

AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO
WE WROCŁAWIU

Aneta Monika Łomnicka

WPLÝW WYSIŁKU FIZYCZNEGO NA UKŁAD
IMMUNOLOGICZNY PODCZAS KARCINOGENEZY
WYWOŁANEJ N-METYLO-N-NITROZOMOCZNIKIEM
U SZCZURÓW

Autoreferat pracy doktorskiej
wykonanej w Zakładzie Fizjoterapii w Medycynie Zabiegowej i Onkologii,
Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu.

Promotor:

Dr hab. Iwona Malicka, prof. AWF

Recenzenci:

Dr hab. Urszula Czerniak, prof. AWF

Dr hab. Aneta Teległów, prof. AWF

Dr hab. n med. Katarzyna Hojan

WROCŁAW 2022

I WSTĘP

Na przestrzeni XX wieku zmianie uległ styl życia, wraz ze wzrostem tempa życia o 80% zmniejszył się udział mięśni podczas wykonywania czynności dnia codziennego (Woźniewski, 2002). Nowoczesne kobiety często charakteryzuje niska aktywność fizyczna, wysoki poziom stresu, nieprawidłowe odżywianie, palenie papierosów, spożywanie alkoholu, późne macierzyństwo lub bezdzietność. Zarazem czynniki te wymienia się jako znaczące w ryzyku zachorowania na raka piersi: blisko 95% wszystkich przypadków raka piersi związanych jest z czynnikami stylu życia (Janssens i Vandeloo, 2009 ; Jassem i wsp., 2018).

Rak piersi, zarówno na świecie, jak i w Polsce, jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet, stanowiąc obecnie jeden z największych problemów epidemiologicznych. Rocznie na świecie diagnozuje się ponad 1,5 mln nowych przypadków, przy czym najwyższy wskaźnik zachorowalności obserwuje się w krajach o wysokim stopniu rozwoju ekonomicznego (Momenimovahed i Salehiniya, 2019). Polska należy do krajów o średniej zachorowalności na raka piersi, rejestruje się jednak tendencję wzrostową. Na podstawie szacunkowych badań przeprowadzonych przez WHO na świecie w 2025 roku ilość nowych zachorowań na raka piersi wyniesie 2 500 682 osób, a w roku 2040 liczba zachorowań przekroczy 3 mln. (World Health Organization, online).

Priorytetem dla wszystkich kobiet powinno być wprowadzenie do codziennego życia zaleceń dotyczących profilaktyki I, II i III fazy. Zadaniem profilaktyki pierwszej fazy (pierwotnej) jest redukcja zachorowalności na raka piersi, którą można osiągnąć dzięki zmianie lub / i wykluczeniu czynników ryzyka. Celem prewencji drugiej fazy jest wczesne zdiagnozowanie zmiany nowotworowej i jak najszybsze zastosowanie leczenia oszczędzającego, co skutkuje zmniejszeniem umieralności wśród kobiet chorych, redukcją niebezpieczeństwa powstania przerzutów lub nawrotu choroby. Profilaktyka trzeciej fazy skupia się na redukcji zaburzeń czynnościowych i powikłań wynikających z choroby oraz zapobieganie nawrotom.

Aktywność fizyczna należy do głównych elementów zdrowego stylu życia i odgrywa istotną rolę w promocji zdrowia, utrzymana na odpowiednim poziomie działa prewencyjnie,

zmniejszając ryzyko rozwoju chorób cywilizacyjnych, w tym nowotworów złośliwych. Jej brak uznawany jest za przyczynę utraty zdrowia (Cleland i wsp., 2013). Analizując aktywność fizyczną w kontekście chorób nowotworowych, należy podkreślić jej znaczenie, zarówno w profilaktyce pierwotnej, jak i wtórnej. American Cancer Society opracowało wytyczne dotyczące poziomu aktywności fizycznej w profilaktyce chorób nowotworowych, proponując 150 minut tygodniowo wysiłku umiarkowanego lub 75 minut wysiłku intensywnego (Kushi i wsp., 2012). McTiernan i wsp. zaobserwowali zmniejszone o 14% ryzyko zachorowania na raka piersi dla kobiet, które w wieku 35 lat, 3 razy w tygodniu podejmowały intensywny wysiłek fizyczny (McTiernan i wsp., 2003). Korzyści płynące z podejmowanej aktywności fizycznej obserwuje się także w profilaktyce wtórnej, zarówno u kobiet będących w trakcie leczenia, jak i po jego zakończeniu. W odpowiedzi na leczenie onkologiczne pojawia się bowiem tzw. syndrom bezczynności. Np. u kobiet po zabiegu chirurgicznym z powodu raka piersi obserwuje się obniżenie całkowitej aktywności fizycznej w granicach 11%, a więc w przybliżeniu o 2 godziny tygodniowo w stosunku do okresu przed chorobą, a po dodatkowej radioterapii i/lub chemioterapii nawet o 50% (Fialka-Moser i wsp., 2003; Winters-Stone i wsp., 2008). Regularne podejmowanie aktywności fizycznej stanowi zatem jeden z ważniejszych czynników powrotu do sprawności psychofizycznej. Wpływ aktywności fizycznej na organizm człowieka jest bezdyskusyjny, aczkolwiek na tyle wielokierunkowy, że niemożliwe staje się wyodrębnienie pojedynczych czynników w przenikających się procesach. Dowiedziono, że stężenie cytokin prozapalnych: CRP, TNF- α , IL-6 zmniejsza się w organizmie pod wpływem umiarkowanej aktywności fizycznej (Litwiniuk i Kara, 2012), co w efekcie prowadzi do wzrostu stężenia cytokiny: adiponektyny. Korzystnym skutkiem aktywności fizycznej prowadzącym do obniżenia ryzyka zachorowania na raka piersi jest zmniejszenie stężenia hormonów płciowych oraz podwyższenie stężenia globuliny SHBG (sex hormon binding globulin) (Key i wsp., 2002), co może prawdopodobnie spowodować zmniejszenie stężenia testosteronu. Niejednoznaczne są jednak doniesienia na ten temat (Kaaks i wsp., 2005). Aktywność fizyczna wpływa na masę ciała (Malczyk i Majkrzak, 2014). Może zredukować otyłość, której następstwem są zaburzenia metaboliczne. Z kolei wrażliwość tkanek na działanie insuliny, może zwiększyć się dzięki aktywności fizycznej redukując przy tym prawdopodobieństwo wystąpienia cukrzycy typu 2 (Vona-Davis i wsp., 2007).

Aktywność fizyczna uruchamia takie procesy jak: redukcja tkanki tłuszczowej, zwiększenie masy mięśniowej, transport glukozy do mięśni co stanowi ochronę przed hiperinsulinemią i insulinoopornością, które powiązane są ze zbyt dużą produkcją leptyny IL-6, TNF- α i z obniżeniem stężenia adiponektyny (Vona–Davis i wsp., 2007).

Na wieloetapowy proces powstania nowotworów mają wpływ czynniki rakotwórcze, do których zalicza się czynniki: fizyczne, chemiczne i biologiczne. Oddziałują one na organizm człowieka, jednak w większości przypadków bezpośrednio nie generują rozwoju nowotworu lecz powodują utworzenie endogennych czynników pośrednich (najczęściej to: reaktywne formy tlenu i utlenowane przez nie związki). Wymienione wyżej endogenne czynniki pośrednie mogą doprowadzić do uszkodzenia kwasu deoksyrybonukleinowego i mogą zainicjować mutacje punktowe i chromosomowe. Jeżeli mutacje dotyczą komórek macierzystych w danej tkance i nie zostaną te mutacje naprawione mogą w efekcie spowodować transformację nowotworową komórki, a następnie utworzenie nowotworu (Gołąb i wsp., 2012). Układ odpornościowy sprawuje ciągły nadzór nad organizmem człowieka. Według teorii „nadzoru immunologicznego” Thomasa i Burnetta układ immunologiczny natychmiast lokalizuje i unicestwia komórki nowotworowe. Jednak mimo stałej kontroli organizmu może dojść do ucieczki komórek nowotworowych (Mackiewicz i Mackiewicz, 2010). W sytuacji kiedy nowotwór ominął układ obronnościowy to następuje etap, w którym nowotwór stara się utrzymać i bronić przed zwiększającym się działaniem układu odpornościowego – jest to faza równowagi. Faza równowagi jest to faza podkliczna, która charakteryzuje się długoletnim przebiegiem. Duża liczba mutacji i niestabilność genetyczna broni komórki nowotworowe przed atakiem prowadzonym przez limfocyty i wydzielanym przez nie interferonem gamma. W kolejnym etapie może dojść do fazy zwanej ucieczką, która charakteryzuje się dynamicznym rozwojem i rozrostem nowotworu. Faza ta może być następstwem zablokowania i wyczerpania układu odpornościowego, a także spadkiem wrażliwości komórek nowotworowych na interferon gamma oraz pomniejszeniem aktywności komórek MHC klasy I (Dunn i wsp., 2002; Dunn i wsp., 2006). III etap może jednak nie nastąpić, stan równowagi może się utrzymać nie powodując przerzutów, układ immunologiczny może działać nawet niszcząco na komórki nowotworowe (Gołąb i wsp., 2017).

Aktywacja procesów odpornościowych następuje dzięki regularnie podejmowanej aktywności fizycznej, która zwiększa działanie układu immunologicznego (Woźniewski, 2002). Należy pamiętać, że aktywność fizyczna ma wielokierunkowy wpływ na mechanizmy odpowiedzi immunologicznej. Umiarkowany wysiłek fizyczny podejmowany regularnie stymuluje mechanizmy odpornościowe, a powtarzany intensywny wysiłek może prowadzić do zwiększonej podatności na infekcje (Kurowski i Kowalski, 2014). Aktywność fizyczna generuje uwolnienie kortyzolu i katecholamin, co w następstwie prowadzi do wzrostu liczby niektórych komórek układu immunologicznego oraz zmian w układzie humoralnym. Liczba komórek NK i cytotoksycznych limfocytów T może znacznie zwiększyć swoją liczbę po wysiłku fizycznym, w przypadku komórek NK (natural killer) wzrost ten może wynosić 150 – 300%, a w przypadku limfocytów T 50–100% (Nieman, 1994). Wyżej wymienione komórki NK i T to limfocyty tworzące główną i pierwszą ochronę przed patogenami oraz własnymi komórkami, które uległy transformacji nowotworowej.

Badania nad wpływem aktywności fizycznej na raka piersi prowadzone są nie tylko w formie epidemiologicznych badań ankietowych, ale także w formie eksperymentalnej. Te drugie, czyli eksperymentalne, wynikają przede wszystkim z ograniczonych możliwości prowadzenia badań w populacji ludzkiej i są wykonywane głównie na modelach zwierzęcych. Wykorzystuje się takie zwierzęta jak: szczury, myszy, świnie domowe, psy, kury. Jednak szczur i mysz stanowią podstawowy model doświadczalny w zwierzęcym modelu badania guza piersi. Zwierzęta te wykorzystywane są z powodu prostej i łatwej w utrzymaniu hodowli, szybkiego tempa rozrodu, a także dobrej znajomości ich genomu zwierzęcego (Brylińska i Kwiatkowska, 1996). Badania te mają bardzo duży potencjał. Ich rolą jest umożliwienie lepszego poznania oraz zrozumienia jaki rodzaj wysiłku fizycznego wpływa na proces nowotworzenia, co w przyszłości pozwoli na przełożenie wyników badań na ludzką populację. Kolejnym ich zadaniem jest poznanie mechanizmów działania związanych z protekcyjną rolą aktywności fizycznej. Szczury szczepu Sprague-Dawley oraz myszy posiadają najbardziej zbliżoną do gruczołów ludzkich strukturę i funkcję (Cardiff i Wellings, 1999), a także podobieństwo na poziomie 58% między białkiem BRCA1 myszy a człowieka (Hakem i wsp., 1996). U ludzi podstawowa jednostka gruczołu

piersiowego nazywana jest jednostką przewodowozrazikową (TDLU- terminal duct lobular unit). Struktura ta zbudowana jest z końcowego przewodu zewnątrz zrazikowego oraz przewodu śródzrazikowego i uchodzących do niego pęcherzyków wydaliniczych (Niemiec i Ryś, 2009). U gryzoni, strukturą wykazującą podobieństwo zarówno we wzroście, rozwoju i patologii jest TEBs (terminal end buds). Struktura TDLU i TEBs są bardzo podatne na działanie rakotwórczych czynników, co pozwala na przeprowadzania badań porównujących proces karcinogenezy i rozwoju nowotworu u ludzi i gryzoni (Wang i wsp., 2009). Najczęściej stosowanym w badaniach środkiem wywołującym proces karcinogenezy jest N- metylo N-nitrozomocznik (MNU) (Ko i wsp., 2008). Badania Zongjian i wsp. wykazały u samic szczurów rasy Sprague-Dawley i podaniu nitrozomocznika o 13% mniej przypadków zachorowania na raka listwy mlecznej w grupie trenującej, poddanej dobrowolnej aktywności na bieżni ruchomej, w porównaniu z grupą nietrenującą (kontrolną). Dodatkowo w grupie poddanej treningowi fizycznemu średnia masa guza przypadająca na 1 osobnika była mniejsza aniżeli w grupie kontrolnej (Zongjian i wsp., 2008). Podobne wyniki zostały uzyskane przez Malicką i wsp. u szczurów rasy Sprague-Dawley i podaniu nitrozomocznika w grupie szczurów poddanych treningowi fizycznemu na bieżni ruchomej wystąpiły tylko pojedyncze guzy u mniejszej liczby zwierząt (40%) w porównaniu do grupy kontrolnej, w której wykazano zarówno większą sumaryczną liczbę guzów(64%), jak i większą ich liczbę przypadającą na jednego osobnika (od 2 do 7) (Malicka i wsp. 2015). Na uwagę zasługuje również czas i intensywność trwania wysiłku fizycznego. W 1991 roku Cohen wykazał, że zarówno zbyt niska jak i zbyt wysoka intensywność treningu fizycznego może wpłynąć na rozwój raka listwy mlecznej, a protekcyjne działanie ma jedynie wysiłek o umiarkowanej intensywności (Cohen i wsp., 1991). W 1994 roku Thompson zaobserwował z kolei, że ochronne działanie aktywności fizycznej przeciwko rakowi listwy mlecznej odnosi się przede wszystkim do wyższej intensywności treningu fizycznego oraz dłuższego czasu jego trwania (Thompson, 1994). Wyniki te nie są jednak jednoznaczne. Whittal–Strange i wsp. stwierdzili, że z kolei zbyt intensywny wysiłek fizyczny znacząco zwiększa masę guza (Whittal-Strange i wsp., 1998), a Westerlind i wsp. przy umiarkowanym wysiłku fizycznym nie zauważyli protekcyjnego działania aktywności fizycznej (Westerlind i wsp., 2003). Saez i wsp. wykazali natomiast, że zbyt intensywne ćwiczenia wiązać się mogą ze wzrostem wydzielania hormonów stresu

(prolaktyna i adrenalina), co z kolei zwiększa ryzyko rozwoju raka listwy mleczej (Saez i wsp., 2007). Nieznany pozostaje także mechanizm działania wysiłku fizycznego, przypuszcza się między innymi, że jednym z mechanizmów działania może być wpływ treningu fizycznego na układ immunologiczny i jego rolę w powstawaniu i rozwoju raka listwy mleczej u szczurów.

