

AKADEMIA WYCHOWANIA FIZYCZNEGO  
WE WROCŁAWIU

Aneta Monika Łomnicka

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

Rozprawa doktorska wykonana w *Zakładzie Fizjoterapii w Medycynie  
Zabiegowej i Onkologii, Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu.*

Promotor:  
Dr hab. Iwona Malicka, prof. AWF

WROCŁAW 2021

## Spis treści

<b>I WSTĘP</b> .....	<b>8</b>
<b>I 1. Rak piersi</b> .....	<b>8</b>
I 1.1. Epidemiologia raka piersi .....	8
I 1.2. Profilaktyka raka piersi .....	10
I 1.2.1. Profilaktyka pierwszej fazy (pierwotna) .....	11
I 1.2.2. Profilaktyka drugiej fazy (wtórna, badania diagnostyczne) .....	14
I 1.2.3. Profilaktyka trzeciej fazy (wtórna, redukcja zaburzeń czynnościowych i powikłań wynikających z choroby, zapobieganie nawrotom).....	16
I 1.3 Rola aktywności fizycznej w profilaktyce raka piersi .....	17
<b>I 2. Układ immunologiczny</b> .....	<b>22</b>
I 2.1. Budowa i funkcje układu immunologicznego.....	22
I 2.2. Populacje i subpopulacje limfocytów .....	23
I 2.3. Rola układu immunologicznego w patogenezie i progresji chorób nowotworowych .....	26
I 2.4. Wpływ aktywności fizycznej na układ immunologiczny .....	30
<b>I 3. Rola badań eksperymentalnych w ocenie wpływu aktywności fizycznej na rozwój raka piersi</b> .....	<b>32</b>
<b>II CEL PRACY</b> .....	<b>35</b>
<b>II 1. Pytania badawcze</b> .....	<b>35</b>
<b>II 2. Hipotezy badawcze</b> .....	<b>35</b>
<b>III MATERIAŁ BADAWCZY I METODY</b> .....	<b>36</b>
<b>III 1. Zwierzęta – charakterystyka materiału badanego</b> .....	<b>36</b>
<b>III 2. Metody badawcze</b> .....	<b>39</b>
III 2.1. Indukcja i wykrywanie raka listwy mlecznej .....	39

III 2.2. Trening fizyczny.....	40
III 2.3. Pobranie tkanek .....	40
III 2.4. Histopatologia.....	41
III 2.5. Mikromacierze tkankowe (TMA).....	41
III 2.6. Immunohistochemia (IHC) - proliferacja .....	42
III 2.7. Tunel.....	43
III 2.8. Ocena reakcji IHC .....	44
III 2.9. Cytometria przepływowa.....	44
<b>III 3. Metody statystyczne .....</b>	<b>46</b>
<b>IV WYNIKI.....</b>	<b>47</b>
<b>IV 1. Grupa trenująca vs grupa kontrolna.....</b>	<b>47</b>
IV 1.1. Indukcja guzów .....	47
IV 1.2. Objętość guzów, poziom proliferacji i apoptozy .....	52
IV 1.3. Poziom subpopulacji limfocytów .....	55
<b>IV 2. Poziom treningu fizycznego .....</b>	<b>58</b>
IV 2.1. Indukcja guzów .....	58
IV 2.2. Objętość guzów, poziom proliferacji i apoptozy .....	65
IV 2.3. Poziom subpopulacji limfocytów .....	69
<b>IV 3. Korelacje.....</b>	<b>76</b>
<b>V DYSKUSJA .....</b>	<b>77</b>
<b>VI WNIOSKI.....</b>	<b>92</b>
<b>VII PIŚMIENNICTWO .....</b>	<b>94</b>
<b>STRESZCZENIE.....</b>	<b>113</b>
<b>SPIS RYCIN I TABEL: .....</b>	<b>120</b>
<b>SPIS RYCIN:.....</b>	<b>120</b>

<b>SPIS TABEL:</b> .....	<b>121</b>
<b>ZALĄCZNIK</b> .....	<b>123</b>

## WYKAZ SKRÓTÓW

- **ACR** - American Collage of Radiology, Amerykańskie Towarzystwo Radiologiczne
- **AMPK** - 5'AMP-activated protein kinase, enzym - kinaza aktywowana 5'AMP
- **BCR** – B-cell receptor, receptor limfocyt B, receptor immunoglobulinowy
- **BIRADS** - breast imaging reporting and data system, system standaryzacji opisów badań diagnostycznych piersi
- **BMI** - body mass index, wskaźnik masy ciała
- **BRCA1** - gen (ludzki, supresorowy)
- **BRCA2** - gen (ludzki)
- **BSA** - bufor blokujący, albuminy surowicy bydłęcej
- **CCL22** - C-C motif chemokine 22, białko z grupy chemokin CC kodowane u człowieka przez gen CCL22
- **CD** - subpopulacje limfocytów
- **CRP** - C-reactive protein, białko C-reaktywne
- **CTL** - cytotoxic T lymphocytes, limfocyty T cytotoksyczne
- **DNA** - kwas deoksyrybonukleinowy
- **FACS** - fluorescence activated cell sorting, cytometria przepływowa
- **GK** - grupa kontrolna
- **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** - nadtlenek wodoru
- **IFN- $\gamma$**  - interferon gamma
- **IgA** – immunoglobuliny A, przeciwciała
- **IGF** - insulin-like growth factor, insulinopodobny czynnik wzrostu
- **IGF-1** - insulin-like growth factor 1, insulinopodobny czynnik wzrostu 1
- **IgG** - immunoglobuliny G, przeciwciała
- **IgM** - immunoglobuliny M, przeciwciała
- **IHC** - immunohistochemia
- **IL-1** - interleukina 1
- **IL-4** - interleukina 4

- **IL-6** - interleukina 6
- **IL-10** - interleukina 10
- **Ki-67** - proliferacja guzów
- **KRN** - Krajowy Rejestr Nowotworów
- **M1** - makrofagi aktywowane klasycznie, posiadające właściwości prozapalne
- **M2** - makrofagi aktywowane alternatywnie, posiadające właściwości przeciwzapalne
- **MBC** - male breast cancer, rak piersi u mężczyzn
- **MDSC** - myeloid-derived suppressor cells, komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego
- **MET** - ekwiwalent metaboliczny
- **MHC** - główny układ zgodności tkankowej
- **MHC 1** - antygeny zdolności tkankowej klasy I
- **MHC 2** - antygeny zdolności tkankowej klasy II
- **MIB-1** - przeciwciało przeciwko Ki-67
- **MIP-1  $\alpha$**  - białko zapalne makrofagów
- **MNU** - N-metylo N-nitrozomocznik
- **n** – liczba
- **NaCl** – chlorek sodu
- **NK** - natural killer, naturalni zabójcy, należą do limfocytów, czyli komórek układu odpornościowego
- **NKT** - natural killer T-cells, subpopulacja limfocytów T, komórek układu odpornościowego
- **NPI** - grupa z niskim poziomem intensywności treningu
- **p** - poziom istotności
- **PBS** - bufor, buforowana fosforanem sól fizjologiczna
- **PCNA** - proliferating cell nuclear antigen, antygen jądrowy komórki proliferującej
- **pH** - parametr wody, ujemny logarytm stężenia jonów wodorowych
- **Post hoc** - testy porównań wielokrotnych

