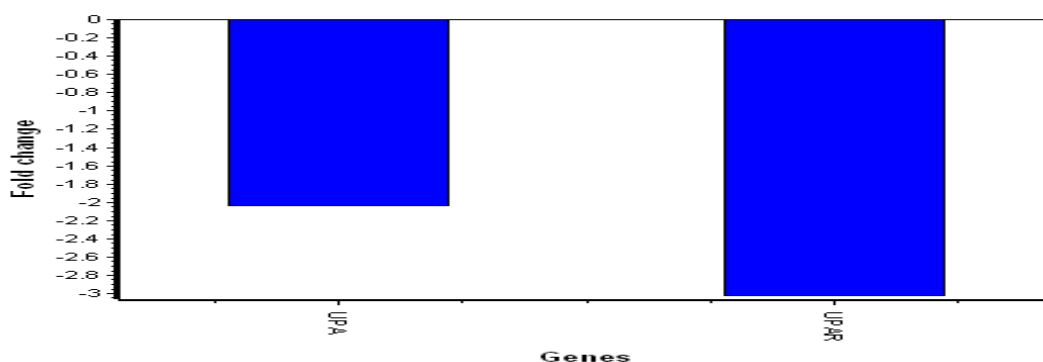


نمودار ۲. نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+هوازی (T+AE) در مقایسه با گروه تومور (T) (Fold Change)

* نشانگر معنادار بودن اختلاف است. (>P۰/۰۵)



نمودار ۳. نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+HIIT (T+HIIT) در مقایسه با گروه تومور (T) (Fold Change)
* نشانگر معنادار بودن اختلاف است. ($P < 0.05$)



نمودار ۴. نسبت بیان متغیرها در گروه تومور+HIIT (T+HIIT) در مقایسه با گروه تومور+هوازی (T+AE) (Fold Change)
* نشانگر معنادار بودن اختلاف است. ($P < 0.05$)

جدول ۴. آزمون توکی ویژه uPA و uPAR در گروه‌های مختلف پژوهش

مقدار P	میانگین اختلاف ($\Delta\Delta CT$)	گروه‌ها
		آزمون توکی ویژه uPA
		تومور (T)
**/00	۱/۰۵	تومور+هوازی (T+AE)
**/00	۲/۰۸	تومور+تناوبی خیلی شدید (T+HIIT)
		آزمون توکی ویژه uPA
		تومور+هوازی (T+AE)
**/00	۱/۰۳	تومور+تناوبی خیلی شدید (T+HIIT)
		آزمون توکی ویژه uPAR
		تومور (T)
**/00	۱/۳۵	تومور+هوازی (T+AE)
**/00	۲/۹۵	تومور+تناوبی خیلی شدید (T+HIIT)
		آزمون توکی ویژه uPAR
		تومور+هوازی (T+AE)
**/00	۱/۶۰	تومور+تناوبی خیلی شدید (T+HIIT)

* نشانگر معنادار بودن اختلاف است. ($P > 0.05$)

بحث

بررسی‌ها نشان می‌دهند که فعالیت ورزشی با افزایش تحمل خستگی و افزایش قدرت عضلانی در بیماران سرطانی، باعث افزایش کیفیت زندگی آنان می‌شود. علاوه بر این، چندین مطالعه اپیدمیولوژیک برجسته نشان می‌دهند تمرین منظم، خطر مرگ ناشی از تشخیص زودهنگام سرطان پستان را ۳۰ تا ۵۰ درصد کاهش می‌دهد. به این ترتیب، روشن شدن سازوکارهای مولکولی که فرایند بیماری را تحت تأثیر قرار می‌دهد، برای بهینه‌سازی ایمنی و کارایی فعالیت ورزشی در کنترل سرطان بسیار مهم است (۱۷). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمرین هوازی، بیان uPA و uPAR را به ترتیب ۲/۰۷ و ۲/۵۵ برابر و تمرین تناوبی شدید بیان uPA و uPAR را به ترتیب ۲/۵ و ۷/۷۴ برابر کاهش می‌دهد. در نتیجه تأثیر تمرین تناوبی شدید نسبت به تمرین هوازی بر کاهش بیان فاکتورهای مورد نظر بیشتر بود.