II CEL PRACY

Celem pracy była ocena wpływu wysiłku fizycznego na układ immunologiczny oraz powstanie i rozwój raka listwy mleczej wywołanego N-metylo-N-nitrozomocznikiem u szczurów.

II 1. Pytania badawcze

1. Czy trening fizyczny wpływa na ryzyko zachorowania i przebieg raka listwy mleczej u szczurów, oceniane poprzez liczbę i objętość wyindukowanych guzów oraz jego proliferację i apoptozę?
2. Czy czas indukcji guza jest uzależniony od podejmowania treningu fizycznego i jego intensywności?
3. Czy trening fizyczny oraz poziom jego intensywności wpływa na układ immunologiczny badanych szczurów?
4. Czy występują zależności pomiędzy indukcją guza, jego objętością, proliferacją i aktywnością apoptotyczną komórek nowotworowych a poziomem subpopulacji limfocytów ?
5. Czy występują różnice pomiędzy modelami (prewencja pierwotna vs prewencja wtórna) w zakresie liczby wyindukowanych guzów, ich objętością, proliferacją, aktywnością apoptotyczną komórek nowotworowych i poziomem subpopulacji limfocytów w odniesieniu do poziomu treningu fizycznego.

II 2. Hipotezy badawcze

1. Trening fizyczny działa protekcyjnie zarówno na rozwój, jak i przebieg raka listwy mleczej.
2. Mechanizmem wpływającym na rozwój i przebieg raka listwy mleczej jest poziom proliferacji, aktywność apoptotyczna komórek nowotworowych i poziom subpopulacji limfocytów zmieniające się pod wpływem treningu fizycznego.

III MATERIAŁ BADAWCZY I METODY

III 1. Zwierzęta – charakterystyka materiału badawczego

Materiał badany stanowiło 105 samic szczurów rasy Sprague–Dawley (Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice, Polska).

Zwierzęta zostały podzielone na 2 modele:

- Model 1 – model prewencji pierwotnej (50 szczurów)
- Model 2 – model prewencji wtórnej (55 szczurów)

Powyższe modele zostały podzielone na 4 grupy, wyodrębniono 3 poziomy intensywności treningu fizycznego oraz grupę kontrolną.

- NPI– grupa z niskim poziomem intensywności treningu
- UPI - grupa z umiarkowanym poziomem intensywności treningu
- WPI - grupa z wysokim poziomem intensywności treningu
- GK – grupa kontrolna

Badania przeprowadzono w ośrodku badawczym dla zwierząt (Zakład Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu). Wszystkim zapewniono stałość warunków zewnętrznych (stała temperatura i wilgotność pomieszczenia oraz 12 godzinny tryb dzień/noc). Wszystkie szczury były żywione oraz posiadały dostęp do wody (ad libidum).

Procedury zostały przeprowadzone zgodnie ze standardami Unii Europejskiej. Uzyskano zgodę na przeprowadzenie badań od I Lokalnej Komisji Etycznej Ludwika Hirszfelda ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu (numer 37/2010).

Kryteria włączenia:

- szczury- samice rasy Sprague-Dawley z jednego ośrodka badawczego (Śląski Uniwersytet Medyczny, Katowice, Polska), w wieku 1 miesiąca
- podanie nitrozomocznika w dawce 180 mg/kg masy ciała.
- dla grup badanych: udział w treningu fizycznym - minimum 6 z 8 zaplanowanych tygodni treningu podstawowego oraz udział w 4 tygodniowym treningu do odmowy

Kryteria wyłączenia:

- odmowa treningu fizycznego – udział w treningu fizycznym poniżej 6 z 8 zaplanowanych tygodni treningu podstawowego

Przebieg treningu oraz ewentualna śmiertelność szczurów były ściśle monitorowane i zapisywane w dzienniku.

Ostateczna liczba szczurów poddana analizie różni się od zakładanej liczebności wyjściowej. Ze względu na wcześniejszą śmiertelność niektórych osobników bądź odmowę udziału w treningu fizycznym analiza w modelu 1 opiera się na 43 osobnikach, a w modelu 2 na 32 osobnikach. Szczegółową liczebność grup w odniesieniu do poziomu intensywności treningu fizycznego przedstawiono w tabeli 1.

Do grup badanych zostały włączone szczury, które podjęły trening przez przynajmniej 6 z 8 zaplanowanych tygodni treningu podstawowego i kolejne 4 tygodnie treningu do odmowy. Wyłączono z grup badanych szczury, których trening fizyczny odbiegał od przyjętych podstawowych założeń. Czyli wszystkie gryzonie, które brały udział w treningu fizycznym mniej niż 6 tygodni z treningu podstawowego.

Do najczęstszych przyczyn przerwania treningu fizycznego należało zranienie łapy, w dwóch przypadkach odmowa nastąpiła bez wyraźnej przyczyny. Pierwsze odmowy obserwowano w 4 tygodniu od rozpoczęcia stosowania treningu fizycznego.

Śmiertelność badanych szczurów obserwowano w różnych etapach prowadzonego eksperymentu, zarówno w grupach badanych jak i kontrolnych. W modelu prewencji

wtórnej zaobserwowano większą śmiertelność osobników, niż w modelu prewencji pierwotnej. Prawdopodobnie wynika to z czasu prowadzonego eksperymentu. W modelu 1 zwierzęta zostały poddane eutanazji po upływie 12 tygodni od podania MNU, natomiast w modelu 2, 24 tygodnie od podania MNU.

W związku z powyższym różnica w liczebności szczurów w poszczególnych grupach o różnych poziomach intensywności oraz w badanych modelach wynika przede wszystkim z odmowy i wyższej śmiertelności, czego nie przewidziano na etapie planowania eksperymentu.

Tab.1. Liczebności grup poddanych treningowi fizycznemu w zależności od modelu.

Grupa	GK	NPI	UPI	WPI	Łącznie
Model 1	14	12	10	7	43
Model 2	8	9	9	6	32
Razem	22	21	19	13	75

Badane szczury nie różniły się istotnie pod względem masy ciała, zarówno początkowej, jak i końcowej oraz ilości podanego MNU, niezależnie od badanego modelu. Szczegółowe wyniki w odniesieniu do 2 grup (grupa trenująca vs grupa kontrolna) przedstawiono w tabeli 2, natomiast w odniesieniu do poziomu intensywności treningu fizycznego w tabeli 3.

Tab.2. Porównanie średniej masy oraz dawki MNU podanej szczurom w grupach doświadczalnych.

Model	Cecha	GRUPA	N	Średnia	Mediana	Odch.std	p (test Manna-Whitneya)
Model 1	Masa (MNU) [g]	Trenująca	29	110,07	120,0	27,69	0,632
		Nietrenująca	14	105,50	105,5	11,12	
	MNU (ilość) [mg/kg]	Trenująca	29	2,01	2,2	0,45	0,574
		Nietrenująca	14	1,91	1,9	0,21	
	Masa (sekcja) [g]	Trenująca	29	287,24	290,0	22,41	0,897
		Nietrenująca	14	287,50	284,5	23,41	
Model 2	Masa (MNU) [g]	Trenująca	24	113,54	112,5	31,62	0,190
		Nietrenująca	8	133,88	133,0	11,68	
	MNU (ilość) [mg/kg]	Trenująca	24	2,04	2,1	0,47	0,092
		Nietrenująca	8	2,41	2,4	0,20	
	Masa (sekcja) [g]	Trenująca	24	305,17	308,0	35,51	0,648
		Nietrenująca	8	311,00	312,0	35,58	

Tab.3. Średnia masa oraz dawka MNU podana szczurom w grupach doświadczalnych w zależności od podejmowanego poziomu intenswności treningu fizycznego.

Model	Cecha	GRUPA	N	Średnia	Mediana	Odch.std	p (test Kruskala-Wallisa)
Model 1	Masa (MNU) [g]	GK	14	105,50	105,5	11,12	0,409
		NPI	12	114,17	120,0	27,12	
		UPI	10	113,00	135,0	35,61	
		WPI	7	98,86	100,0	11,50	
	MNU (ilość) [mg/kg]	GK	14	1,91	1,9	0,21	0,442
		NPI	12	2,10	2,3	0,45	
		UPI	10	2,08	2,5	0,55	
		WPI	7	1,77	1,8	0,22	
	Masa (sekcja) [g]	GK	14	287,50	284,5	23,41	0,340
		NPI	12	279,58	280,0	20,94	
		UPI	10	289,50	295,0	25,11	
		WPI	7	297,14	294,0	18,82	
Model 2	Masa (MNU) [g]	GK	8	133,88	133,0	11,68	0,158
		NPI	9	118,89	140,0	32,57	
		UPI	9	118,89	140,0	39,19	
		WPI	6	97,50	98,5	5,68	
	MNU (ilość) [mg/kg]	GK	8	2,41	2,4	0,20	0,127
		NPI	9	2,16	2,5	0,49	
		UPI	9	2,10	2,5	0,56	
		WPI	6	1,77	1,8	0,10	
	Masa (sekcja) [g]	GK	8	311,00	312,0	35,58	0,625
		NPI	9	307,78	309,0	30,31	
		UPI	9	292,78	299,0	25,50	
		WPI	6	319,83	310,5	52,37	

III 2. Metody badawcze

III 2.1. Indukcja i wykrywanie raka listwy mleczej

Wyindukowanie guza raka listwy mleczej odbyło się poprzez podanie wszystkim samicom szczurów w wieku 1 miesiąca dootrzewnowo karcinogenu N-metylo-N-nitrozomocznika, MNU (Sigma-Aldrich, Monachium, Niemcy) w dawce 180mg/kg masy ciała. MNU zostało rozpuszczone w ciepłym roztworze NaCl i zakwaszono za pomocą kwasu octowego do pH 5,0 (Ko i wsp., 2008).

Począwszy od 4 tygodnia od podania MNU w celu wykrycia występujących guzów prowadzono systematycznie trzy razy w tygodniu badanie palpacyjne. Regularnie raz w tygodniu zwierzęta były ważone.

Ponadto zwierzęta zostały 2-krotnie poddane okresowej kontroli za pomocą specjalistycznej, liniowej głowicy USG do badań zwierząt (UST 5298 - Phased Array o częstotliwości pracy od 2,0 do 8,0 MHz i kącie 90°) w celu określenia rozwoju procesu nowotworowego – liczby i wielkości guzów. Badania były wykonane po wcześniejszy podaniu środków anestetycznych.

Wszystkie czynności realizowano przy pomocy znieczulenia (mieszanka ketaminy – dawka 60 mg/kg oraz medetomidyny - dawka 0,5 mg/kg masy ciała).

III 2.2. Trening fizyczny

Szczury z modelu 1 zostały poddane treningowi fizycznemu bezpośrednio po podaniu MNU, natomiast szczury z modelu 2-12 tygodni po podaniu MNU.

Trening odbywał się przez okres 12 tygodni, 5 dni w tygodniu, na ruchomej 3- pozycyjnej bieżni dla zwierząt doświadczalnych Exer 3/6 firmy Columbus. W zależności od poziomu intensywności treningu z czasem sukcesywnie była podwyższana

prędkość przesuwu bieżni i czas trwania treningu (Tab.4). Parametry dla treningu o niskim poziomie intensywności zostały obniżone o 20% w stosunku do treningu o poziomie umiarkowanym, natomiast parametry dla treningu o wysokim poziomie intensywności zostały podwyższone odpowiednio o 20% (Podhorska-Okołów, 1999).

Szczury z grupy kontrolnej po podaniu MNU nie były poddane treningowi fizycznemu. Przez 12 tygodni znajdowały się w klatkach w identycznych warunkach jak szczury z grupy poddanej treningowi fizycznemu.

Tab.4. Protokół treningu o umiarkowanej intensywności

Tydzień treningu	1	2	3	4	5	6	7	8	9-12
Prędkość przesuwu bieżni [km/h]	0.60	0.96	1.20	1.44	1.68	1.68	1.68	1.68	1.68
Czas [min]	10	20	30	40	50	55	60	65	30

III 2.3. Pobranie tkanek

Zwierzęta zostały poddane eutanazji po upływie 12 tygodni od podania MNU dla modelu 1 i 24 tygodni od podania MNU dla modelu 2.

Uśmiercenie nastąpiło poprzez dootrzewnowe wstrzyknięcie pentobarbitalu w dawce 200 mg/kg masy ciała, które poprzedzono domięśniowym znieczuleniem poprzez wstrzyknięcie ketaminy, w dawce 60 mg/kg masy ciała oraz medetomidyny w dawce 0,5 mg/kg masy ciała (Puła i wsp. 2013).

Podczas sekcji pobrano do badań:

- Wszystkie guzy wykryte palpacyjnie
- Płuca, wątrobę, śledzionę, nerki
- Powiększone węzły chłonne
- Krew

Wykryte palpacyjnie guzy zmierzono, następnie wszystkie guzy oraz przerzuty podzielono na 3 części: jedną utrwalono w 4 % zbuforowanej formalinie (sporządzenie bloczków parafinowych), drugą zamrożono w -80°C (badania molekularne), trzecią zabezpieczono w płynie RNAlater (badania metodą real-time PCR)

Pobrano także krew, którą z kolei poddano procesowi wirowania (500g przez 15 minut w 4°C). Po odwirowaniu otrzymano osocze, które zostało zamrożone.

III 2.4. Histopatologia

Badanie histopatologiczne zrealizowano na pociętych z bloczków parafinowych preparatach 6- μm barwionych hematoksyliną oraz eozyną (H&E) (Puła i wsp., 2013). Zostało ono wykonane przez dwóch niezależnych patologów, przy zastosowaniu dwustanowiskowego mikroskopu BX 41 (Olympus, Tokio, Japonia). Patolodzy dokonali klasyfikacji guzów na łagodne i złośliwe, według klasyfikacji guzów sutkowych u szczurów (Russo i Russo, 2000).