- **PTEN** - phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, MMAC1, mutated in multiple advanced cancers 1, ludzkie białko kodowane przez gen supresorowy PTEN zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 10.
- **RM** – rezonans magnetyczny
- **SHBG** - sex hormon binding globulin, stężenia globuliny wiążącej hormony płciowe
- **TAM** - receptory tyrozyny kinaz
- **Tc** - limfocyty cytotoksyczne
- **TCR** - T-cell receptor, receptor limfocyту T
- **TDLU** - terminal duct lobular unit, jednostką przewodowo-zrazikową
- **TEBs** - terminal end buds, pąki końcowe
- **Th** - limfocyty pomocnicze
- **TIL**– limfocyty naciekające guz
- **Tm** - limfocyty pamięci
- **TMA** - tissue microarray, mikromacierze tkankowe
- **TNF-  $\alpha$**  - tumor necrosis factor  $\alpha$ , czynnik martwicy nowotworów
- **TP53** - gen położony na chromosomie 17
- **Treg** - limfocyty regulatorowe
- **Tunel** - apoptoza guzów
- **UPI** - grupa z umiarkowanym poziomem intensywności treningu
- **UPSTF** - United States Preventive Services Task Force, Amerykańska Grupa Zadaniowa ds. Usług Prewencyjnych
- **USG** - ultrasonografia
- **V** - objętość guzów
- **VEGF-A** – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego
- **VO<sub>2</sub>max** - pułap tlenowy
- **WHO** - World Health Organization, Światowa Organizacja Zdrowia
- **WPI** - grupa z wysokim poziomem intensywności trening

## I WSTĘP

### I 1. Rak piersi

Rak piersi (carcinoma mammae) to najczęściej używana nomenklatura, zamiennie stosuje się również nazwę: rak sutka oraz rak gruczołu sutkowego. Rak piersi to nowotwór złośliwy powstający z komórek gruczołu piersiowego w tkankach piersi, zazwyczaj w przewodach mlekowych lub zrazikach. Nowotwór ten daje przerzuty do węzłów chłonnych, a także do narządów wewnętrznych takich jak: płuca, wątroba, kości, mózg.

#### I 1.1. Epidemiologia raka piersi

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). Dane epidemiologiczne wskazują, że najniższa zachorowalność na nowotwór piersi występuje w Afryce i Azji południowo - wschodniej (<25/100 000), średnia zachorowalność występuje w Europie środkowej i wschodniej, a najwyższa zachorowalność, ponieważ



aż ok. 90-100/100 000 występuje w krajach północnej i zachodniej Europy, Ameryce Północnej i Australii (Momenimovahed i Salehiniya, 2019).

Polska należy do krajów o średniej zachorowalności na raka piersi, rejestruje się jednak tendencję wzrostową. Zachorowalność na nowotwory złośliwe piersi w ciągu ostatnich trzech dekad wzrosła ponad 2-krotnie (Wojciechowska i Didkowska, 2020). Widoczny gwałtowny wzrost zachorowania i zgonów wiązany jest z długością życia. Przeciętna długość życia w Polsce w okresie ostatnich dekad znacznie wzrosła. W kwestii raka piersi sytuacja w Polsce w roku 2001 przedstawiała się następująco: 12 118 przypadków zachorowania i 4 825 zgonów, w 2011 roku liczba zachorowania wzrosła do 16 534 i 5 437 zgonów (Szkiela i wsp., 2014). Liczba zgonów w przeciągu ostatnich 50 lat w Polsce z powodu chorób nowotworowych wzrosła 2,4-krotnie, co stanowi o około 10% wyższą umieralność niż w innych Krajach Europejskich (Wojciechowska i wsp., 2018).

Zachorowalność na raka piersi w Polsce jest zróżnicowana ze względu na województwa. Dane pochodzące z 2016 roku z Krajowego Rejestru Nowotworów (KRN) wskazują, że najwyższą zachorowalność na raka piersi obserwuje się w województwie wielkopolskim (66.2%), łódzkim (62.7%) oraz dolnośląskim (62.0%). Kobiety z terenów wysoko zurbanizowanych 1,5-krotnie częściej chorują, w porównaniu do mieszkanek terenów wiejskich. Najniższa zachorowalność na raka piersi występuje w województwie podkarpackim (38.9%), małopolskim (46.6%) oraz opolskim (47.1%). Umieralność tak jak zachorowalność jest zróżnicowana ze względu na poszczególne województwa. Najwyższa umieralność w 2016 roku na raka piersi występowała w województwie wielkopolskim (17.3%), śląskim (16.2%), mazowieckim (16.1%). Z kolei najniższa umieralność na raka piersi: w województwie opolskim (11.1%), podlaskim (11.2%), lubelskim (12.4%) (Wojciechowska i wsp., 2018).

Polska w aspekcie 5-letnich przeżyć kobiet chorych na raka piersi plasuje się na tle innych krajów europejskich dużo gorzej, albowiem zajmuje jedno z ostatnich miejsc. Prawdopodobieństwo przeżycia w Polsce w porównaniu do średnich europejskich po roku od postawienia diagnozy jest mniejsze o 4 punkty procentowe, a po 5 latach o 10 punktów

procentowych. Jednym z powodów jest spory odsetek nowotworów rozpoznawanych za późno, co prowadzi do pogorszenia rokowania. Kolejną przyczyną jest dostępność opieki onkologicznej, niższa liczba badań profilaktycznych.

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. Szacuje się, że w 2025 roku liczba zgonów wyniesie około 768 761, a w roku 2040 liczba ta wzrośnie do 1 040 813 przypadków (World Health Organization, online). Według badań epidemiologicznych prowadzonych przez KRN ocenia, że w 2025 roku liczba zachorowań na nowotwory piersi w Polsce będzie o ponad 50% większa niż obserwowana w 2006 roku (Didkowska i wsp., 2009). Szacuje się, że największa liczba zachorowań wystąpi u kobiet po 50 roku życia, z czego ponad połowa zachorowań wystąpi w przedziale wiekowym 50-69 lat. Zmianie ulegnie również proporcja zgonów przypadająca na poszczególne grupy wiekowe. Ocenia się, że w 2025 roku liczba zgonów z powodu raka piersi ulegnie spadkowi do 30% w grupie przed 70 rokiem życia, natomiast 70% zgonów wystąpi u starszych kobiet po 70 roku życia (Didkowska i wsp., 2009).

## **I 1.2. Profilaktyka raka piersi**

Priorytetem dla wszystkich kobiet powinno być wprowadzenie do codziennego życia zaleceń dotyczących profilaktyki I, II i III fazy. Oprócz działań profilaktycznych bardzo ważne jest posiadanie wiedzy na temat czynników ryzyka raka piersi, ponieważ często przyczyną zbyt późnego rozpoznania choroby jest brak wiedzy. Podstawową wiedzę o raku piersi powinna posiadać każda kobieta, aby mieć szansę na jak najszybsze wykrycie nowotworu, a tym samym mieć możliwość na całkowite wyleczenie.

### I 1.2.1. Profilaktyka pierwszej fazy (pierwotna)

Zadaniem profilaktyki pierwszej fazy (pierwotnej) jest redukcja zachorowalności na raka piersi, którą można osiągnąć dzięki zmianie lub / i wykluczeniu czynników ryzyka. Na pewne czynniki ryzyka nie mamy wpływu lecz znaczną część z nich można modyfikować.