در ارتباط با تأثیر تمرین ورزشی بر بیان uPA و uPAR در تومور، پژوهشی یافت نشد. اما پژوهش‌هایی تأثیر تمرین‌های ورزشی بر بیان این ژن‌ها را در افراد سالم و افرادی با بیماری افسردگی بررسی کرده‌اند. روحه^۱ و همکارانش، تأثیر ۵ ماه تمرین منظم گروهی با شدت متوسط را بر میزان uPAR پلاسمای خون را بررسی کردند. آزمودنی‌ها ۱۳۳ مرد غیرفعال (در سنین ۲۵ تا ۶۰ سال) بودند که تصادفی در دو گروه کنترل (۵۳ نفر) و گروه تمرین گروهی تحت نظارت (۸۰ نفر) قرار گرفتند. آزمودنی‌های گروه تمرین گروهی، به مدت ۵ ماه، ۲ روز در هفته تمرین گروهی تحت نظارت داشتند. هر جلسه تمرین شامل ۱۵ دقیقه گرم کردن، ۴۰ دقیقه بازی با توپ در زمین و یا فوتبال به همراه چند تمرین قدرتی و ۵ دقیقه سرد کردن پس از آن بود. به علاوه، آزمودنی‌ها دو جلسه، هر جلسه دو ساعت در هفته، سخنرانی‌های گروهی شامل موضوعاتی مانند آسیب‌نداشتن فعالیت بدنی، تعیین اهداف

و تهیه برنامه فعالیت بدنی داشتند. پس از بررسی داده‌ها، هیچ تغییری در مقادیر uPAR پس از فعالیت بدنی منظم در مقایسه با گروه کنترل دیده نشد (۱۸). دوئجوارد^۲ و همکارانش، تأثیر یک جلسه تمرین با شدت حداکثر توان را بر میزان آنتی‌ژن u-PA پلاسمای خون را بررسی کرده‌اند. آزمودنی‌ها شش مرد داوطلب سالم (۲۱ تا ۲۵ سال) بودند که ابتدا از آنها خواسته شد به مدت ۲ ساعت به پشت بخوابند. سپس نمونه‌گیری انجام شد. نمونه دیگری از این آزمودنی‌ها بعد از ۱۲ دقیقه فعالیت با شدت حداکثر توان روی چرخ کارسنج گرفته شد. همچنین، هنگام تمرین، میزان تغییرات آنتی‌ژن u-PA بررسی شده و افزایش آنتی‌ژن u-PA در هنگام تمرین در هر شش آزمودنی دیده شده است؛ در حالی که در شرایط استراحت، این پارامتر تغییری نداشته است. میانگین آنتی‌ژن u-PA از $4/2 \pm 1/0$ نانوگرم در میلی‌لیتر قبل از ورزش به $9/8 \pm 3/0$ نانوگرم در میلی‌لیتر افزایش یافته، افزایشی که معنادار بوده است. پس از قطع تمرین‌ها، میزان u-PA، پس از ۵ دقیقه استراحت تقریباً ۵۰ درصد در خون آزمودنی‌ها کاهش یافت (۱۹). گوستافسون^۳ و همکارانش، تأثیر یک جلسه تمرین هوازی فزاینده تا خستگی را بر میزان uPAR پلاسمای خون، در بیماران مبتلا به اختلال افسردگی مزمن را با آزمودنی‌های سالم مقایسه کرده‌اند. ۱۷ بیمار مبتلا به اختلال افسردگی مزمن در گروه تمرین فزاینده و ۱۷ فرد سالم در گروه کنترل قرار گرفتند uPAR. پلاسمایی قبل، هنگام و بعد از تمرین مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته‌اند. مقادیر پایه uPAR پلاسمایی در بیماران مبتلا به اختلال افسردگی مزمن در مقایسه با گروه کنترل سالم قبل از فعالیت، تا حد زیادی بیشتر بوده که احتمالاً دلیل آن افزایش التهاب در بدن بر اثر عوارض بیماری بوده است. میزان uPAR پلاسمایی پس از تمرین، در هر دو گروه در مقایسه با قبل از تمرین، افزایش داشت اما تغییرات دینامیکی uPAR پلاسمایی در هنگام تمرین در بیماران