III 2.5. Mikromacierze tkankowe (TMA)

Macierze tkankowe zostały przygotowane po wykonaniu badań histopatologicznych pobranych nowotworów. Pobrano trzy fragmenty guzów o średnicy 2.0 mm z przypuszczalnie największą ilością komórek nowotworowych, za pomocą Manual Tissue Arrayer I (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI, USA). Następnie pozyskane fragmenty umieszczano w bloczkach parafinowych. Dla wszystkich próbek guza został zastosowany ten sam schemat działania.

III 2.6. Immunohistochemia (IHC) - proliferacja

Na skrawkach guzów zostały przeprowadzone reakcje immunohistochemiczne. Skrawki były utrwalone w formalinie (4% zbuforowana formalina), podzielone na preparaty o grubości 4 μm , zanurzone w parafinie.

Skrawki były gotowane w buforze Target Retrieval Solution low pH (przeciwciało Ki-67) w aparacie PTLINK (20 minut, 97°C), a następnie studzone w buforze płuczącym Wash Buffer (bufor TBS z Tween 20) w celu deparafinizacji uwodnienia oraz odsłonięcia determinant antygenowych. Natomiast do przeprowadzenia reakcji IHC wykorzystano system do wizualizacji EnVision FLEX+ (DakoCytomation, Glostrup, Dania, nr kat. K8002) w aparacie AutostainerLink 48. Cały proces był wieloetapowy. Pierwszy etap polegał na blokowaniu endogennej peroksydazy w EnVision FLEX Peroxidase-Blocking Reagent (5 minut, temperatura pokojowa). Drugi etap polegał na przepłukaniu skrawków w Wash Buffer i inkubowano z pierwszorzędowymi przeciwciałami: Ki-67 MIB-5 (Dako, 1:25, nr kat. M7248) 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnie poprzez płukanie w Wash Buffer usunięto nadmiar przeciwciał. Wykonano nakropianie przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową (EnVision FLEX HRP) na 20 minut w temperaturze pokojowej. Następnym etapem po płukaniu w Wash Buffer było dodanie substratu dla peroksydazy chrzanowej – diaminobenzydynę (EnVision FLEX Working Solution mix) i inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej. W efekcie dwukrotnego płukania w Wash Buffer resztki odczynnika zostały usunięte. Kolejnym etapem było barwienie kontrastujące hematoksyliną (EnVision FLEX Hematoxylin, 7 minut, temperatura pokojowa). Po przepłukaniu w wodzie destylowanej oraz dwukrotnie w Wash Buffer, skrawki przeprowadzono przez szereg alkoholi o wzrastającym stężeniu (70%, 96%, 99,8%) – po 5 minut, a następnie przez ksylen. Preparaty zostały zmontowane syntetyczną żywicą SUB-X Mounting Medium przy użyciu aparatu Coverslipper.

Wszystkie przeciwciała rozcieńczone zostały w FLEX Antibody Diluent.

III 2.7. Tunel

Do odnalezienia zmian apoptotycznych w guzach nowotworowych użyto zestaw ApopTag In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, nr kat. S7100). Wykonano odparafinowanie preparatów o grubości 4µm, za pomocą 15-minutowej inkubacji w ksylenie. Później preparaty uwodniono poprzez prowadzenie przez szereg alkoholi o malejącym stężeniu (99,8%, 96%, 70%). Następnie po płukaniu w wodzie

destylowanej oraz buforze PBS (po 5 minut), tkanki trawiono proteinazą K przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu trzykrotnego płukania w buforze PBS, blokowano endogenną peroksydazę poprzez inkubację w 3% H₂O₂ przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po płukaniu w buforze PBS, szkiełka inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej, w buforze preinkubacyjnym (Equilibration Buffer). Poprzez godzinną inkubację w roztworze zawierającym TdT Enzyme i Reaction Buffer (proporcja 33:77 μ l) w 37°C wykonano reakcję terminalnej deoksyrybonukleotydylotransferazy. Zatrzymanie reakcji było możliwe dzięki umieszczeniu preparatów ze skrawkami w buforze płuczącym (Stop/Wash Buffer) i inkubację przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Kolejnym etapem po płukaniu w buforze PBS była inkubacja z przeciwciałem anty-digoksygeniną skoniugowaną z peroksydazą chrzanową (Anti-Digoxigenin Peroxidase) przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Substrat po płukaniu w buforze nakropiono dla peroksydazy chrzanowej – diaminobenzodynę (DAB+ Liquid, Dako) na 5 minut. Poprzez płukanie w wodzie destylowanej zostały usunięte resztki odczynnika. Następnym etapem było barwienie kontrastujące hematoksyliną (EnVision FLEX Hematoxylin, 7 minut, temperatura pokojowa). Po przepłukaniu w wodzie destylowanej oraz dwukrotnie w Wash Buffer, skrawki przeprowadzono przez szereg alkoholi o wzrastającym stężeniu (70%, 96%, 99,8%) – po 5 minut, a następnie przez ksylen. Preparaty zostały zaklejone szkiełkami nakrywkowymi przy użyciu syntetycznej żywicy SUB-X Mounting Medium przy użyciu aparatu Coverslipper.

III 2.8. Ocena reakcji IHC

Pod mikroskopem optycznym BX 41 wyposażonym w oprogramowanie CellD do analizy obrazu wspomaganego komputerowo (Olympus Tokyo, Japan) została oceniona immunohistochemiczna ekspresja skrawków guzów. W celu wykonania oceny antygenu Ki-67, TUNEL w sekcjach TMA wybrano trzy pola z największą liczbą komórek nowotworowych dających pozytywną reakcję (hot spots). Oceniano procent pozytywnych

komórek z każdego pola poprzez oszacowanie brązowo znakowanych jąder komórek nowotworowych w 400 krotnym powiększeniu. Wyniki pozyskane z trzech próbek zanotowano w formie średniej dla każdego guza.

III 2.9. Cytometria przepływowa

Do oznaczenia komórek układu immunologicznego zastosowaną metodę cytometrii przepływowej. Próbki cały czas trzymano na lodzie. Do 50 μ l krwi szczurów dodano 150 μ l 1% BSA. Dokładnie zamieszano. Przygotowano 3 mieszaniny znakowanych przeciwciał:

1. CD3 APC (5 μ l na próbkę), CD4 Fitc (5 μ l na próbkę), CD8a PerCP (5 μ l na próbkę), CD11b/c PE (5 μ l na próbkę)
2. CD161 Fitc (10 μ l na próbkę), CD3 APC (5 μ l na próbkę), CD45A PE (5 μ l na próbkę)
3. IzoFitc (5 μ l na próbkę), IzoAPC (5 μ l na próbkę), IzoPerCP (5 μ l na próbkę), IzoPE (5 μ l na próbkę)

Dodawano po 20 μ l mieszaniny przeciwciał na próbkę i dokładnie mieszano. Następnie inkubowano próbki 30 min. w ciemności. Po tym czasie dodawano po 1ml buforu lizującego i ponownie inkubowano w ciemności przez 10min. W kolejnym kroku próbki wirowano przy 3000 obr./min. przez 2min. Supernatant usuwano i dodawano po 1ml 1% BSA. Komórki zawieszano w buforze, a następnie wirowano przy 3000 obr./min. Ponownie supernatant usuwano i dodawano po 1ml 1% BSA w celu dobrego przepłukania komórek i wirowano przy 3000 obr./min. przez 2min. Po odwirowaniu supernatant usuwano. W końcowym etapie dodawano 400 μ l 1% BSA i dokładnie zawieszano komórki w roztworze. Tak przygotowane próbki mierzono przy użyciu FACS'u.

Bandanie miało na celu wyodrębnienie następujących subpopulacji limfocytów: CD3+/CD4+ - limfocyty Th, CD3+/CD8+ - limfocyty Tc, CD4+/CD8+ - limfocyty niedojrzałe, podwójnie pozytywne, CD3-/CD11b+ - granulocyty, monocyty, CD3-/CD161+ - NK, CD3-/CD161- - limfocyty B, monocyty, CD3+/CD45RA+ - limfocyty T, CD3-/CD45RA+ - limfocyty B, monocyty.

III 3. Metody statystyczne

Opis statystyczny materiału obejmował wyznaczenie wartości średnich, median rozkładu i odchyłeń standardowych.

Za pomocą testu Shapiro-Wilka oceniono, że rozkłady praktycznie wszystkich zmiennych (mierzonych parametrów) w pracy w sposób istotny odbiegały od rozkładu normalnego. Tym samym hipoteza zerowa o normalności rozkładu została odrzucona, w powyższej rozprawie doktorskiej zastosowano głównie testy nieparametryczne.

Testowanie parametryczne za pomocą testu t-Studenta wykonano jedynie dla masy szczura, która była jedyną cechą o rozkładzie normalnym.

Różnice pomiędzy 2 grupami niezależnymi oceniano stosując test Manna-Whitneya. Natomiast do porównywania większej liczby grup niezależnych (porównywanie poziomów wysiłku) wykorzystano test ANOVA Kruskala-Wallisa.

Dane zostały zaprezentowane w formie tabel lub rycin.

Istotność statystyczna różnicy średnich oraz korelacji oceniano przyjmując poziom krytyczny $p < 0,05$. Obliczenia przeprowadzono używając pakietu STATISTICA 13.1 firmy Dell.

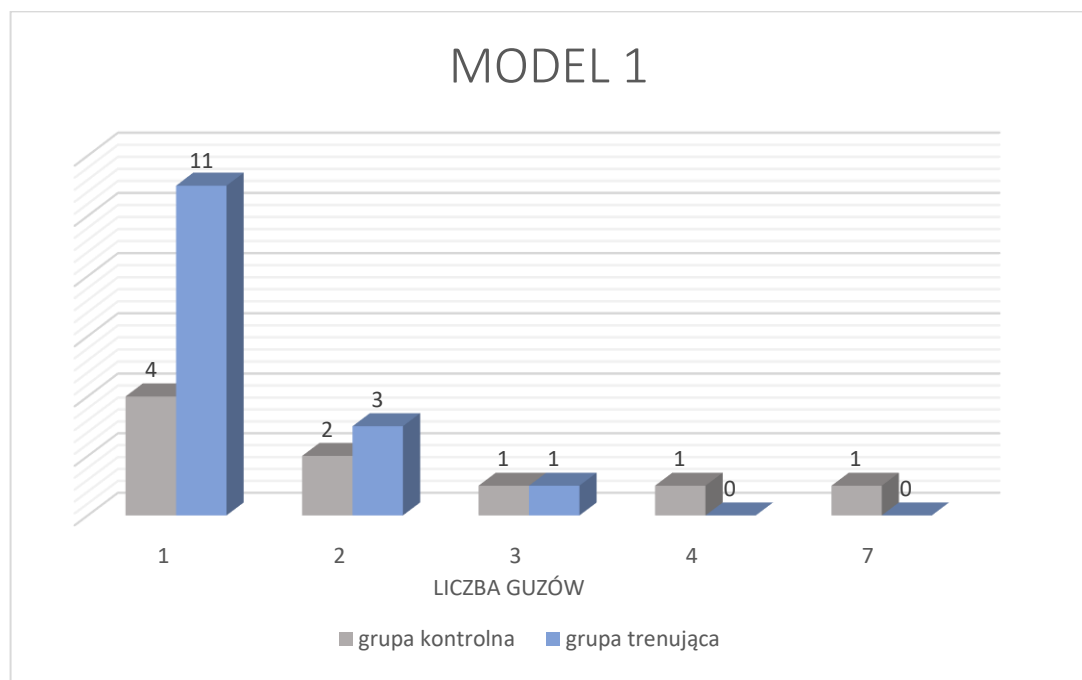
IV WYNIKI

IV 1. Grupa trenująca vs grupa kontrolna

IV 1.1. Indukcja guzów

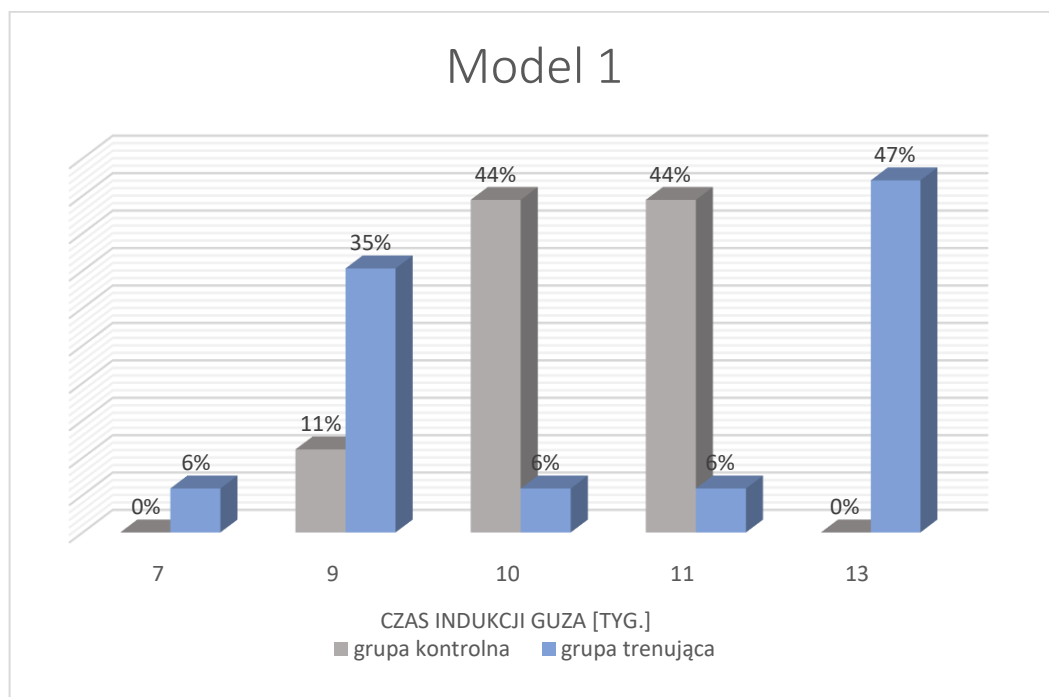
MODEL 1

W grupie trenującej wyindukowano 20 guzy nowotworowe (0,69 na szczura) u 15 szczurów (52%), natomiast w grupie kontrolnej 22 guzy nowotworowe (średnio 1,57 na szczura) u 9 szczurów (64%). Guzy wielokrotne występowały częściej w grupie kontrolnej (Ryc.2).