Największym czynnikiem ryzyka raka piersi jest wiek i płeć. Ryzyko zachorowania na raka piersi zwiększa się wraz z wiekiem. Szacuje się, że ryzyko rozwoju nowotworu piersi w życiu kobiety stanowi 12%. Zarazem w ostatnich latach obserwuje się wzrost zachorowań na raka piersi u kobiet młodych jednak przy zmniejszonej umieralności z jego powodu. U kobiet w średnim wieku zauważalny jest wzrost zachorowalności przy stałych współczynnikach umieralności. Należy podkreślić, że najliczniejszą grupę, bo aż 32% kobiet cierpiących na raka gruczołu piersiowego stanowią kobiety w średnim wieku tj. 50 – 59 lat (Momenimovahed i Salehiniya, 2019). Ryzyko raka piersi związane jest również z płcią. Jest to nowotwór występujący głównie u kobiet, natomiast u mężczyzn rak piersi (MBC – male breast cancer) występuje bardzo sporadycznie, stanowi około 1% wszystkich przypadków raka piersi. Mutacja genu BRCA2 oraz zaburzenia metabolizmu estrogenów to najbardziej prawdopodobne czynniki ryzyka raka piersi u mężczyzn (Momenimovahed i Salehiniya, 2019).

Kolejnym czynnikiem ryzyka jest zwiększona ekspozycja na działanie estrogenów poprzez pojawienie się wczesnej pierwszej miesiączki tj. przed 12 rokiem życia oraz późnej menopauzy, tj. po 55 roku życia. Jako działanie prewencyjne należy zastosować zbilansowaną dietę, ponieważ pojawienie się pierwszej miesiączki uzależnione jest od modelu żywienia młodej kobiety, aby mogła wystąpić menstruacja i owulacja to minimalny poziom tkanki tłuszczowej musi wynosić 17% - 22% całkowitej masy ciała (Janssens i Vandeloo, 2009).

Kolejnym działaniem profilaktycznym zmniejszającym czas ekspozycji na estrogeny jest uprawianie sportu od najmłodszych lat. U dziewczynek podejmujących aktywność fizyczną pierwsza miesiączka pojawia się później (Janssens i Vandeloo, 2009).

Niska aktywność fizyczna oraz siedzący tryb życia również zaliczane są do czynników ryzyka raka piersi (Jokieli i Bielska-Lasota, 2010). Należy podkreślić, że podejmowanie wzmożonej aktywności fizycznej zmniejsza ryzyko wystąpienia tego nowotworu u aktywnych kobiet o 30% – 40% (Kruk, 2005).

Ponadto stwierdza się zależność pomiędzy wiekiem, w którym kobieta urodziła pierwsze dziecko a rakiem piersi. Kobiety bezdzietne w porównaniu z wieloródkami są znacznie bardziej narażone na wystąpienie raka piersi. Urodzenie pierwszego dziecka po 30 roku życia stanowi większe ryzyko, w porównaniu z kobietami, które urodziły pierwsze dziecko przed 30 rokiem życia (Makowski i wsp., 2007). Wpływ na powyższe czynniki wydaje się mało możliwy, jednak propagowanie wczesnego macierzyństwa szczególnie u kobiet z grup podwyższonego ryzyka jest możliwe do zrealizowania.

Większe ryzyko zachorowania istnieje także u kobiet, które zażywają hormonalne środki antykoncepcyjne lub stosowały je w przeciągu ostatnich 9 lat. Badania wskazują, że najbardziej narażone są kobiety, które przed dwudziestym rokiem życia stosowały antykoncepcję hormonalną. Trzeba w tym miejscu podkreślić, że wpływ tabletek antykoncepcyjnych na podwyższenie ryzyka rozwoju nowotworu piersi jest tematem licznych kontrowersji (Momenimovahed i Salehiniya, 2019).

Na rozwój raka piersi znaczący wpływ ma otyłość (BMI równe lub większe 30,0) (Malczyk i Majkrzak, 2014). Obserwuje się, że u kobiet po menopauzie z otyłością ryzyko zgonu jest wyższe aniżeli u kobiet których BMI jest prawidłowe. Wzrost ryzyka zachorowania na raka piersi może spowodować nieprawidłowy sposób odżywiania, charakteryzujący się dietą bogatą w cukry i tłuszcze zwierzęce. W ramach profilaktyki poleca się dietę niskokaloryczną zawierającą niewielką ilość tłuszczu zwierzęcego. Również zalecane jest spożywanie owoców i warzyw oraz produktów zawierających dużo witamin i błonnika (Jokieli i Bielska-Lasota, 2010). Kolejnym działaniem profilaktycznym wpływającym na normalizację masy ciała jest aktywność fizyczna.

Duże spożycie alkoholu prowadzi do 2 tysięcy rocznie nowych zachorowań na raka piersi (Malczyk i Majkrzak, 2014), dlatego należy ograniczyć jego konsumpcję. Palenie tytoniu zwiększa ryzyko zachorowania, które rośnie wraz z czasem palenia oraz

liczbą wypalanych papierosów, dlatego polecane jest ograniczenie lub całkowite zaprzestanie palenia wyrobów tytoniowych.

U młodych kobiet ekspozycja na promieniowanie jonizujące 2-krotnie zwiększa ryzyko raka piersi (Momenimovahed i Salehiniya, 2019).

Istotnym czynnikiem ryzyka jest predyspozycja rodzinna. 20 razy częściej chorują kobiety, u których występuje mutacja genu BRCA1 (w obszarze 17 chromosomu) oraz BRCA2 (w obszarze 13 chromosomu), mutacja ta odpowiedzialna jest za 5-10% przypadków raka piersi (Janssens i Vandeloo, 2009; Jokieli i Bielska-Lasota, 2010). Prawdopodobieństwo 25-80% zachorowania na raka piersi, czyli grupa najwyższego ryzyka występuje wśród kobiet, u których występuje np.: mutacja w obrębie genu BRCA1 lub BRCA2, występowanie u krewnych pierwszego oraz drugiego stopnia 3 lub więcej zachorowań na raka piersi lub jajnika, zdiagnozowanie raka synchronicznego lub metachronicznego u krewnych pierwszego stopnia. Prawdopodobieństwo 20–25% zachorowania na raka piersi, czyli grupa wysokiego ryzyka występuje wśród kobiet, u których występuje np.: zachorowanie matki we wczesnym wieku lub siostry przed 40 rokiem życia, 2 zachorowania u krewnych pierwszego i/lub drugiego stopnia na raka piersi i/lub jajnika, wykrycie u krewnych pierwszego stopnia raka metachronicznego (Jassem i wsp., 2018). Radykalnym działaniem zmniejszającym ryzyko rozwoju raka piersi nawet o 90%, w ramach profilaktyki pierwotnej jest obustronna mastektomia (Jokieli i Bielska-Lasota, 2010). Kolejnym działaniem w ramach profilaktyki pierwotnej redukującym ryzyko rozwoju raka piersi o 60–75% jest usunięcie w 35-40 roku życia przydatków połączone lub nie z histerektomią (Jokieli i Bielska-Lasota, 2010). Powyżej wymienione metody profilaktyki pierwotnej są jednak ciężkie do zaakceptowania w młodym wieku dla dużej części kobiet. Do działań profilaktyki pierwotnej w grupie kobiet z najwyższego uwarunkowanego dziedzicznie ryzyka w celu zmniejszenia ryzyka rozwoju raka piersi stosuje się także tamoksyfen i raloksyfen. Lek hormonalny tamoksyfen ma szeroki zakres działania, ponieważ posiada zarówno właściwości antyestrogenowe jak i estrogenowe. Wywołuje on apoptozę komórek, a także jest inhibitorem angiogenezy. Twierdzi się, że w grupie kobiet z najwyższym genetycznie ryzykiem rozwoju raka piersi zastosowanie tamoksyfenu jest równie skuteczne jak zabieg adnektomii (profilaktyczne

usunięcie jajników i jajowodów) (Jokiel i Bielska–Lasota, 2010). Należy zaznaczyć, że lek ten nie wpływa na redukcję ryzyka zachorowania na raka jajnika, lecz niejednokrotnie podnosi ryzyko zachorowania na raka błony śluzowej macicy (Jokiel i Bielska–Lasota, 2010).