² Dooijewaard³ Gustafsson¹ Rohde

که بیان $TGF-\beta$ را القا و فعال می‌کند، که به نوبه خود بیان uPA را القا می‌کند و بنابراین حلقه بازخورد مثبتی را تشکیل می‌دهد (۲۴). فعالیت ورزشی، تأثیر مستقیمی از راه توزیع مجدد برون‌ده قلبی، بر فیزیولوژی تومور دارد. هنگام فعالیت ورزشی، جریان خون به عضلات اسکلتی فعال در پاسخ به پیام‌های موضعی عروق و به منظور رفع نیازهای متابولسمی، به میزان بارزی افزایش و از بیشتر اندام‌های احشایی و عضلات غیرفعال از طریق انقباض عروقی، کاهش می‌یابد. برخلاف تصور، پژوهشی در موش‌های مبتلا به سرطان پروستات نشان داده است جریان خون تومور در زمان تمرین، حدود ۲۰۰ درصد در مقایسه با گروه غیرفعال افزایش می‌یابد و به کاهش ۵۰ درصد هیپوکسی در عروق تومور منجر می‌شود که ممکن است این رخداد، به علت کاهش هم‌زمان گیرنده‌های مربوط به انقباض عروق (مخصوصاً کاهش گیرنده آلفا آدرنژیک) و کاهش تون میوژنیک (تون حاصل از فشار بالای داخل رگ) رخ دهد (۲۵). از آنجایی که تمرین هوازی و تمرین تناوبی خیلی شدید، احتمالاً تأثیر متفاوتی بر جریان خون تومور و شرایط هیپوکسی تومور دارد، مقایسه تأثیر این دو نوع تمرین بر بیان uPAR و uPA در بافت تومور، اطلاعات ارزشمندی در راستای شناسایی بهترین نوع تمرین برای بیماران مبتلا به سرطان پستان، خواهد داد. در پژوهش حاضر، گروه تمرین تناوبی خیلی شدید باعث کاهش چندبرابری بیان uPA و uPAR نسبت به گروه تمرین هوازی شد. در نتیجه احتمالاً شدت تمرین HIIT به گونه‌ای بوده است که نسبت به تمرین هوازی، باعث افزایش بیشتر جریان خون تومور و در نتیجه کاهش هیپوکسی در عروق تومور و کاهش چندبرابری بیان uPA و uPAR شده است.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج پژوهش، تمرین هوازی و تمرین تناوبی خیلی شدید با کاهش بیان uPA و uPAR، احتمالاً می‌تواند روند تکثیر سلول‌های توموری (با توجه به اهمیت