Ryc.1. Częstość występowania guzów wielokrotnych.

W rozkładzie czasu indukcji guza w grupie trenującej występują dwie dominanty: 9 i 13 tygodni (średnia=10,7 tyg.), a w grupie kontrolnej dominuje przedział 10-11 tygodni (średnia=10,3 tyg.) (Ryc.3).



Ryc.2. Procentowy rozkład czasu indukcji guza.

Znaczna rozpiętość czasu indukcji guza oraz mała liczebność grup nie pozwalają na stwierdzenie istotnej zależności czasu indukcji guza od podejmowania treningu fizycznego (Tab.5).

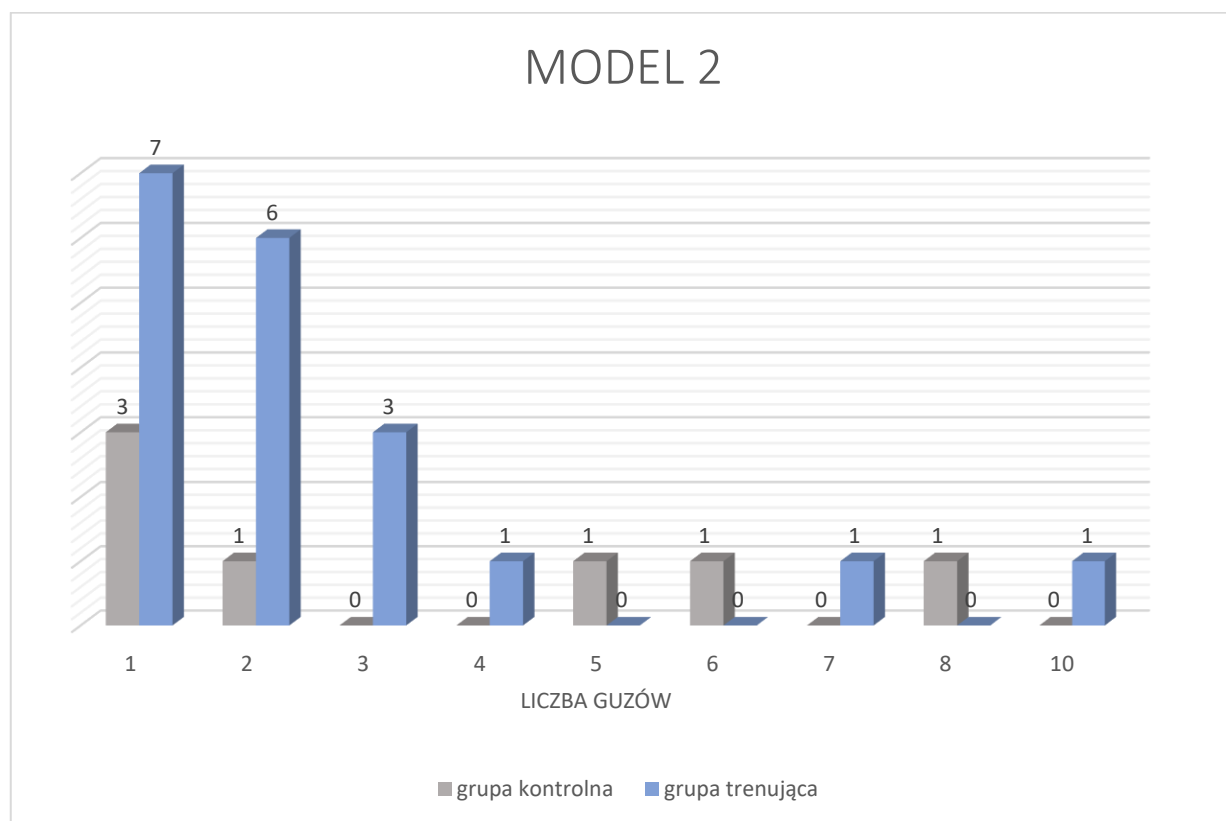
Tab.5. Czas indukcji guza a podejmowany trening fizyczny.

Grupa	n	Średnia	Mediana	Odch. Std.	p (test Manna – Whitney)
kontrolna	9	10,3	10	0,7	0,878
trenująca	15	10,7	9	2,1	

MODEL 2

W grupie trenującej wyindukowano 49 guzy nowotworowe (2,0 na szczura) u 19 szczurów (79%), natomiast w grupie kontrolnej odpowiednio 24 guzy nowotworowe (średnio 3,0 na szczura) u 7 szczurów (88%).

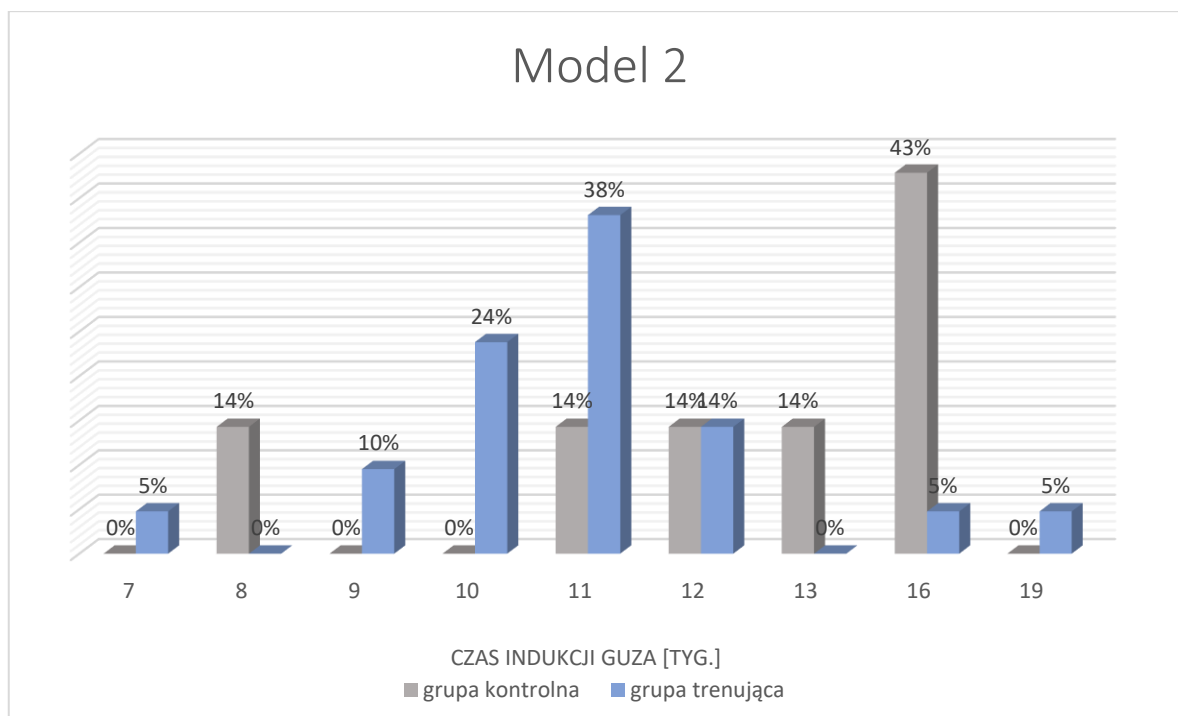
W grupie trenującej w większości przypadków u jednego szczura występowały maksymalnie 3 guzy, natomiast w grupie kontrolnej występowały guzy wielokrotne (Ryc.4).



Ryc.3. Częstość występowania guzów wielokrotnych.

Czas indukcji guza w modelu 2 rozkładał się odmiennie niż w modelu 1. Indukcja guza w modelu 2 w grupie kontrolnej następowała zwykle później niż w modelu 1. W grupie trenującej przeciętny czas indukcji guza z kolei był krótszy niż w grupie

kontrolnej. Różnica przeciętnego czasu indukcji guza między grupą trenującą i kontrolną wynosiła około 2 tygodnie (Ryc.5). Różnica ta jest istotna statystycznie, $p=0,044$ (Tab.6).



Ryc.4. Procentowy rozkład czasu indukcji guza.

Tab.6. Czas indukcji guza a podejmowany trening fizyczny.

Grupa	n	Średnia	Mediana	Odch. Std.	p (test Manna-Whitneya)
kontrolna	7	13,1	13,0	3,1	0,044
trenująca	19	10,8	11,0	2,5	

MODEL 1 VS MODEL 2

Liczba wydrukowanych guzów jest większa w modelu 2, zarówno w grupie trenującej, jak i kontrolnej. Jednak tylko w grupie trenującej różnica liczby guzów pomiędzy modelami jest istotna statystycznie (Tab.7).

Tab.7. Porównanie rozkładów liczby guzów w obu modelach: grupa trenująca vs grupa kontrolna.

Grupa	Model	Średnia	Mediana	Odch.std	p (test Manna-Whitneya)
kontrolna	1	1,57	1,0	1,99	0,109
	2	3,00	1,5	2,93	
trenująca	1	0,69	1,0	0,81	0,004
	2	2,04	1,5	2,31	

IV 1.2. Objętość guzów, poziom proliferacji i apoptozy

MODEL 1

Średnia i mediana rozkładu objętości guza były większe w grupie trenującej. Znaczne zróżnicowanie objętości guza w grupie trenującej sprawia, że mimo wyraźnej różnicy średnich i median, rozkłady objętości w obu porównywanych grupach nie różnią się statystycznie istotnie. Również rozkłady Ki-67 w obu grupach nie różnią się istotnie. Jedynie istotny wpływ podejmowanego treningu zaobserwowano w przypadku zmiennej tunel (Tab.8).

Tab.8. Parametry rozkładu zmiennych V, Ki-67 i tunel w grupie trenującej i kontrolnej w modelu 1.

Zmienna	Grupa	Średnia	Mediana	Odch.std	p (test Manna-Whitneya)
V	kontrolna	374,6	280,0	314,9	0,5624
	trenująca	807,9	301,5	1017,4	
Ki-67	kontrolna	10,86	11,94%	7,65%	0,8700
	trenująca	10,60	8,99%	6,73%	
tunel	kontrolna	2,03	1,08%	2,96%	0,0344
	trenująca	2,77	2,19%	2,16%	

MODEL 2

Wśród szczurów w modelu 2 podobnie jak w modelu 1, jedynie rozkład zmiennej tunel różnił się istotnie przyjmując w grupie trenującej istotnie większe wartości (Tab.9).

Tab.9. Parametry rozkładu zmiennych V, Ki-67 i tunel w grupie trenującej i kontrolnej w modelu 2.

Zmienna	Grupa	Średnia	Mediana	Odch.std	p (test Manna-Whitneya)
V	kontrolna	918,1	327,0	1476,6	0,3627
	trenująca	978,3	216,0	1455,7	
Ki-67	kontrolna	899,32	610,65%	965,14%	0,3385
	trenująca	1167,89	778,00%	1295,42%	
tunel	kontrolna	119,92	64,10%	137,14%	0,0431
	trenująca	347,21	217,90%	430,00%	

MODEL 1 VS MODEL 2

W zestawieniu obu modeli dla objętości guzów, ich proliferacji (Ki-67) oraz apoptozy (tunel) nie zaobserwowano istotnych różnic (Tab.10).

Tab.10. Porównanie rozkładów zmiennych V, Ki-67, tunel w obu modelach w grupie trenującej i kontrolnej.

Zmienna	Grupa	Model	Średnia	Mediana	Odch.std	p (test Manna-Whitneya)
V	kontrolna	1	374,59	280,00	314,90	0,206
		2	918,15	327,00	1476,64	
Ki-67		1	10,86%	11,94%	7,65%	0,276
		2	8,99%	6,11%	9,65%	
tunel		1	2,03%	1,08%	2,96%	0,337
		2	1,20%	0,64%	1,37%	
V	trenująca	1	807,88	301,50	1017,38	0,556
		2	978,27	216,00	1455,75	
Ki-67		1	10,60%	8,99%	6,73%	0,431
		2	11,68%	7,78%	12,95%	
tunel		1	2,77%	2,19%	2,16%	0,647
		2	3,47%	2,18%	4,30%	

IV 1.3. Poziom subpopulacji limfocytów

MODEL 1

W modelu 1 dla subpopulacji limfocytów zaobserwowano wyższe wartości średnie (i mediany) w grupie trenującej (z wyjątkiem CD3-CD161-). Różnice są statystycznie istotne, z wyjątkiem CD3+CD4+ i CD3+CD8+ (Tab.11).

Tab.11. Poziom subpopulacji limfocytów (CD): grupa trenująca vs grupa kontrolna.

Cecha	Grupa	Średnia	Mediana	Odch.std	p (test Manna-Whitneya)
CD3+CD4+	kontrolna	10058,6	10134,0	6705,2	0,119
	trenująca	13793,4	14059,5	6452,9	
CD3+CD8+	kontrolna	4600,7	3973,0	2990,4	0,289
	trenująca	5690,9	6162,5	2765,6	
CD4+CD8+	kontrolna	960,2	720,5	813,0	0,022
	trenująca	1824,3	1390,0	2207,0	
CD3- CD116/c+	kontrolna	6328,8	6593,5	4047,8	0,021
	trenująca	14131,9	12209,0	13216,0	
CD3+CD161+	kontrolna	184,4	66,5	397,2	0,001
	trenująca	303,9	247,0	222,4	
CD3-CD161-	kontrolna	87221,5	87003,5	6723,6	0,001
	trenująca	76245,4	75373,0	8277,0	
CD3+CD45R A+	kontrolna	396,7	225,0	619,9	0,002
	trenująca	483,8	504,5	152,9	
CD3- CD45RA+	kontrolna	6234,6	6612,5	3283,3	0,002
	trenująca	11636,6	11509,0	4745,1	

MODEL 2

W modelu 2 dla subpopulacji limfocytów zaobserwowano istotnie niższe wartości średniej (i mediany) w grupie trenującej dla zmiennych: CD3+CD8+, CD3+CD161+ i trend zmiany ($p \approx 0,05$) dla CD4+CD8+ (Tab.12).

Tab.12. Poziom subpopulacji limfocytów (CD) w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.