### **I 1.2.2. Profilaktyka drugiej fazy (wtórna, badania diagnostyczne)**

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.

Aby wykryć zmiany nawet nieme kliniczne stosuje się badanie mammograficzne. Swoistość mammografii wynosi 94-97%, a czułość 77-95% (Jassem i wsp., 2018). Badania mammograficzne obniżają o około 15% umieralność na raka piersi w grupie kobiet młodych (39-49 lat) oraz starszych (50-59 lat) (Nelson i wsp., 2009).

Polska Unia Onkologii rekomenduje przeprowadzanie badania mammograficznego co 2 lata u kobiet w wieku 50–69 lat. W grupie kobiet 40-49 lat rekomenduje się wykonywanie badania ewentualnie co 12-18 miesięcy w zależności od określanego ryzyka. Ryzyko szacowane jest na podstawie objawów oraz rodzinnego wywiadu (Jassem i wsp., 2018). Polska Unia Onkologii nie rekomenduje wykonywania badań mammograficznych w grupie kobiet 20-39 lat oraz 70 lat i więcej (Jassem i wsp., 2018).

Standaryzacji powinien podlegać opis badania mammograficznego. System BIRADS (Breast Imaging Reporting and Data System) został stworzony w 2003 roku przez Amerykańskie Towarzystwo Radiologiczne (ACR) do oceny 6 kategorii wniosków końcowych w opisie mammografii. U 95% kobiet wyniki badania w programie przesiewowym oznacza się jako BIRADS 1, co znaczy, że są prawidłowe (Nienartowicz, 2011). Dodatkowych badań obrazowych wymagają BIRADS 0 (zmiany niejednoznaczne),

BIRADS 2 (zmiany łagodne), BIRADS 3 (zmiany prawdopodobnie łagodne), BIRADS 4 (wymagają biopsji, zmiany prawdopodobnie złośliwe), BIRADS 5 (zmiany radiologicznie złośliwe), BIRADS 6 (nie dotyczy badań skriningowych, rak piersi potwierdzony badaniem histopatologicznym) (Nienartowicz, 2011).

Uzupełniającą diagnostykę dedykowaną głównie dla kobiet młodych ze względu na gęste gruczołowe utkanie piersi stanowi badanie USG (ultrasonografia). To badanie umożliwia rozpoznanie struktur leżących blisko klatki piersiowej, na co nie pozwala mammografia. Również udostępnia ocenę przewodów mlecznych, różnicowanie zmian torbielowatych oraz litych. Dodatkowym atutem tego badania jest niski koszt jego wykonania, uniknięcie promieni rentgenowskich oraz pomoc przy wykonaniu biopsji, dzięki precyzyjnym obrazom (Nienartowicz, 2011).

Niezwykłe pomocny w wykluczeniu raka piersi jest RM (rezonans magnetyczny), który charakteryzuje się wysoką czułością. RM umożliwia wnikliwe zobrazowanie morfologii piersi, nieprawidłowości ich architektury i odkrycie niewielkich guzków. Koszty wykonania RM są wysokie przez co nie jest to metoda skriningowa ogólnej populacji. Jednak rekomenduje się, aby to badanie wykonywać dla grupy kobiet z najwyższym i wysokim ryzykiem zachorowania na raka piersi (Jassem i wsp., 2018). Również zalecenia z 2010 roku Amerykańskiego Towarzystwa Onkologicznego rekomendują wykonywanie raz w roku mammografii RM u kobiet z grupy podwyższonego ryzyka raka piersi (kobiety ze stwierdzoną mutacją BRCA1, BRCA2, nosicielki mutacji genów TP53, PTEN, kobiety po radioterapii klatki piersiowej między 10-30 rokiem życia) (Smith i wsp., 2010).

Kolejnym bardzo ważnym nieinwazyjnym testem przesiewowym jest samobadanie piersi. Choć analizy wykazały, że samobadanie piersi nie wpłynęło na skuteczność wykrywania raka piersi nawet wśród kobiet przeszkolonych (Hackshaw i Paul, 2003), to zdecydowanie jego zaletą jest zachęcanie kobiet do dbania o własne zdrowie. Przekłada się to na poczucie kontroli, a także na zwiększoną ilość przeprowadzanych diagnostycznych biopsji (Kösters i Göttsche, 2003). Czułość badania palpacyjnego określa się na 12-41% (Nelson i wsp., 2009).

### **I 1.2.3. Profilaktyka trzeciej fazy (wtórna, redukcja zaburzeń czynnościowych i powikłań wynikających z choroby, zapobieganie nawrotom)**

U kobiet leczonych z powodu raka piersi może dochodzić do zaburzeń w obrębie wielu układów, przy czym najczęściej stwierdza się zaburzenia w odniesieniu do układu oddechowego, krążenia, ruchu i odpornościowego. W układzie oddechowym pojawiają się nieprawidłowości dotyczące wentylacji płuc. W trakcie radioterapii może dojść do obszernych uszkodzeń pęcherzyków płucnych oraz śródbłona w naczyniach. W wyniku zapalenia błon śluzowych może dojść do stanu zapalnego płuc. Najczęściej podczas badania funkcji płuc stwierdza się zmniejszenie pojemności życiowej i całkowitej pojemności płuc (Okumatsu i wsp., 2019). W układzie krążenia może dojść do pojawienia się mechanizmu kardiotoxyczności (Okumatsu i wsp., 2019). W układzie ruchu często dochodzi do dysfunkcji kończyny górnej po stronie operowanej (McNeely i wsp., 2012). W wyniku leczenia chirurgicznego stwierdza się ponadto zniekształcenia klatki piersiowej, które mogą wpływać na statykę tułowia i zaburzenia postawy ciała (nieprawidłowe ustawienie: barków, łopatek i trójkątów talii oraz powiększenie kifozy piersiowej), dodatkowo obserwuje się zmniejszenie zakresu ruchomości kręgosłupa i osłabioną czynność mięśni tułowia, co w konsekwencji doprowadza do dolegliwości bólowych pleców (McNeely i wsp., 2012). Na skutek radykalnego leczenia raka piersi pojawia się znaczące obniżenie jakości życia i samooceny związanej ze zmniejszeniem sprawności fizycznej, zdolności wysiłkowej i pogorszeniem funkcjonowania seksualnego (Gałka i wsp., 2018). Dodatkowo zaburzenia mogą odnosić się do układu odpornościowego. Działanie immunosupresyjne wykazują leki przeciwnowotworowe, np. po chemioterapii może dojść do obniżenia całkowitej liczby limfocytów, limfocytów T i B oraz NK. Obserwuje się także osłabienia aktywności limfocytów T bądź uszkodzenie czynności limfocytów T i B (Woźniewski, 2005). W wyniku leczenia raka piersi może nastąpić wzrost masy ciała związany z redukcją aktywności fizycznej, a także zmniejszeniem zdolności wysiłkowej.