مبتلا به افسردگی مزمن در مقایسه با گروه کنترل در حد بارزی کمتر بوده است. این پژوهشگران نتیجه‌گیری کرده‌اند احتمالاً افزایش میزان uPAR تحت تأثیر تمرین ورزشی کوتاه‌مدت، به دلیل آزاد شدن از نوتروفیل‌های فعال بوده است (۲۰). در پژوهش حاضر، پس از ۶ هفته تمرین هوازی و تمرین تناوبی خیلی شدید، بیان uPA و uPAR، کاهش معناداری داشت. نتایج پژوهش حاضر با پژوهش‌های بالا، به علت تفاوت اساسی در جریان خون و عروق بافت تومور نسبت به بافت سالم و همچنین تفاوت در نوع تمرینات ورزشی، قابل قیاس نیست. تمرینات ورزشی با کاهش هیپوکسی توده تومور اولیه و تأثیر مستقیم بر عوامل داخلی تومور (سرعت رشد، متاستاز، متابولیسم تومور و ایمنی‌زایی تومور)، در کنترل پیشرفت تومور مؤثر بوده و ارتباط بین تومور اولیه و سایت‌های متاستاز دور را کاهش می‌دهد (۲۱). یوون^۱ و همکارانش در پژوهشی نشان دادند که در شرایط هیپوکسی تومور، بیان uPAR در بافت تومور پستان افزایش می‌یابد (۲۲). هیپوکسی و فعال شدن $HIF-1\alpha$ ، بیان uPAR را افزایش می‌دهند. درحالی‌که مهار بیان $HIF-1\alpha$ ، میزان mRNA و پروتئین uPAR را کاهش می‌دهد. از نظر مکانیکی، مهار uPAR به مهار مسیر پیام‌رسانی $PI3K$ ^۲ / $AKT/mTOR$ / $HIF1\alpha$ منجر شده و باعث اختلال در جذب گلوکز، کاهش پیرووات کیناز (PKM2) و سایر آنزیم‌های گلیکولیزی، می‌شود. در نتیجه، متابولیسم سلول‌های سرطانی را کنترل می‌کند (۲۳). همچنین، پژوهش‌ها نشان می‌دهند که با افزایش هیپوکسی، $TGF-\beta$ افزایش می‌یابد که از راه تخریب پروتئولیزی ECM و تنظیم بیان چند ژن MMPs و uPA/uPAR در سلول‌های سرطانی، به متاستاز تومور کمک می‌کند. با افزایش بیان و تعامل uPA با uPAR، توسط $TGF-\beta$ ، شبکه‌ای از مسیرهای پیام‌رسانی به هم پیوسته فعال می‌شود

¹ Yoon

² Phosphoinositide 3-kinase

³ mammalian target of rapamycin complex

اثر، فاکتورها و دیگر عوامل درگیر در فرایند تکثیر سلول تومور بررسی شود.

ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر با کد اخلاق کمیته اخلاق پژوهشگاه علوم ورزشی به شماره IR/ssri.rec.2022.13082.1902 رعایت شد.

تعارض و منافع

نویسندگان مقاله اعلام می دارند که هیچ گونه تضادی در منافع وجود ندارد.

بیان uPA و uPAR در فرایندهای چسبندگی، تکثیر سلولی، گلیکولیز و آنژیوژنز) و متاستاز سلولهای تومور را مختل کند. در نتیجه احتمالاً، می توان تمرین ورزشی هوازی و تناوبی خیلی شدید را به عنوان راهکاری در کاهش رشد تومور در سرطان پستان پیشنهاد داد. اما چون پژوهشی که تأثیر تمرینات ورزشی را بر بیان گیرنده فعال کننده پلاسمینوژن از نوع یوروکیناز (شامل uPA) و گیرنده اش (uPAR))، بررسی کرده باشد یافت نشد؛ بنابراین پیشنهاد می شود در پژوهش های آتی، برای روشن شدن مکانیسم