Cecha	Grupa	Średnia	Mediana	Odch.std	P (test Manna-Whitneya)
CD3+CD4 +	kontrolna	11505,6	11117	3285,6	0,232
	trenująca	9041,3	8094	5357,9	
CD3+CD8 +	kontrolna	6275,1	5575	2172,8	0,040
	trenująca	4182,2	3821	2475,1	
CD4+CD8 +	kontrolna	1563,1	1568	537,2	0,058
	trenująca	1095,9	962	712,9	
CD3- CD116/c+	kontrolna	21628,5	21284	11897,5	0,484
	trenująca	18389,0	16490	12452,8	
CD3+CD1 61+	kontrolna	219,4	124	334,1	0,050
	trenująca	495,6	172	612,6	
CD3- CD161-	kontrolna	83573,8	84980	6632,8	0,735
	trenująca	84361,1	86527	8093,0	
CD3+CD4 5RA+	kontrolna	502,8	390	465,9	0,439
	trenująca	324,2	297	195,7	
CD3- CD45RA+	kontrolna	6387,0	7076	2730,1	0,291
	trenująca	10123,0	8058	10841,3	

MODEL 1 VS MODEL 2

Istotne zróżnicowanie dla obu modeli zaobserwowano w grupie kontrolnej dla CD4+CD8+, CD3-CD116/c+ oraz w grupie trenującej dla CD3+CD4+, CD3-CD161, CD3+CD45Ra+ oraz CD3-CD45RA+ (Tab. 13)

Tab.13. Poziom subpopulacji limfocytów (CD) w obu modelach.

Grupa	Zmienna	Model	Średnia	Mediana	Odch.std	p (test Manna-Whitneya)
Kontrolna	CD3+CD4+	1	10058,6	10134,0	6705,2	0,3568
		2	11505,6	11117,0	3285,6	
	CD3+CD8+	1	4600,7	3973,0	2990,4	0,0750
		2	6275,1	5575,0	2172,8	
	CD4+CD8+	1	960,2	720,5	813,0	0,0105
		2	1563,1	1568,0	537,2	
	CD3-CD116/c+	1	6328,8	6593,5	4047,8	0,0019
		2	21628,5	21284,0	11897,5	
	CD3+CD161+	1	184,4	66,5	397,2	0,2458
		2	219,4	124,0	334,1	
	CD3-CD161-	1	87221,5	87003,5	6723,6	0,2323
		2	83573,8	84980,0	6632,8	
	CD3+CD45RA+	1	396,7	225,0	619,9	0,0875
		2	502,8	390,0	465,9	
CD3-CD45RA+	1	6234,6	6612,5	3283,3	0,8645	
	2	6387,0	7076,0	2730,1		
Trenująca	CD3+CD4+	1	13793,4	14059,5	6452,9	0,0359
		2	9041,3	8094,0	5357,9	
	CD3+CD8+	1	5690,9	6162,5	2765,6	0,1006
		2	4182,2	3821,0	2475,1	
	CD4+CD8+	1	1824,3	1390,0	2207,0	0,1005
		2	1095,9	962,0	712,9	
	CD3-CD116/c+	1	14131,9	12209,0	13216,0	0,1339
		2	18389,0	16490,0	12452,8	
	CD3+CD161+	1	303,9	247,0	222,4	0,8640
		2	495,6	172,0	612,6	
	CD3-CD161-	1	76245,4	75373,0	8277,0	0,0070
		2	84361,1	86527,0	8093,0	
	CD3+CD45RA+	1	483,8	504,5	152,9	0,0039
		2	324,2	297,0	195,7	
CD3-CD45RA+	1	11636,6	11509,0	4745,1	0,0345	

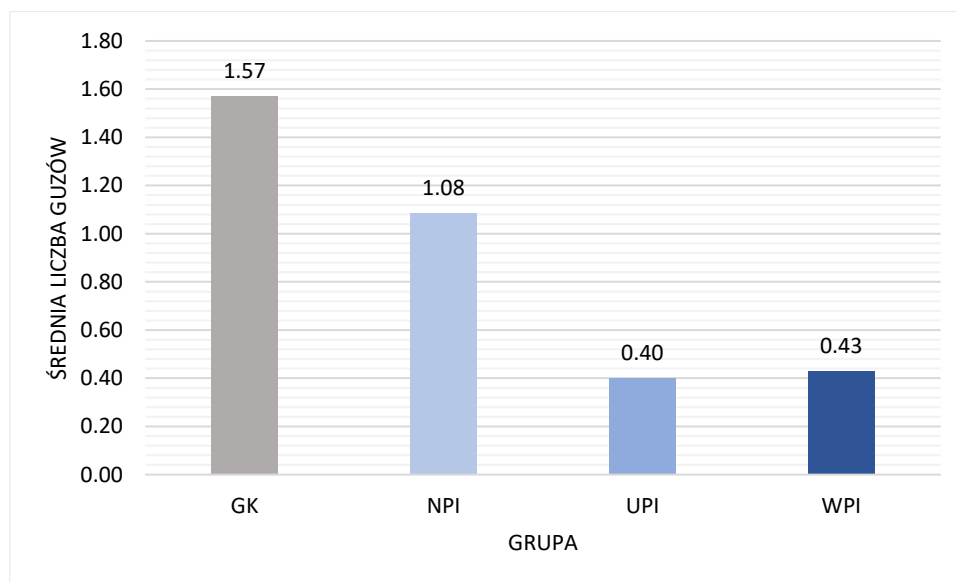
		2	10123,0	8058,0	10841,3	
--	--	---	---------	--------	---------	--

IV 2. Poziom treningu fizycznego

IV 2.1. Indukcja guzów

MODEL 1

W modelu 1 w GK wydrukowano łącznie 22 guzy (średnio 1,57 na szczura), w grupie NPI 13 guzów (1,08 na szczura), w grupie UPI 4 guzy (0,40 na szczura) i w grupie WPI również 3 guzy (0,43 na szczura). Średnia liczba wydrukowanych guzów na szczura jest niższa w grupach trenujących oraz maleje wraz ze wzrostem intensywności treningu fizycznego od poziomu niskiej intensywności (NPI) do średniej i wysokiej (UPI i WPI) (Ryc.6).



Ryc.5. Średnia liczba guzów nowotworowych na szczura w zależności od intensywności treningu (model 1).

Stwierdzone różnice między grupami w liczbie wyidukowanych guzów są statystycznie istotne (test AQNOVA Kruskala-Wallisa, $p = 0,049$). Średnia liczba wyidukowanych guzów u szczurów w grupie kontrolnej (GK) jest zbliżona do średniej w grupie NPI, średnie w grupach UPI i WPI są niemal identyczne. Testy porównań wielokrotnych post-hoc (Tab.14) potwierdzają te spostrzeżenia. Średnia liczba guzów w grupach UPI i WPI nie różni się istotnie, natomiast istotnie obie te średnie różnią się od średniej w grupie GK. Różnica średnich między grupami GK i NPI, chociaż wyraźna, nie jest statystycznie istotna. Brak istotnego zróżnicowania między grupą NPI i grupami UPI i WPI wiąże się głównie z małą liczebnością tych grup.

Tab.14. Wartości p w teście porównań wielokrotnych (post hoc) w ANOVA Kruskala – Wallisa liczebności wyindukowanych guzów na szczura.

	NPI	UPI	WPI
GK	0,439	0,024	0,047
NPI		0,128	0,184
UPI			1,000

Wielokrotne guzy obserwowano jedynie u szczurów z grupy kontrolnej (GK) i w grupie o niskiej intensywności (NPI). W grupach UPI i WPI wydukowano jedynie guzy pojedyncze (Tab.15).

Tab.15. Rozkład liczby guzów nowotworowych na szczura w poszczególnych grupach w modelu 1.

Liczba guzów nowotworowych u szczura	MODEL 1			
	Grupa			
	GK	NPI	UPI	WPI
0	5	4	6	4
1	4	4	4	3
2	2	3	0	0
3	1	1	0	0
4	1	0	0	0
7	1	0	0	0
Ogółem	14	12	10	7

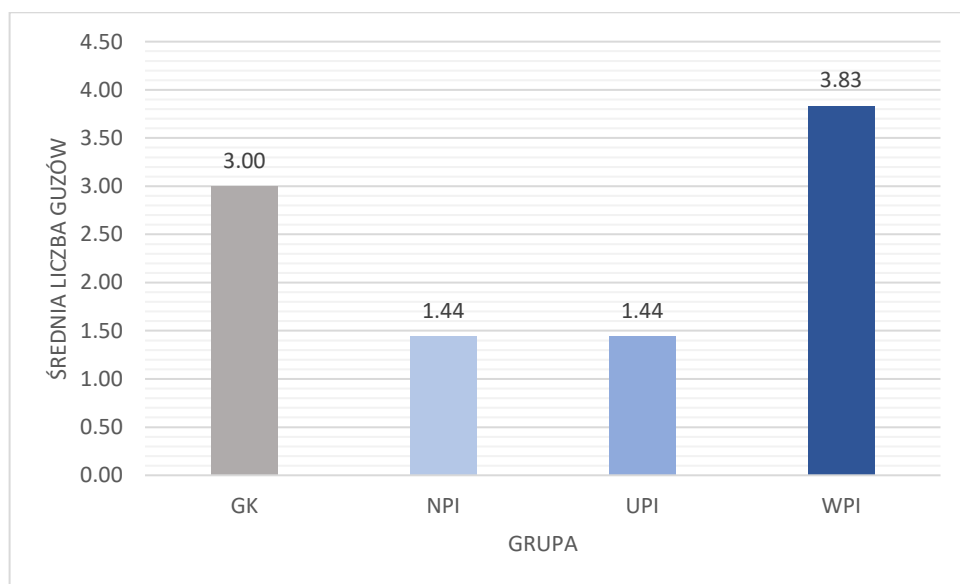
W modelu 1 przeciętny czas indukcji guza okazał się najdłuższy w grupie WPI. Jednak niewielka liczebność tej grupy nie pozwala na uznanie istotności statystycznej zaobserwowanych różnic (Tab.16). Ewentualne znalezienie statystycznego potwierdzenia wydłużania się czasu indukcji w miarę zwiększania intensywności treningu wymaga przeprowadzenia badań na liczniejszym materiale.

Tab.16. Czas indukcji guza w poszczególnych grupach w zależności od intensywności wysiłku w modelu 1.

Grupa	Średnia	Mediana	Odch.std.	p (test Kruskala-Wallisa)
NPI	10,9	11,5	2,3	0,338
UPI	10,0	9,0	2,0	
WPI	12,3	13,0	1,2	

MODEL 2

W modelu 2 w grupie GK wyindukowano łącznie 24 guzy (średnio 3,00 na szczura), w grupie NPI 13 guzów (1,44 na szczura), w grupie UPI 13 guzów (1,44 na szczura) i w grupie WPI 23 guzy (3,83 na szczura) (Ryc.7). Średnia liczba wyindukowanych guzów na szczura nie wykazuje zależności od intensywności treningu (ANOVA Kruskala-Wallisa, $p=0,573$).



Ryc.6. Średnia liczba guzów nowotworowych na szczura w zależności od intensywności treningu (model 2).

W modelu 2 liczne guzy występowały we wszystkich grupach (Tab.17).

Tab.17. Rozkład liczby guzów nowotworowych na szczura w poszczególnych grupach w modelu 2.

Liczba guzów nowotworowych u szczura	MODEL 2			
	Grupa			
	GK	NPI	UPI	WPI
0	1	3	0	2
1	3	1	6	0
2	1	4	2	0
3	0	0	1	2
4	0	1	0	0
5	1	0	0	0
6	1	0	0	0
7	0	0	0	1
8	1	0	0	0
10	0	0	0	1
Ogółem	8	9	9	6

W modelu 2 analiza zależności czasu indukcji guza od intensywności treningu nie wykazuje istotnych różnic (Tab.18).

Tab.18. Czas indukcji guza w poszczególnych grupach w zależności od intensywności wysiłku w modelu 2.

Grupa	Średnia	Mediana	Odch.std.	p (test Kruskala-Wallisa)
NPI	11,9	11,0	2,0	0,205
UPI	10,6	11,0	0,9	
WPI	11,2	10,0	4,6	

MODEL 1 VS MODEL 2

W modelu 2 średnia liczba guzów, podobnie jak mediana rozkładu, jest większa od średniej i mediany liczby guzów w modelu 1, niezależnie od intensywności wysiłku, ale istotnie różni się od średniej w modelu 1 w grupie UPI i WPI (Tab.19).

Tab.19. Rozkład liczby guzów nowotworowych na szczura w poszczególnych grupach w modelu 1 i modelu 2.

Grupa	Model	Średnia	Mediana	Odch.std	p (test Manna-Whitneya)
NPI	1	1,08	1,0	1,00	0,215
	2	1,44	2,0	1,33	
UPI	1	0,40	0,0	0,52	0,008
	2	1,44	1,0	0,73	
WPI	1	0,43	0,0	0,53	0,047
	2	3,83	3,0	3,97	
GK	1	1,57	1,0	1,98	0,109
	2	3,00	1,5	2,93	

IV 2.2. Objętość guzów, poziom proliferacji i apoptozy

MODEL 1

Rozkłady wszystkich trzech rozpatrywanych zmiennych w grupach nie różnią się istotnie (Tab.20). Nie można stwierdzić istotnej zależności rozkładów tych zmiennych od intensywności treningu w modelu 1.

Tab.20. Rozkład zmiennych V, Ki-67, tunel w poszczególnych grupach różniących się poziomem wysiłku fizycznego w modelu 1.

Zmienna	Grupa	Średnia	Mediana	Odch.std	p (test Kruskala-Wallisa)
V	GK	374,6	280,0	314,9	0,371
	NPI	821,8	240,0	1163,5	
	UPI	894,1	630,8	778,6	
	WPI	632,3	250,0	859,8	
Ki-67	GK	10,86%	11,94%	7,65%	0,603
	NPI	11,35%	9,53%	6,93%	
	UPI	11,60%	8,76%	7,59%	
	WPI	6,02%	6,24%	4,37%	
tunel	GK	2,03%	1,08%	2,96%	0,198
	NPI	2,62%	2,03%	1,82%	
	UPI	3,28%	2,17%	3,63%	
	WPI	2,74%	3,65%	2,01%	

MODEL 2

Istotne zróżnicowanie grup o różnej intensywności stwierdzono w przypadku proliferacji (Ki-67) i apoptozy (tunel) (Tab.21). Testowanie post-hoc (testy porównań wielokrotnych) pozwala stwierdzić, że wartości Ki-67 przy niskiej intensywności treningu fizycznego (grupa NPI) są istotnie niższe od wartości w grupach UPI i WPI (które z kolei, nie różnią się istotnie). Mediany rozkładu zmiennej tunel wprawdzie systematycznie rosną w miarę wzrastania poziomu intensywności treningu fizycznego, ale jedynie w grupie WPI apoptoza jest istotnie wyższa od jej poziomu w grupie kontrolnej (Tab.22).