W celu redukcji pojawiających się po leczeniu raka piersi wieloukładowych zaburzeń stosuje się fizjoterapię. Rozpoczyna się ona już przy łóżku pacjentki, na oddziałach szpitalnych, a następnie kontynuowana jest w formie ambulatoryjnej lub w ośrodkach stacjonarnych. Jej głównymi celami jest zwiększenie zakresu ruchomości w stawach obręczy barkowej i kończyny górnej po stronie operowanej, wzrost siły mięśniowej kończyn górnych, zapobieganie zastojowi chłonki po stronie operowanej oraz korekcje postawy ciała (Malicka i Pawłowska, 2008). Postępowanie fizjoterapeutyczne jest nieodłączną częścią leczenia w onkologii. Tworzy ono czynnik prewencji wtórnej dla ograniczeń fizycznych, jak i psychicznych. Fizjoterapia wraz z aktywnością fizyczną to również czynnik stanowiący o powrocie chorych na nowotory złośliwe do normalnego życia (Woźniewski, 2005). Regularne podejmowanie aktywności fizycznej zalecane jest u wszystkich chorych w każdej fazie choroby, leczonych radykalnie jak i paliatywnie, podczas terapii, jak i po jej zakończeniu.

### **I 1.3 Rola aktywności fizycznej w profilaktyce raka piersi**

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).

Niższe ryzyko zachorowania na raka piersi inwazyjnego oraz przedinwazyjnego u kobiet aktywnych fizycznie przez 5 lub więcej godzin w tygodniu wykazał Donnelly i wsp. (2011). Bernstein (2009) oraz McTiernan i wsp. (2003) wskazali z kolei na poziom intensywności wysiłku fizycznego. Bernstein wykazał, że zmniejszone o 20% ryzyko

zachorowania na raka piersi występuje u kobiet aktywnych, podejmujących minimum raz w tygodniu 60 minutową aktywność fizyczną o intensywności powyżej 6,7 MET, przez przynajmniej 1 rok (Bernstein, 2009). Natomiast 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 beczynności. 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. Poniżej przedstawiono najważniejsze potencjalne mechanizmy, które wydają się łączyć aktywność fizyczną z ryzykiem wystąpienia raka piersi i jego przebiegiem.

Udowodniono, że aktywność fizyczna wraz z dietą śródziemnomorską przyczynia się do obniżenia procesu zapalnego w organizmie poprzez obniżenie markera zapalnego CRP. Białko C-reaktywne (CRP, C-reactive protein) bierze udział w odpowiedzi immunologicznej, utrzymując się jego podwyższone stężenie przez długi okres czasu oznacza występujący w organizmie przewlekły stan zapalny. Zarazem wiadomo, że obecność czynników zapalnych w mikrośrodowisku guza ułatwia proliferację i migrację komórek nowotworowych oraz angiogenezę (Litwiniuk i Kara, 2012). Zaobserwowano, że podwyższone stężenie CRP u osób zdrowych zwiększa ryzyko raka płuca, nerki, jelita grubego i skóry (Allin i Nordestgaard, 2011). Z kolei u kobiet z rozpoznaniem raka piersi zwiększone stężenie CRP związane jest z mniejszą szansą na całkowite przeżycie (Pierce i wsp., 2009a).

Dowodzono, że stężenie cytokin prozapalnych: CRP, TNF- $\alpha$ , IL-6 zmniejsza się w organizmie pod wpływem umiarkowanej aktywności fizycznej (Litwiniuk i Kara, 2012). Jedną z wielu cytokin mających powiązanie z procesami zapalnymi jest adiponektyna, która pierwszy raz została opisana w 1995 roku. Komórki tłuszczowe produkują adiponektynę lecz jej ilość zależna jest od ilości tkanki tłuszczowej. Wzrost stężenia tej cytokiny zachodzi w momencie spadku ilości tkanki tłuszczowej. Adiponektyna sprawuje dodatkowo takie funkcje jak: działanie przeciwzapalne i antymitotyczne oraz hamowanie angiogenezy i proliferacji w liniach komórkowych raka piersi (Arditi i wsp., 2007).

Aktywność fizyczna pośrednio wpływa na wysokie stężenie adiponektyny. TNF- $\alpha$  i interleukina 6 (IL-6) regulują ekspresję genów i wydzielanie adiponektyny przez komórki tłuszczowe. Zmniejszenie ilości tkanki tłuszczowej powoduje spadek stężenia TNF- $\alpha$  i IL-6, co w efekcie prowadzi do wzrostu stężenia cytokiny: adiponektyny (Nicklas i wsp., 2005). Możliwy jest spadek stężenia TNF- $\alpha$  i IL-6 pod wpływem długotrwałej i regularnej aktywności fizycznej, niezależnie od zmniejszenia ilości tkanki tłuszczowej. Mechanizm ten nie został całkowicie opisany. Doniesienia wskazują jednak, że podejmowanie regularnej i umiarkowanej aktywności fizycznej powoduje normalizację równowagi między prozapalnymi a antyzapalnymi cytokinami (Litwiniuk i Kara, 2012). Należy pamiętać, że chwilowe zaostrzenie procesów zapalnych może być spowodowane przez nadmierny wysiłek fizyczny (Neilson i wsp., 2009).

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). Estrogeny oddziałują komórkotwórczo na gruczoł piersiowy, a także zapoczątkowują rozrost komórek (stymulacja proliferacji). Zmniejszenie czasu ekspozycji na estrogen można uzyskać dzięki podejmowaniu w młodym wieku aktywności fizycznej. Zależność tę przedstawił już w 1985 roku Frisch i wsp. wykazując istotnie niższe zachorowanie na nowotwór złośliwy piersi u absolwentek amerykańskiej uczelni, które podczas trwania studiów uprawiały lekkoatletykę, w porównaniu z absolwentkami, które tej dyscypliny nie uprawiały (Frisch i wsp., 1985). Podobne różnice wykazał Gajewski, przedstawiając znaczne różnice między zawodniczkami uprawiającymi w młodości sport,

a kobietami nietreningującymi. Zachorowalność na raka piersi u zawodniczek wynosiła 9,2/1000 kobiet, natomiast w grupie kobiet nietreningujących była znacznie wyższa, wynosiła 16,2/1000 kobiet (Gajweski, 1998). Wykazano, że podejmowanie między 10-15 rokiem życia rekreacyjnej aktywności fizycznej przyczynia się do obniżenia o 30-50% ryzyka zachorowania na raka piersi (Frisch i wsp., 1985; Verloop i wsp., 2000).