منابع

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA: a Cancer Journal for Clinicians 2021;71(3):209-49.
- Sharma GN1, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. Various types and management of breast cancer: an overview. J Adv Pharm Technol Res. 2010;1(2):109-26.
- Lv T, Zhao Y, Jiang X, Yuan H, Wang H, Cui X, et al. uPAR: An Essential Factor for Tumor Development. Journal of Cancer 2021;12(23):7026-40.
- Masucci MT, Minopoli M, Carluccio GD, Carluccio ML, Carriero MV. Therapeutic Strategies Targeting Urokinase and Its Receptor in Cancer. Cancers 2022;14(3):498.
- Vassalli JD, Baccino D, Belin D. A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. J Cell Biol. 1985;100:86-92.
- Ismail AA, Shaker BT, Bajou K. The Plasminogen-Activator Plasmin System in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis. International Journal of Molecular Sciences 2021;23(1).
- Gogineni VR, Nalla AK, Gupta R, Dinh DH, Klopfenstein JD, Rao JS. Chk2-mediated G2/M cell cycle arrest maintains radiation resistance in malignant meningioma cells. Cancer Lett 2011; 313: 64-75.
- Mekkawy AH, Pourgholami MH, Morris DL. Involvement of urokinase-type plasminogen activator system in cancer: an overview. Medicinal Research Reviews 2014;34(5):918-56.
- Gao X, Guo Q, Wang S, Gao C, Chen J, Zhang L, et al. Silencing of uPAR via RNA interference inhibits invasion and migration of oral tongue squamous cell carcinoma. Oncol Lett 2018; 16: 3983-91.
- D'Alessio S, Blasi F. The urokinase receptor as an entertainer of signal transduction. Front Biosci (Landmark Ed). 2009; 14: 4575-87.
- Santibanez JF, Obradović H, Kukulj T, Krstić J. Transforming growth factor- β , matrix metalloproteinases, and urokinase-type plasminogen activator interaction in the cancer epithelial to mesenchymal transition. Dev Dyn. 2018; 247: 382-95.
- Masi I, Caprara V, Bagnato A, Rosanò L. Tumor Cellular and Microenvironmental Cues Controlling Invadopodia Formation. Front Cell Dev Biol. 2020; 8: 584181.
- Herkenne S, Paques C, Nivelles O, Lion M, Bajou K, Pollenus T, et al. The interaction of uPAR with VEGFR2 promotes VEGF-induced angiogenesis. Sci Signal. 2015; 8: ra117.
- Hojman P, Gehl J, Christensen JF, Pedersen BK. Molecular Mechanisms Linking Exercise to Cancer Prevention and Treatment. Cell Metabolism 2018;27(1):10-21.
- Amani-Shalamzari S, Agha-Alinejad H, Alizadeh S, et al. The effect of exercise training on the level of tissue IL-6 and vascular endothelial growth factor in breast cancer bearing mice. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 2014; 17(4):231-6.
- Schebeleski-Soares C, Occhi-Soares RC, Franzoi-de-Moraes SM, et al. Preinfection aerobic treadmill training improves resistance against Trypanosoma cruzi infection in mice. Appl Physiol Nutr Metab. 2009;34(4):659-665.
- Marcinko KA, Sikkema SA, Samaan CO, et al. High intensity interval training improves liver and adipose tissue insulin sensitivity. Molecular Metabolism 2015;4(12):903-915.
- Jones LW, Viglianti BL, Tashjian JA, et al. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. J Appl Physiol. 2010;108(2):343-348.

19. Rohde C, Polcwiartek C, Andersen E, Vang T, Nielsen J. Effect of a physical activity intervention on suPAR levels: A randomized controlled trial. *Journal of Science and Medicine in Sport* 2018;21(3):286-90.
20. Dooijewaard G, de Boer A, Turion PN, Cohen AF, Breimer DD, Kluft C. Physical exercise induces enhancement of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) levels in plasma. *Thrombosis and Haemostasis* 1991;65(1):82-6.
21. Gustafsson A, Ventorp F, Wisen AG, Ohlsson L, Ljunggren L, Westrin A. Effects of Acute Exercise on Circulating Soluble Form of the Urokinase Receptor in Patients With Major Depressive Disorder. *Biomarker Insights* 2017;12:1177271917704193.
22. Koelwyn GJ, Quail DF, Zhang X, White RM, Jones LW. Exercise-dependent regulation of the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(10):620-32.
23. Yoon SY, Lee YJ, Seo JH, Sung HJ, Park KH, Choi IK, Kim SJ, Oh SC, Choi CW, Kim BS, et al. uPAR expression under hypoxic conditions depends on iNOS modulated ERK phosphorylation in the MDA-MB-231 breast carcinoma cell line. *Cell Res*. 2006; 16(10):75-81.
24. Chen J, Ding ZY, Li S, Liu S, Xiao C, Li Z, et al. Targeting transforming growth factor- β signaling for enhanced cancer chemotherapy. *Theranostics* 2021; 11: 1345-63.
25. Koelwyn GJ, Quail DF, Zhang X, White RM, Jones LW. Exercise-dependent regulation of the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(10):620-32.