Tab.21. Rozkład zmiennych V, Ki-67, tunel w poszczególnych grupach różniących się poziomem wysiłku fizycznego w modelu 2.

Zmienna	Grupa	Średnia	Mediana	Odch.std	p (test Kruskala-Wallisa)
V	GK	1001,6	357,5	1516,8	0,090
	NPI	628,5	120,0	1111,5	
	UPI	1109,7	180,0	1813,5	
	WPI	1101,7	409,5	1434,4	
Ki-67	GK	8,99%	6,11%	9,65%	0,011
	NPI	5,48%	1,93%	8,79%	
	UPI	11,28%	8,33%	6,34%	
	WPI	15,41%	9,06%	16,27%	
tunel	GK	1,20%	0,64%	1,37%	0,048
	NPI	2,47%	0,91%	4,35%	
	UPI	1,83%	1,79%	1,46%	
	WPI	4,97%	4,43%	4,93%	

Tab.22. Testy porównań wielokrotnych (post-hoc). Wartości p dla Ki-67 podane są powyżej przekątnej, dla tunelu – poniżej przekątnej. Kolorem czerwonym zaznaczono wartości $p < 0,05$.

Ki-67				
Grupy	GK	NPI	UPI	WPI
GK	XXXXX	0,784	0,786	0,478
NPI	1,000	XXXXX	0,048	0,018
UPI	1,000	1,000	XXXXX	1,000
WPI	0,040	0,481	0,969	XXXXX
Tunel				

MODEL 1 VS MODEL 2

Objętość guzów w obu modelach, niezależnie od poziomu podejmowanego treningu fizycznego nie wykazuje istotnego zróżnicowania (Tab.23).

Tab.23. Porównanie rozkładów zmiennej V w obu modelach każdej z grup o różnej intensywności treningu.

Grupa	Model	V			p (test Manna-Whitneya)
		Średnia	Mediana	Odch.std	
NPI	1	821,8	240,0	1163,5	0,330
	2	628,5	120,0	1111,5	
UPI	1	894,1	630,8	778,6	0,103
	2	1109,7	180,0	1813,5	
WPI	1	632,3	250,0	859,8	0,521
	2	1101,7	409,5	1434,4	
GK	1	374,6	280,0	314,9	0,206
	2	918,1	327,0	1476,6	

Średnia wartość Ki-67 wykazuje istotne zróżnicowanie pomiędzy modelami dla niskiego poziomu intensywności treningu fizycznego. Dla pozostałych poziomów intensywności treningu fizycznego nie stwierdza się istotnych różnic (Tab.24).

Tab.24. Porównanie rozkładów zmiennej Ki-67 w obu modelach każdej z grup o różnej intensywności treningu.

Grupa	Model	Ki-67			p (test Manna-Whitneya)
		Średnia	Mediana	Odch.std	
NPI	1	11,35%	9,53%	6,93%	0,003
	2	5,48%	1,93%	8,79%	
UPI	1	11,60%	8,76%	7,59%	0,754
	2	11,28%	8,33%	6,34%	
WPI	1	6,02%	6,24%	4,37%	0,422
	2	15,41%	9,06%	16,27%	
GK	1	10,86%	11,94%	7,65%	0,276
	2	8,99%	6,11%	9,65%	

Średnie wartości zmiennej tunel rosną wraz ze zwiększeniem wysiłku fizycznego w obu modelach. Różnice między modelami nie są jednak statystycznie istotne na poziomie $p \leq 0,05$ (Tab.25).

Tab.25. Porównanie rozkładów zmiennej tunel w obu modelach każdej z grup o różnej intensywności treningu.

Grupa	Model	tunel			p (test Manna-Whitneya)
		Średnia	Mediana	Odch.std	
NPI	1	2,62%	2,03%	1,82%	0,090
	2	2,47%	0,91%	4,35%	
UPI	1	3,28%	2,17%	3,63%	0,511

	2	1,83%	1,79%	1,46%	
WPI	1	2,74%	3,65%	2,01%	0,630
	2	4,97%	4,43%	4,93%	
GK	1	2,03%	1,08%	2,96%	0,339
	2	1,20%	0,64%	1,37%	

IV 2.3. Poziom subpopulacji limfocytów

MODEL 1

Z wyjątkiem CD3+CD4+, CD3+CD8+ oraz CD4+CD8+ we wszystkich pozostałych przypadkach stwierdzono występowanie istotnych różnic między grupami (Tab.26). Wartości median rozkładów zmiennych CD w grupie UPI okazały się istotnie różne od wartości median w grupie GK (z reguły istotnie wyższe, z wyjątkiem CD3-CD161-).

Tab.26. Poziom subpopulacji limfocytów (CD) w poszczególnych grupach różniących się poziomem wysiłku fizycznego.

Cecha	Grupa	Średnia	Mediana	Odch.std	p (ANOVA Kruskala- Wallisa)
CD3+CD4+	GK	10058,6	10134,0	6705,2	0,051
	NPI	7644,5	7644,5	4966,0	
	UPI	17882,0	17419,0	6366,1	
	WPI	11461,6	13681,0	4584,1	
CD3+CD8+	GK	4600,7	3973,0	2990,4	0,459
	NPI	4023,5	4023,5	2850,3	
	UPI	6705,7	6501,0	3278,0	
	WPI	5152,4	6286,0	2134,6	
CD4+CD8+	GK	960,2	720,5	813,0	0,124
	NPI	1154,5	1154,5	1127,8	
	UPI	2572,8	1390,0	3459,4	
	WPI	1374,0	1372,0	483,9	
CD3-CD116/c+	GK	6328,8	6593,5	4047,8	0,007
	NPI	9926,0	9926,0	6823,6	
	UPI	22002,0	15139,0	16639,0	
	WPI	7463,4	6337,0	4690,4	

CD3+CD161+	GK	184,4	66,5	397,2	0,002
	NPI	322,5	322,5	89,8	
	UPI	448,1	379,0	255,2	
	WPI	154,3	144,0	81,7	
CD3-CD161-	GK	87221,5	87003,5	6723,6	0,006
	NPI	80024,0	80024,0	2336,3	
	UPI	72540,4	73085,0	5050,1	
	WPI	78870,9	78165,0	10772,4	
CD3+CD45RA+	GK	396,7	225,0	619,9	0,021
	NPI	423,0	423,0	118,8	
	UPI	511,4	452,0	128,5	
	WPI	473,4	544,0	193,1	
CD3-CD45RA+	GK	6234,6	6612,5	3283,3	0,001
	NPI	12987,0	12987,0	4543,9	
	UPI	15189,6	16024,0	2024,6	
	WPI	7697,9	9262,0	3913,5	

W Tab.27 podano wyniki testów wielokrotnych post hoc Kruskala-Wallisa dla przypadków występowania istotnych różnic między grupami ($p < 0,05$ w ANOVA Kruskala-Wallisa).

Tab.27. Testy porównań wielokrotnych post hoc w ANOVA Kruskala-Wallisa. Kolorem czerwonym zaznaczono wartości $p < 0,05$.

Cecha	Testy porównań wielokrotnych post hoc (p)			
	GRUPA	NPI	UPI	WPI
CD3-CD116/c+	GK	1,000	0,004	1,000
	NPI		1,000	1,000
	UPI			0,065
CD3+CD161+	GK	0,204	0,002	1,000
	NPI		1,000	1,000
	UPI			0,281
CD3-CD161-	GK	1,000	0,004	0,323
	NPI		1,000	1,000
	UPI			1,000

CD3+CD45RA+	GK	1,000	0,044	0,057
	NPI		1,000	1,000
	UPI			1,000
CD3-CD45RA+	GK	0,320	0,001	1,000
	NPI		1,000	1,000
	UPI			0,041

MODEL 2

We wszystkich zmiennych CD nie stwierdzono istotnych różnic między grupami (Tab.28).

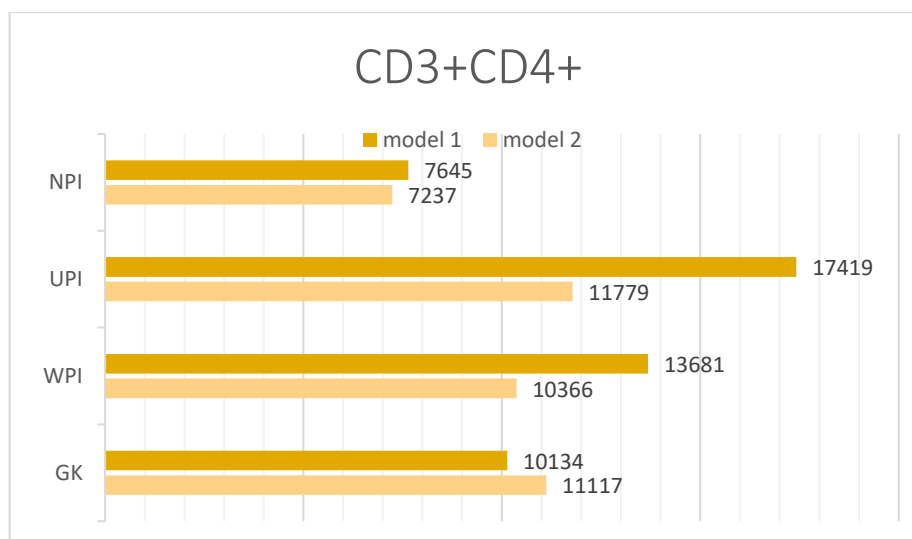
Tab.28. Poziom subpopulacji limfocytów (CD) w poszczególnych grupach.

Cecha	Grupa	Średnia	Mediana	Odch.std	p (test Kruskala-Wallisa)
CD3+CD4+	GK	11505,6	11117,0	3285,6	0,448
	NPI	7771,4	7237,0	4466,5	
	UPI	9344,6	11779,0	4918,7	
	WPI	10781,4	10366,0	7873,1	
CD3+CD8+	GK	6275,1	5574,5	2172,8	0,069
	NPI	3608,9	3131,0	1917,9	
	UPI	3740,0	4507,0	1685,3	
	WPI	6010,2	7454,0	3911,6	
CD4+CD8+	GK	1563,1	1568,0	537,2	0,186
	NPI	979,4	782,0	652,9	
	UPI	1322,3	1213,0	895,0	
	WPI	897,8	962,0	382,3	
CD3-CD116/c+	GK	21628,5	21283,5	11897,5	0,736
	NPI	21013,1	16490,0	15934,4	
	UPI	18493,2	17712,0	9203,3	
	WPI	13478,2	12640,0	11403,0	
CD3+CD161+	GK	219,4	124,0	334,1	0,234
	NPI	488,2	172,0	589,4	
	UPI	337,8	264,0	283,7	
	WPI	792,8	157,0	1020,8	
CD3-CD161-	GK	83573,8	84979,5	6632,8	0,957
	NPI	84545,0	87595,0	8167,8	
	UPI	84639,3	83318,0	6866,8	
	WPI	83529,4	77476,0	11462,3	

CD3+CD45RA+	GK	502,8	389,5	465,9	0,409
	NPI	236,4	267,0	125,2	
	UPI	344,4	337,0	116,7	
	WPI	428,4	378,0	341,2	
CD3-CD45RA+	GK	6387,0	7076,0	2730,1	0,654
	NPI	12581,6	6156,0	17472,1	
	UPI	8588,0	8457,0	2808,4	
	WPI	8952,4	12597,0	6924,4	

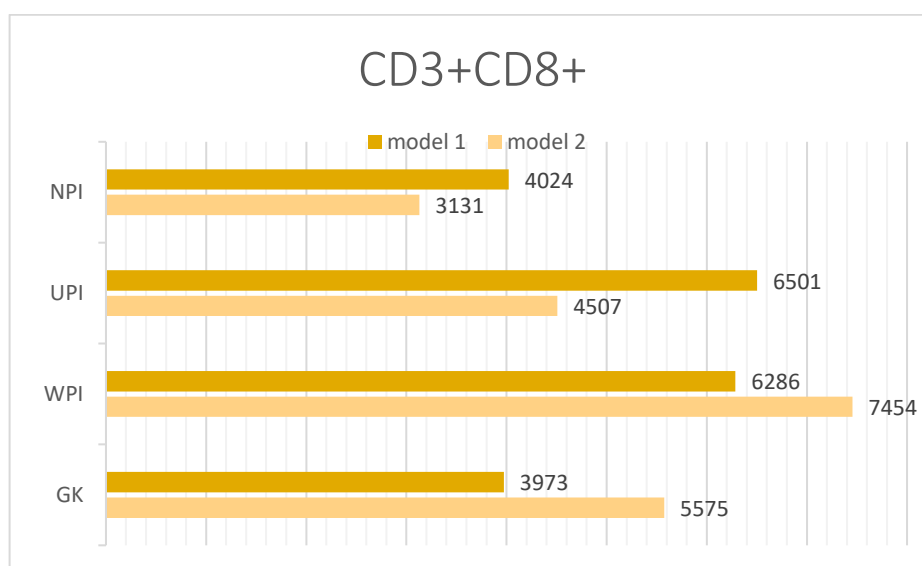
MODEL 1 VS MODEL 2

Mediany CD3+CD4+ są wyższe w modelu 1 w grupach trenujących, wyraźnie w grupie UPI i WPI (Ryc.8). Statystycznie istotną różnicę między modelami stwierdzono tylko w grupie UPI ($p=0,002$).



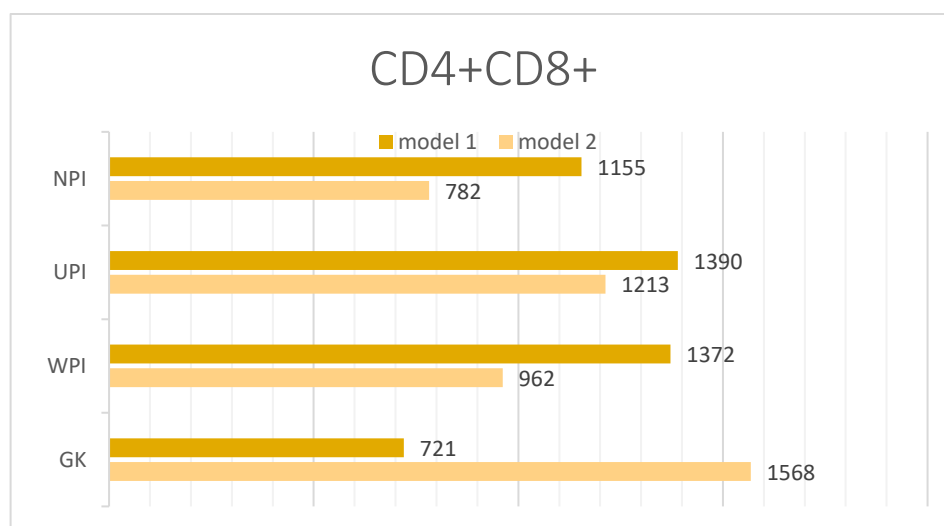
Ryc.7. Mediany rozkładu CD3+CD4+ w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.