Aktywność fizyczna może opóźnić wiek wystąpienia pierwszej miesiączki. Im później pojawi się pierwsza miesiączka tym ryzyko zachorowania jest niższe (Janssens i Vandeloo, 2009 ; Jethon i Murawska-Ciałowicz, 2005). Zależność tę wykazano już w 1971, stwierdzając 75% wyższe ryzyko zachorowania na raka piersi u kobiet, które zaczęły miesiączkować przed 16 rokiem życia w porównaniu z kobietami, u których pierwsza miesiączka wystąpiła powyżej 16 roku życia (Staniszewski, 1971). Ponadto kobiety, których cykle owulacyjne są regularne, krótkie i częste mają większe ryzyko zachorowania na raka piersi (Jethon i Murawska-Ciałowicz, 2005). U kobiet przed menopauzą przypuszcza się, że aktywność fizyczna może zmniejszać liczbę cykli owulacyjnych, czego wynikiem jest niższe długotrwałe narażenie na endogenne estrogeny i obniżenie ryzyka rozwoju raka piersi (Friedenreich, 2011). U kobiet po menopauzie aktywność fizyczna może wpływać na poziom estrogenów endogennych poprzez obniżenie poziomu tkanki tłuszczowej. U osób otyłych tkanka tłuszczowa jest znaczącym źródłem estradiolu i estronu (Friedenreich, 2011). Aktywność fizyczna poprzez zredukowanie tkanki tłuszczowej oraz wzrost stężenia globuliny wiążącej hormony płciowe (SHBG) może także prawdopodobnie spowodować zmniejszenie stężenia testosteronu. Niejednoznaczne są jednak doniesienia na ten temat (Kaaks i wsp., 2005).

Aktywność fizyczna wpływa na masę ciała. Na przestrzeni ostatnich lat nadwaga stała się istotnym problemem epidemiologicznym w krajach o wysokim poziomie ekonomicznym (Malczyk i Majkrzak, 2014). Nie ulega wątpliwości, że otyłość oraz zespół metaboliczny znacznie podnoszą ryzyko wystąpienia niektórych nowotworów złośliwych w tym również raka piersi. Dostępne dane w literaturze wykazują zwiększenie ryzyka zachorowania na raka piersi u kobiet otyłych, w porównaniu z kobietami szczupłymi, znaczenie odgrywa wartość wskaźnika BMI (body mass index) (Jassem i wsp., 2018). Zarazem wiadomo, że u kobiet otyłych występuje podwyższone stężenie estrogenów, które

w okresie prokreacyjnym produkowane są przez jajniki, natomiast w okresie pomenopauzalnym produkowane są przez tkankę tłuszczową (narząd o dokrewnym wydzielaniu substancji). Wyższe ryzyko wystąpienia kancerogenezy w gruczole piersiowym występuje w efekcie wydłużonej ekspozycji na działanie estrogenów. Zaburzenia metaboliczne są następstwem nieprawidłowego wydzielania takich substancji jak: hormony płciowe, insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF), leptyny, angiotensyny i adiponektyny. Powyższe substancje są wydzielane przez adipocyty (Malczyk i Majkrzak, 2014). Badania Rosato i wsp. pokazują, że u kobiet z zawyżoną masą ciała o wiele częściej występuje zespół metaboliczny, który szczególnie w wieku pomenopauzalnym przyczynia się do rozwoju raka piersi (Rosato i wsp., 2011). Warto podkreślić, że regularnie podejmowana aktywność fizyczna może zredukować otyłość. Hiperinsulinemia wpływa na zmniejszenie stężenia SHGB i wzrost biodostępności kancerogennych hormonów płciowych, a insulina w liniach komórkowych raka piersi ma działanie mitogenne i synergistyczne z estrogenami. Wrażliwość tkanek na działanie insuliny, może zwiększyć się dzięki aktywności fizycznej redukując przy tym prawdopodobieństwo wystąpienia cukrzycy typu 2 (Vona–Davis i wsp., 2007). W metaanalizie wykazano powiązanie cukrzycy z rakiem piersi, ponieważ kobiety chore na cukrzycę typu 2 mają 16% wzrost ryzyka wystąpienia raka piersi (Larsson 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- $\alpha$  i z obniżeniem stężenia adiponektyny (Vona–Davis i wsp., 2007). Grupa naukowców na podstawie przeprowadzonych badań na grupie 50 samic myszy wyciągnęła przypuszczenia, że trening fizyczny wywołuje zmiany w insulinie IGF-1 i kortykosteronie, co stanowi mechanizm podtrzymujący homeostazę glukozy w odpowiedzi na rosnący wydatek energetyczny związany z ruchem (Zongjian i wsp., 2008).

Aktywność fizyczna w sposób pośredni może wpłynąć na dobre prozdrowotne zachowania, takie jak: właściwa dieta, ograniczenie spożycia alkoholu lub całkowita jego eliminacja, całkowite zaprzestanie palenia tytoniu lub jego ograniczenie. Ocenia się, że modyfikacja stylu życia, może zmniejszyć ryzyko zachorowania na raka piersi (Jassem i wsp., 2018).

## I 2. Układ immunologiczny

### I 2.1. Budowa i funkcje układu immunologicznego

Układ immunologiczny zawiera szereg narządów limfatycznych, naczynia limfatyczne oraz komórki biorące udział w reakcjach odpornościowych, a także wydzielane przez nie przeciwciała, cytokiny i inne czynniki. Do narządów limfatycznych należą: grasica, szpik, grudki limfatyczne samotne i skupione, migdałki, wyrostek robaczkowy, węzły limfatyczne i śledziona. Grasica i szpik określane są mianem centralnego narządu limfatycznego, ponieważ spełniają one główną rolę w czynnościowym dojrzewaniu limfocytów, natomiast pozostałe narządy określane są obwodowymi. Grasica tworzy i prowadzi selekcję limfocytów T, natomiast szpik odpowiada za powstawanie limfocytów B. Limfocyty T po opuszczeniu narządów centralnych umiejscawiają się w obszarach grasiczozależnych, a limfocyty B w obszarach grasiczozależnych (Gołąb i wsp., 2012).

Układ odpornościowy posiada liczne funkcje. Głównym zadaniem jest obrona organizmu człowieka przed czynnikami zewnętrznymi. Przede wszystkim odpowiada on za homeostazę ustroju, posiada bardzo dobrą komunikację z układem nerwowym i hormonalnym. Posiada nadzór bezpośredni i pośredni nad nowotworzeniem, ale także nad embriogenezą oraz przebiegiem ciąży. Potrafi rozpoznać struktury obce i własne. Ma zdolność uczenia się i zapamiętywania (Gołąb i wsp., 2012 ; Male i wsp., 2008).

W walce z ciałami obcymi – patogenami organizm człowieka ma do wykorzystania odporność swoistą zwaną nabytą lub nieswoistą, określaną jako wrodzoną (Deptuła i wsp., 2014). Odporność nieswoista (wrodzona) jest pierwszą linią obrony przed chorobami i infekcjami, które powstają w efekcie działania czynników środowiskowych. W skład komórek wchodzi: makrofagi, granulocyty, monocyty, komórki tuczne, komórki NK i NKT, naturalne komórki limfoidalne. Z kolei odporność swoista (nabyta) w której skład wchodzi limfocyty T i B, cytokiny, przeciwciała i komórki prezentujące antygen (Deptuła i wsp., 2014; Gołąb i wsp., 2012; Male i wsp., 2008) potrafi perfekcyjnie rozpoznać antygeny. Komórki odporności nabytej potrafią po jednorazowym kontakcie z danym antygenem wytworzyć pamięć odpornościową, a każde kolejne zetknięcie się komórki

nabytej z rozpoznaniem antygenem powoduje indukcję odpowiedzi immunologicznej (Deptuła i wsp., 2014).

W odpowiedzi swoistej typu komórkowego biorą udział limfocyty T, a w odpowiedzi swoistej typu humoralnego biorą udział limfocyty B. Odporność komórkowa w organizmie człowieka eliminuje zakażenia wywołane przez rozrastające się drobnoustroje. Ma bardzo ważną rolę w reakcji kontaktowej z tkankami zmienionymi nowotworowo (Deptuła i wsp., 2014; Gołąb i wsp., 2012).

Warto podkreślić, że na aktywność układu odpornościowego wpływa wiele czynników takich jak: wiek, aktywność fizyczna, stres, stan odżywienia, otyłość. Wraz z wiekiem zwiększa się prawdopodobieństwo wystąpienia nowotworów, a także insulinooporności, infekcji, chorób neurodegradacyjnych i miażdżycy (Dymarska, 2016).

## **I 2.2. Populacje i subpopulacje limfocytów**

Limfocyty T zwane grasicozależnymi (T-thymus – grasicica) to grupa bardzo istotnych komórek w immunologii. Limfocyty T to populacja komórek jądrzastych krwi, których rolą jest komórkowa odpowiedź odpornościowa. Na limfocytach T występuje TCR, cząstki CD (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD28, CD154) oraz cząstki MHC klasy I. W obrębie limfocytów T wyodrębnia się tradycyjnie limfocyty: pomocnicze (Th), cytotoksyczne (Tc), regulatorowe (Treg) (Niedźwierska-Rystwej i wsp., 2013). Poszczególne subpopulacje sprawują różnorodne funkcje w organizmie.

- Subpopulacje limfocytów pomocniczych (Th)

Limfocyty Th posiadają na powierzchni cząsteczki CD4, rozpoznają antygen prezentowany w połączeniu z cząsteczkami MHC klasy II. Obejmują subpopulacje, które różnią się pod względem czynnościowym, trzy zasadnicze z nich to: limfocyty Th1, Th2 i Th17 (różnicowanie wynika z wytwarzanych przez nie cytokin). Do zasadniczych funkcji subpopulacji limfocytów Th zalicza się:

- Populacja Th1 - stanowi pierwszą linię obrony, bierze udział w reakcjach na patogeny wewnątrzkomórkowe, np. wirusy, zarazem może wykazywać działanie szkodliwe w rozwoju niektórych chorób autoimmunologicznych. Limfocyty Th1 wytwarzają interleukinę 2 (IL2 - cytokina stymulująca cytotoksyczność limfocytów) oraz interferon gamma (aktywujący makrofagi).
- Populacja Th2 - wykazuje działanie obronne w zakresie robaków pasożytniczych, bierze udział w zwalczaniu zarażenia pasożytami wielokomórkowymi, niestety współdziała zarazem w rozwoju chorób alergicznych. Limfocyty Th2 wytwarzają wiele cytokin, m.in. IL-4, IL-5, IL-10, IL-13.
- Populacja Th17 - uczestniczy w odpowiedzi przeciwzakaźnej, niestety współdziałają także w reakcjach zapalnych i autoagresji. Limfocyty Th17 wytwarzają IL17.

- Subpopulacje limfocytów regulatorowych (Treg)

Limfocyty Treg to niewielka subpopulacja komórek CD4. Z limfocytów CD4+ do Treg zalicza się tylko komórki, które zarazem wykazują wysoką ekspresję powierzchniowego CD25 oraz wewnątrzkomórkowo FOXP3 (fenotyp CD4+CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup>). Limfocyty Treg o fenotypie CD4+CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> mają pochodzenie grasicze (Treg naturalne), limfocyty Treg mogą jednak powstawać także w obwodowych narządach limfatycznych z komórek CD4+CD25 – wówczas określa się je jako Treg indukowane. Limfocyty Treg poprzez zdolność migracji do miejsc objętych procesem zapalnym są odpowiedzialne za tłumienie zbyt nasilonej odpowiedzi immunologicznej.

- Subpopulacje limfocytów cytotoksycznych (Tc)

Limfocyty Tc wykazują ekspresję białka CD8, które umożliwia rozpoznanie klasy MHC I. Limfocyty Tc CD8, inaczej CTL (cytotoxic T lymphocytes) mają zdolność niszczenia komórek zakażonych przez wirusy i inne mikroorganizmy oraz komórek nowotworowych poprzez zapoczątkowanie apoptozy. Mechanizm efektu cytotoksycznego zależy od



wydzielania ziaren cytotoxicytnych bądź interakcji z receptorami dla TNF (Gołab i wsp., 2017).

Efekt cytotoxicytny wykazują:

- Niektóre limfocyty  $T\alpha\beta$   $CD4^+$  - zaliczane do limfocytów naiwnych ( $T_n$ ), zwane także komórkami T pomocniczymi ( $Th$ ), wyróżnia się dwie populacje komórek:  $Th1$  oraz  $Th2$ .
- Limfocyty  $T\alpha\beta$   $CD8^+$  - również są zaliczane do limfocytów naiwnych ( $T_n$ ). Mają istotne znaczenie w procesie pourazowego zahamowania odpowiedzi komórkowej. Wyróżnia się dwie populacje komórek  $CD8^+$  limfocyty T cytotoxiczne ( $T_c$ ) oraz limfocyty T supresyjne ( $T_s$ ). Komórki  $T\alpha\beta$   $CD8^+$ , podobnie jak limfocyty  $T\alpha\beta$   $CD4^+$ , są zdolne do uwalniania cytokin zarówno profilu  $Th1$  (komórki  $Tc1$ ), jak i  $Th2$  (komórki  $Tc2$ ). Limfocyty  $T\alpha\beta$   $CD8^+$  odpowiadają za rozwój odpowiedzi odnotowanej w wyniku urazu, w trakcie której dochodzi do sekrecji cytokin przeciwzapalnych, przypominających swym składem wzór cytokinowy komórek  $Th2$  (Zedler i wsp., 1997).
- Limfocyty  $T\gamma\delta$  - biorą udział w reakcjach antyzapalnych i prozapalnych oraz uczestniczą w reakcjach odporności lokalnej błon śluzowych (Dong i Martinez, 2010).
- Limfocyty NKT (Natural Killer T-cells) - w chorobach nowotworowych, autoimmunologicznych i alergicznych, a także w infekcjach bakteryjnych, wirusowych, pasożytniczych działają modelująco na reakcje odpornościowe (Deptuła i wsp., 2008; Dong i Martinez, 2010).
- Komórki NK - Komórki NK (Natural Killer) stanowią fundamentalny element obrony przeciwwirusowej, przeciwbakteryjnej i przeciwnowotworowej (Trinchieri, 1989). Mają zdolność niszczenia komórek nowotworowych we wczesnym etapie ich rozwoju ze względu na niezależną od przeciwciał cytotoxiczność (Anderson, 2005). Obserwowano, iż w komórkach NK podczas pierwszego okresu tworzenia się nowotworu dochodzi do równowagi między ekspresją receptorów aktywujących i hamujących ich funkcjonowanie.