W przypadku CD3+CD8+ również w grupie UPI różnica rozkładu w modelu 1 i modelu 2 okazała się statystycznie istotna ($p=0,045$) (Ryc.9).



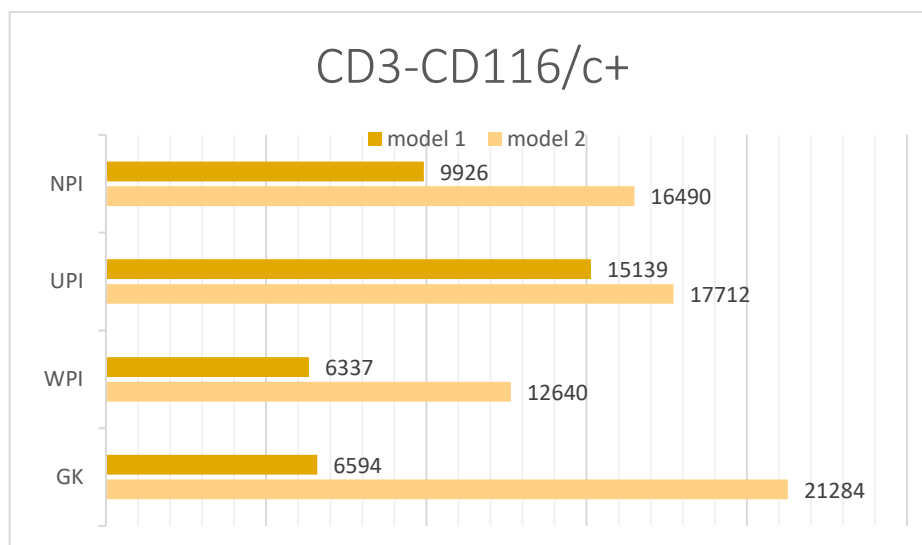
Ryc.8. Mediany rozkładu CD3+CD8+ w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.

Mediany rozkładu CD4+CD8+ są wyższe w modelu 1 we wszystkich grupach trenujących. Jednak stwierdzone różnice między modelami nie mogą być uznane za statystycznie istotne na poziomie $p \leq 0,05$. Jedynie w grupie kontrolnej mediana rozkładu CD4+CD8+ w modelu 1 okazała się istotnie niższa od mediany w modelu 2, $p=0,005$ (Ryc.10).



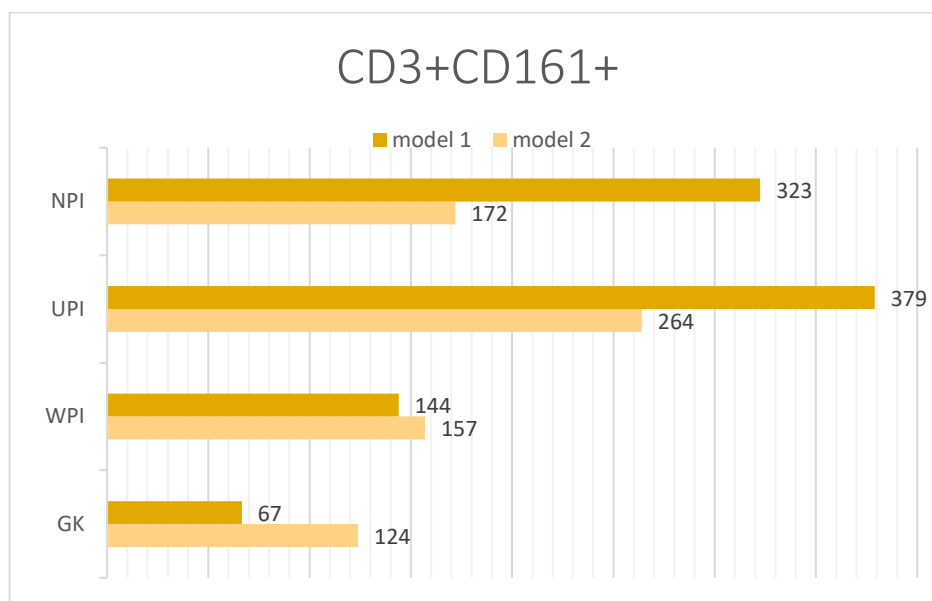
Ryc.9. Mediany rozkładu CD4+CD8+ w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.

We wszystkich rozpatrywanych grupach (łącznie z kontrolną) mediana rozkładu CD3-CD116/c+ jest wyższa w modelu 2. Jednak różnica między modelami jest statystycznie istotna tylko w grupie kontrolnej, gdzie $p=0,002$ (Ryc.11).



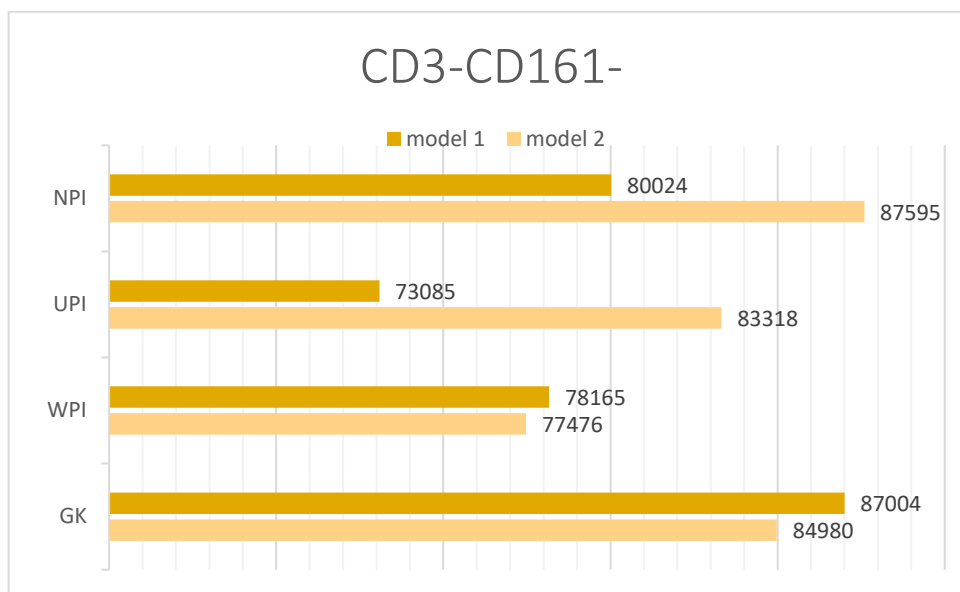
Ryc.10. Mediany rozkładu CD3-CD116/c+ w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.

W medianach rozkładu CD3+CD161+ zarówno w modelu 1 i 2 w grupach NPI oraz UPI nie występują istotne statystycznie różnice międzygrupowe (Ryc.12).



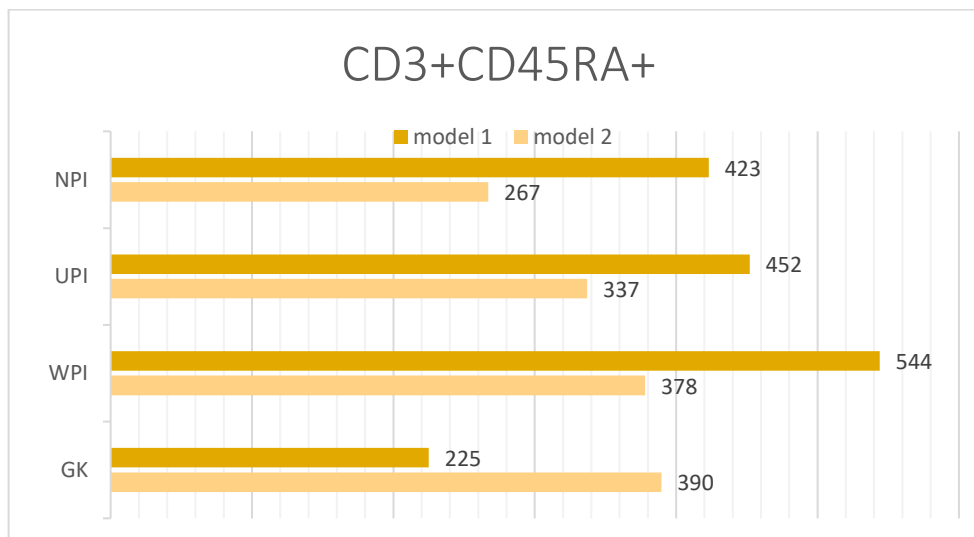
Ryc.11. Mediany rozkładu CD3+CD161+ w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.

Tylko w grupie UPI mediana rozkładu CD3-CD161- w modelu 2 jest istotnie wyższa od mediany w modelu 1 ($p=0,001$) (Ryc.13).



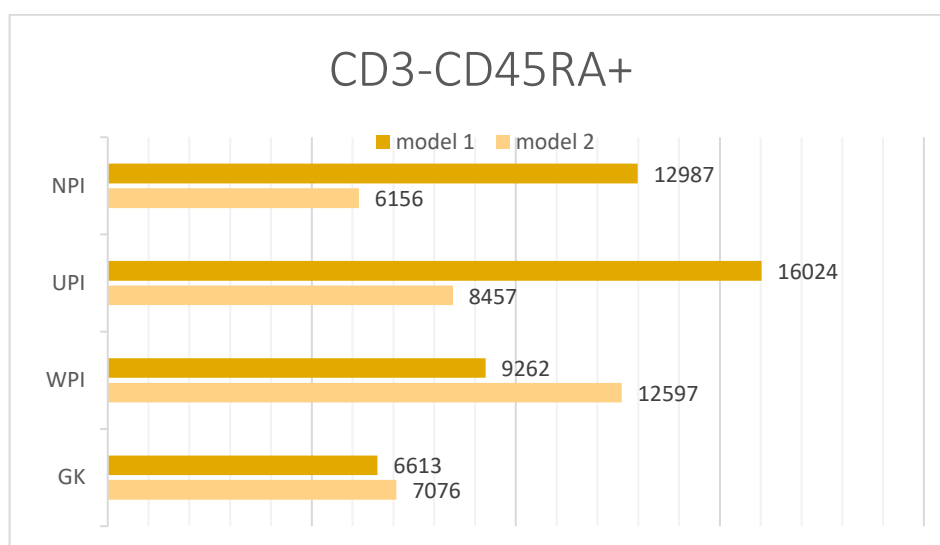
Ryc.12. Mediany rozkładu CD3-CD161- w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.

Mediany rozkładu CD3+CD45RA+ są większe w modelu 1 od median w modelu 2. Istotność różnic rozkładów między modelami stwierdzono tylko w grupach NPI ($p=0,044$) i UPI ($p=0,016$) (Ryc.14).



Ryc.13. Mediany rozkładu CD3+CD45RA+ - w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.

Mediany rozkładu CD3-CD45RA+ w modelu 1 są wyraźnie większe w grupach NPI i UPI, a mniejsze w grupie WPI. Stwierdzona różnica między modelami jest istotna statystycznie tylko w grupie UPI ($p=0,001$) (Ryc.15).



Ryc.14. Mediany rozkładu CD3-CD45RA+ - w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.

IV 3. Korelacje

Korelacje pomiędzy V, Ki-67, tunel, a wszystkimi CD inaczej wyglądają w modelu 1 i 2. Często różnią się nie tylko wielkością, ale również znakiem. Problem jednak w tym, że są to korelacje na ogół słabe i statystycznie nieistotne (dla $n=15$ w modelu 1 wartość krytyczna współczynnika korelacji $r_k(0,05) = 0,51$; w modelu 2, dla $n=25$, wynosi $r_k(0,05)=0,40$).

Tab.29. Współczynniki korelacji r-Pearsona. Wytłuszczono kolorem czerwonym korelacje najsilniejsze (choć statystycznie nieistotne).

Zmienna	MODEL 1	MODEL 2	MODEL 1	MODEL 2	MODEL 1	MODEL 2
	n=15	n=25	n=15	n=25	n=15	n=25
	V-sum		Ki-67		Tunel	
CD3+CD4+	0,14	0,32	0,08	-0,15	-0,07	0,06
CD3+CD8+	0,24	0,25	-0,07	-0,22	-0,19	0,13
CD4+CD8+	0,35	-0,08	0,05	-0,16	0,02	-0,02
CD3-CD116/c+	0,42	0,26	0,01	-0,16	0,45	-0,30
CD3+CD161+	0,50	-0,18	0,25	-0,23	0,16	0,17
CD3-CD161-	-0,13	-0,08	-0,15	0,25	-0,06	0,11

CD3+CD45RA+	0,49	-0,01	0,21	-0,21	0,09	0,33
CD3-CD45RA+	0,16	-0,08	0,27	-0,21	0,13	0,32

V WNIOSKI

Wyniki badań własnych sugerują, że regularnie podejmowany trening fizyczny wpływa protekcyjnie na ryzyko zachorowania i przebieg raka listwy mleczej u szczurów. W grupie trenującej, zarówno w modelu 1, jak i 2 występowała mniejsza liczba guzów nowotworowych w porównaniu z grupą kontrolną. Podejmowany trening fizyczny nie wpływał na wielkość guza oraz nie zwiększał ryzyka proliferacji wyindukowanych guzów. Natomiast zaobserwowano istotny wpływ treningu fizycznego na zmienną tunel, która wpływa na redukcję rozwoju nowotworu dzięki apoptozie komórek nowotworowych.

W prewencji pierwotnej nie zaobserwowano związku pomiędzy czasem indukcji guza od podejmowania treningu fizycznego i jego intensywności. W prewencji wtórnej czas indukcji guza był uzależniony od podejmowania treningu fizycznego. Różnica przeciętnego czasu indukcji guza między grupą trenującą i kontrolną wynosiła około 2 tygodnie.

Trening fizyczny oraz poziom jego intensywności wpływa na układ immunologiczny badanych szczurów, obserwacja odnosi się do modelu 1. Przeprowadzone badania sugerują mobilizację układu immunologicznego do walki z rakiem listwy mleczej poprzez wzrost liczebności poszczególnych frakcji limfocytów.

W badaniach własnych pomiędzy indukcją guza, jego wielkością, proliferacją i aktywnością apoptotyczną komórek nowotworowych, a poziomem subpopulacji limfocytów nie wykazano wspólnych zależności.

Między modelem prewencji pierwotnej, a modelem prewencji wtórnej występuje różnica w zakresie liczby wyindukowanych guzów nowotworowych w zależności od poziomu intensywności treningu fizycznego. W modelu 1 w grupie o średniej intensywności wysiłku występowała mniejsza liczba guzów nowotworowych w porównaniu z grupami o innym poziomie intensywności, co sugeruje korzystny wpływ treningu o umiarkowanej intensywności. Natomiast w modelu 2 średnia liczba wyindukowanych guzów na szczura nie wykazywała zależności od intensywności treningu.

Pomiędzy modelem prewencji pierwotnej, a modelem prewencji wtórnej istnieją różnice w zakresie proliferacji komórek. Trening fizyczny w modelu 1 niezależnie od poziomu jego intensywności nie wpływa na proliferację. Natomiast w modelu 2 ćwiczenia fizyczne w grupie o niskiej intensywności treningu nie zwiększają ryzyka proliferacji, a w grupie o umiarkowanej i wysokiej intensywności zwiększają ryzyko proliferacji komórek.

Zaobserwowano różnice między liczbą komórek apoptotycznych w zależności od poziomu intensywności treningu. Do zwiększenia apoptozy komórek nowotworowych w modelu prewencji pierwotnej dochodzi podczas ćwiczeń fizycznych o umiarkowanej intensywności, a w modelu prewencji wtórnej podczas ćwiczeń o wysokiej intensywności.

Poziom subpopulacji limfocytów w odniesieniu do poziomu treningu fizycznego wykazuje w modelu prewencji pierwotnej istotne różnice, a w modelu prewencji wtórnej występuje brak różnic. Trening fizyczny o umiarkowanej intensywności wpływa stymulująco na antynowotworową odpowiedź organizmu poprzez mobilizację układu immunologicznego do walki z komórkami nowotworowymi dzięki zwiększeniu liczby limfocytów.

VI PIŚMIENNICTWO

1. Brylińska J, Kwiatkowska J. Zwierzęta laboratoryjne – metody hodowli i doświadczeń. Wyd. Universitas, Kraków 1996.
2. Cardiff RD, Wellings SR. The Comparative Pathology of Human and Mouse Mammary Glands. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999, 4(1): 105–122.
3. Cleland V, Granados A, Crawford, D, Winzenberg, T, Ball, K. Effectiveness of interventions to promote physical activity among socioeconomically disadvantaged women: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev* 2013, 14(3): 197-212.
4. Cohen LA. Physical activity and cancer. *Cancer Prev* 1991, 26: 1-10.
5. Deptuła W, Gołąb J, Czarkowska – Paczek B, Przybylski J. Wpływ wysiłku fizycznego na układ immunologiczny człowieka. *Pol Arch Med Wewn* 2005, 14(4): 997-1001.
6. Deptuła W, Tokarz-Deptuła B, Stosik M. *Immunologia dla biologów*. W: US, Szczecin, 2008.
7. Didkowska J, Wojciechowska U, Zatoński W. Prognozy zachorowalności i umieralności na nowotwory złośliwe w Polsce do 2025 roku. Centrum Onkologii, Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie 2009.
8. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002, 3(11): 991-998.
9. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006, 6(11): 836-848.

- 10.** Fairey AS, Courneya KS, Field CJ, Bell GJ, Jones LW, Mackey JR. Effects of exercise training on fasting insulin, insulin resistance, insulin-like growth factors, and insulin-like growth factor binding proteins in postmenopausal breast cancer survivors: a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003, 12(8): 721-727.
- 11.** Fairey AS, Courneya KS, Field CJ, Bell GJ, Jones LW, Martin BS, Mackey JR. Effect of exercise training on C-reactive protein in postmenopausal breast cancer survivors: a randomized controlled trial. *Brain Behav Immun* 2005b, 19(5): 381–388.
- 12.** Fialka-Moser V, Grevenna R, Korpan M, Quittan M. Cancer Rehabilitation: particularly with aspects on physical impairments. *J Rehab Med* 2003, 35(4): 153-162.
- 13.** Gałka A, Świątoniowska N, Kolasińska J, Hańczyc P, Jankowska-Polańska B. Assessment of the quality of life of women with breast cancer depending on the surgical treatment method used. *Palliat Med Pract* 2018, 12(2): 76–85.
- 14.** Gleeson M, Bishop NC. The T cell and NK cell immune response to exercise. *Ann Transplant* 2005, 10(4): 43-8.
- 15.** Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T. *Immunologia*. W: PZWL, Warszawa 2012.
- 16.** Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T. *Immunologia*. W: PWN, Warszawa 2017.
- 17.** Hackshaw AK, Paul EA. Breast self-examination and death from breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003, 88(7): 1047-1053.
- 18.** Hakem R, De la Pompa JL, Sirard C, Mo R, Woo M, Hakem A, Wakeham A, Potter J, Reitmair A, Billia F, Firpo E, Hui CC, Roberts J, Rossant J, Mak TW. The tumor suppressor gene *Brcal* is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell* 1996, 88(7): 1009-1023.
- 19.** Jassem J, Krzakowski M, Bobek-Billewicz B, Duchnowska R, Jeziorski A, Olszewski W, Senkus-Konefka E, Tchórzewska-Korba H, Wysocki P. Breast cancer. *Oncol Clin Pract* 2018, 14(4): 171-215.
- 20.** Jokiel M, Bielska-Lasota M. Czynniki ryzyka raka piersi - możliwości profilaktyki pierwotnej. *Przegl Epidemiol* 2010, 64(3): 435-438.

- 21.** Kaaks R, Rinaldi S, Key TJ, Berrino F, Peeters PH, Biessy C, Dossus L, Lukanova A, Bingham S, Khaw KT, Allen NE, Bueno-de-Mesquita HB, Van Gils CH, Grobbee D, Boeing H, Lahmann PH, Nagel G, Chang-Claude J, Clavel-Chapelon F, Fournier A, Thiébaud A, González CA, Quirós JR, Tormo MJ, Ardanaz E, Amiano P, Krogh V, Palli D, Panico S, Tumino R, Vineis P, Trichopoulou A, Kalapothaki V, Trichopoulos D, Ferrari P, Norat T, Saracci R, Riboli E. Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Endocr Relat Cancer* 2005, 12(4): 1071-1082.
- 22.** Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 2002, 94(8): 606-616.
- 23.** Ko EY, Lee SH, Kim HH, Kim SM, Shin MJ, Kim N, Gong G. Evaluation of tumor angiogenesis with a second generation US contrast medium in a rat breast tumor model. *Korean J Radiol* 2008, 9(3): 243–249.
- 24.** Krajowy Rejestr Nowotworów. Polskie Towarzystwo Onkologiczne. Dostęp: http://onkologia.org.pl/raporty/#tabela_rok_
- 25.** Kruk J. Physical activity and breast cancer. W: Ransdall L, Pettichkoff L (red), Ensuring the health of active and athletic girls and women. NAGW, USA, 2005, ss. 109-144.
- 26.** Kurowski M, Kowalski ML. Wpływ wysiłku fizycznego na odpowiedź immunologiczną – wybrane zagadnienia. *Alergia Astma Immunologia* 2014, 19(3): 144-149.
- 27.** Kushi LH, Doyle C, McCullough M, Rock CL, Demark-Wahnefried W, Bandera EV, Gapstur S, Patel AV, Andrews K, Gansler T. American Cancer Society guidelines on nutrition and physical activity cancer prevention: reducing the risk of cancer with healthy food choices and physical activity. *CA Cancer J Clin* 2012, 62(1): 30-67.
- 28.** Litwiniuk M, Kara I. Aktywność fizyczna a nowotwory. *Onco Review* 2012, 2(4): 228-233.
- 29.** Mackiewicz J, Mackiewicz A. Immunoterapia nowotworów i perspektywy jej rozwoju. *Contemp Oncol*, 2010, 14(2): 59-71.

- 30.** Makowski M, Połać I, Petryński T. Oestrogens and breast cancer. *Menopause Review* 2007, 6(3):150-154.
- 31.** Malczyk E, Majkrzak Ż. Wybrane elementy stylu życia a ryzyko rozwoju raka piersi. *Probl Hig i Epidemiol* 2014, 95(4): 827-830.
- 32.** Malicka I, Pawłowska K. Aktywność ruchowa w prewencji pierwotnej i wtórnej raka piersi. *Rehabilitacja Medyczna* 2008, 12(1): 32-38.
- 33.** Malicka I, Siewierska K, Pula B, Kobierczyki C, Haus D, Pasławska U, Cegielski M, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M, Woźniewski M. The effect of physical training on the N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis of Sprague–Dawley rats. *Exp Biol Med* 2015, 240(11): 1408-1415.
- 34.** McNeely ML, Binkley JM, Pusic AL, Campbell KL, Gabram S, Soballe PW. A prospective model of care for breast cancer rehabilitation: postoperative and postreconstructive issues. *Cancer* 2012, 118(S8): 2226-2236.
- 35.** McTiernan A, Kooperberg C, White E, Wilcox S, Coates R, Adams-Cambell LL, Woods N, Ockene J. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women. The womens health initiative cohort study. *JAMA* 2003, 290(10): 1331–1336.
- 36.** Michishita R, Shono N, Inoue T, Tsuruta T, Node K. Effect of exercise therapy on monocyte and neutrophil counts in overweight women. *Am J Med Sci* 2010, 339(2): 152-156.
- 37.** Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer* 2019, 11: 151-164.
- 38.** Nieman DC. Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. *Med Sci Sports Exerc* 1994, 26(2): 128-139.
- 39.** Niemiec J, Ryś J. Morfologia i immunocharakterystyka raka piersi w świetle nowych poglądów na temat karcinogenezy. *Pol J Pathol* 2009, 3(1): 1–9.
- 40.** Nienartowicz E. Diagnostyka mammograficzna raka piersi. W: Kornafel J (red), Rak piersi. CMKP, Warszawa, 2011, ss. 35-43.
- 41.** Okumatsu K, Tsujimoto T, Wakaba K, Seki A, Kotake R, Yamauchi T, Hirayama S, Kobayashi H, Yamauchi H, Tanaka K. Effects of a combined exercise plus diet

program on cardiorespiratory fitness of breast cancer patients. *Breast Cancer* 2019, 26(1): 65-71.

42. Peake MJ. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exerc Immunol Rev* 2002, 8:49-100.

43. Podhorska-Okołów M, Krajewska B, Carraro U, Zabel M. Apoptosis in mouse skeletal muscles after physical exercise. *Folia Histochem Cytobiol* 1999, 37(2): 127–128.

44. Pula B, Malicka I, Pawlowska K, Paslawska U, Cegielski M, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, Wozniowski M. Immunohistochemical characterization of N-Methyl-N-Nitrosourea-induced mammary tumours of Sprague–Dawley rats. *In Vivo* 2013, 27(6): 793–802.

45. Russo J, Russo IH. Atlas and histologic classification of tumors of the rat mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2000, 5(2):187–200.

46. Saez MC, Barriga C, Garcia JJ, Rodriguez AB, Ortega E. Exercise-induced stress enhances mammary tumor growth in rats: beneficial effect of the hormone melatonin. *Mol Cell Biochem* 2007, 294(1-2): 19-24.

47. Steppich B, Dayyani F, Gruber R, Lorenz R, Mack M, Ziegler-Heitbrock HW. Selective mobilization of CD14(+)CD16(+) monocytes by exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000, 279(3): 578-586.

48. Szkiela M, Worach-Kardas H, Marcinkowski JT. Nowotwór złośliwy piersi – epidemiologia, czynniki ryzyka, znaczenie profilaktyki pierwotnej i wtórnej. *Probl Hig Epidemiol* 2014, 95(2): 292-302.

49. Thompson HJ. Effect of exercise intensity and duration on the induction of mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 1994, 54(7): 1960-1963

50. Verloop J, Rookus MA, Kooy K, Leeuwen FE. Physical activity and breast cancer risk in women aged 20-54 years. *J Natl Cancer Inst* 2000, 92(2): 128-135.

51. Vona-Davis L, Howard-McNatt M, Rose DP. Adiposity, type 2 diabetes and the metabolic syndrome in breast cancer. *Obes Rev* 2007, 8(5): 395-408.

52. Wang M, Yu B, Westerlind K, Strange R, Khan G, Patil D, Boeneman K, Hilakivi-Clarke L. Prepubertal physical activity up-regulates estrogen receptor beta, BRCA1 and

p53 mRNA expression in the rat mammary gland. *Breast Cancer Res Treat* 2009, 115(1): 213–220.

53. Westerlind KC, McCarty HL, Schultheiss PC, Story R, Reed AH, Baier ML, Strange R. Moderate exercise training slows mammary tumour growth in adolescent rats. *Eur J Cancer Prev* 2003, 12(4): 281–287.

54. Whittal-Strange KS, Chadan S, Parkhouse WS. Exercise during puberty and NMU induced mammary tumorigenesis in rats. *Breast Cancer Res Treat* 1998, 47(1): 1-8.

55. Winters-Stone KM, Bennett JA, Nail L, Schwartz A. Strength, physical activity, and age predict fatigue in older breast cancer survivors. *Oncol Nurs Forum* 2008, 35(5): 815-821.

56. Wojciechowska U, Czaderny K, Ciuba A, Olasek P, Didkowska J. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2016 roku. Krajowy Rejestr Nowotworów. Warszawa, 2018. Dostęp: http://onkologia.org.pl/wp-content/uploads/Nowotwory_2016.pdf.

57. Wojciechowska U, Didkowska J, Michałek I, Olasek P, Ciuba A. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2018 roku. Warszawa: Polish National Cancer Registry; 2020. Dostęp: http://onkologia.org.pl/wp-content/uploads/Nowotwory_2018.pdf.

58. World Health Organization. International agency for research on cancer. Cancer Tomorrow. Dostęp: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/>.

59. Woźniewski M. Kultura fizyczna w życiu ludzi chorych na nowotwory złośliwe. *Adv Clin Exp Med* 2002, 11(1): 103-108.

60. Woźniewski M. Aktywność ruchowa u chorych na nowotwory złośliwe. W: Murawska-Ciałowicz E, Zatoń M (red), Znaczenie aktywności ruchowej dla zdrowia. AWF, Wrocław, 2005: 139-154.

61. Woźniewski M. Kultura fizyczna w życiu ludzi chorych na nowotwory złośliwe. *Adv Clin Exp Med* 2002, 11(1): 103-108.