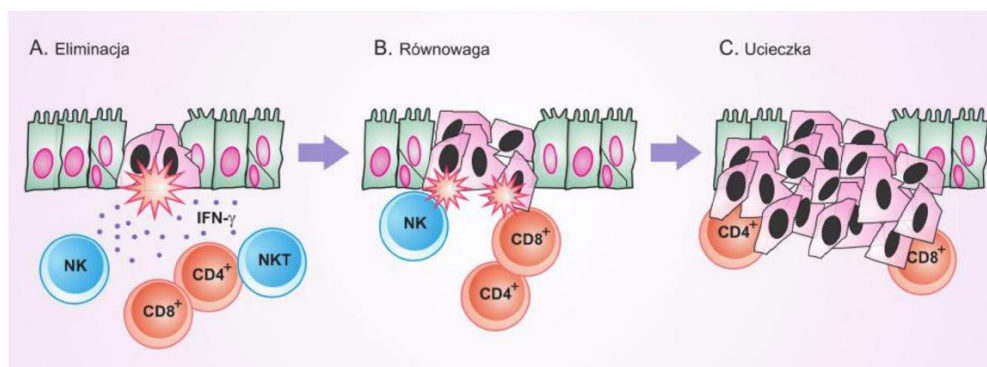
Limfocyty B inaczej zwane szpikozależnymi odpowiedzialne są za humoralną odpowiedź komórkową. Na limfocytach B występuje receptor immunoglobulinowy BCR, cząstki CD19, CD20, CD21 (CR2), CD22, CD32 (Fc $\gamma$ RII), CD35 (CRI), CD40, CD72, CD80, CD86 oraz cząstki MHC I i II. Limfocyty B dzieli się na B1 i podobne do nich limfocyty B sfery brzeżnej oraz limfocyty B2. Limfocyty B2 stanowią dominującą subpopulację, są to tzw. limfocyty konwencjonalne, pozostałe z kolei – komórki B1, posiadają cząstkę CD5. Podstawową funkcją limfocytów B jest produkcja przeciwciał (immunoglobulin, IG), przy czym limfocyty B2 biorą udział głównie w obronie nabytej, a komórki B1 odpowiadają za odporność wrodzoną (Jasiulewicz i wsp., 2011). Limfocyty B można podzielić także na limfocyty B efektorowe, limfocyty B pamięci oraz limfocyty B regulatorowe (Breg).

### **I 2.3. Rola układu immunologicznego w patogenezie i progresji chorób nowotworowych**

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 (Ryc.1). 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).



Ryc.1. Immunoregowanie nowotworu (Gołąb i wsp., 2017).

Wirusy i substancje chemiczne mogą wywołać nowotwory. W tego typu nowotworach zauważono, że antygeny są immunogenne i prowadzą do swoistej odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Najważniejszą i ostateczną funkcję w tym procesie mają komórki cytostatyczne: komórki NK, limfocyty cytotoksyczne – CD8<sup>+</sup>, limfocyty T-pomocnicze CD4<sup>+</sup>. Granulocyty objętochłonne oraz makrofagi biorą udział w odpowiedzi

odpornościowej typu komórkowego (Cavallo i wsp., 1992). Z kolei przeciwciała produkowane przez limfocyty B biorą udział w odpowiedzi humoralnej.

Nie została poznana całkowicie rola subpopulacji limfocytów pomocniczych T(Th) (Nishimura i wsp., 1999). Limfocyty Th, dzieli się na dwie grupy: grupę Th1 oraz Th2. Pierwsza grupa produkuje cytokiny indukujące odpowiedź komórkową, natomiast grupa druga produkuje cytokiny zwiększające odpowiedź humoralną, a zmniejszające komórkową (Swain, 1995). Przeciwnowotworowa odpowiedź zachodzi w dwóch fazach. Faza pierwsza to indukcja, druga to efektorowa. W pierwszej fazie występuje pobudzenie swoistej przeciwnowotworowej odpowiedzi, a w fazie drugiej dochodzi do pojedynczej eliminacji komórek nowotworowych.

Aktywność limfocytów Treg w zdrowym organizmie jest korzystna. U osób z przewlekłym stanem zapalnym w trakcie infekcji liczba limfocytów Treg wzrasta. Limfocyty Treg w chorobie nowotworowej mają hamujące działanie, co wpływa na ograniczenie odpowiedzi układu immunologicznego przeciw własnym pseudo - antygenom, co utrudnia prawidłową odpowiedź przeciwnowotworową, a to następnie skutkuje niekorzystnym rokowaniem (Curigliano, 2011; Tanchot i wsp., 2013). Badania przeprowadzone u psów będących w zaawansowanym stadium raka piersi wykazały znaczny wzrost liczby limfocytów Treg we krwi obwodowej i na terenie guza nowotworowego (Mucha i wsp., 2014; Mucha i wsp., 2016).

Natomiast w pierwszym okresie rozwoju nowotworu limfocyty Tc CD8+ pełnią ważną rolę w unicestwieniu komórek nowotworowych (Zammaron i Chen, 2011). Badania Campbell i wsp. (2005) wykazały, że u kobiet z zaawansowanym rakiem piersi stosunek liczby limfocytów Th1/Th2 był wyższy aniżeli u kobiet zdrowych. Należy podkreślić, że populacje limfocytów Th i Tc w warunkach fizjologicznych bezpośrednio ze sobą współdziałają w celu odnalezienia i usunięcia komórek nowotworowych, a wydzielane przez nie cytokiny mogą wpłynąć na modyfikację odpowiedzi immunologicznej (Jakóbisiak i Lasek, 2007).

Limfocyty B są obecne w mikrośrodowisku wielu nowotworów, a w raku piersi są obecne na poziomie nawet 40%. Mają zdolność niszczenia komórek nowotworu.

Przeciwnowotworowe działanie limfocytów B jest skuteczniejsze podczas obecności limfocytów T CD8+, co wskazuje na ich synergistyczne działanie (Nelson, 2010).

Wśród mechanizmów immunologicznych biorących udział w obronie przeciwnowotworowej wyróżnia się:

- cytotoksyczność limfocytów Tc, komórek NK oraz komórek NKT
- cytotoksyczność pobudzonych makrofagów i neutrofilów
- cytotoksyczność komórkową uzależnioną od przeciwciał
- cytotoksyczność przeciwciała uzależnioną od dopełniacza
- aktywność cytokin

U 5-70% chorych na nowotwory, u których ujawnia się we krwi limfocyty (Tc i/lub NK) stwierdza się zdolność do zabicia autologicznych komórek nowotworowych. Wysoka aktywność Tc ze zdolnością do zabicia autologicznych komórek nowotworowych, wykazana przy zabiegu operacyjnym, łączona jest z dobrą prognozą dla pacjenta. Wysoka aktywność komórek NK wykazuje z kolei związek z rzadszym występowaniem choroby nowotworowej. Za istotny element odpowiedzi komórkowej przeciwnowotworowej uznaje się także swoiste limfocyty Th (przede wszystkim Th1) (Gołąb i wsp., 2017).

W przypadku raka piersi stwierdzono, że nowotwory są infiltrowane przez niejednorodną populację komórek odpornościowych, takich jak limfocyty T, limfocyty B, komórki NK i makrofagi. Limfocyty naciekające guz (TILs) są przejawem reakcji przeciwnowotworowej gospodarza. TIL w guzach litych obejmuje komórki pomocnicze CD4+ (Th1, Th2), limfocyty T regulatorowe CD4+ oraz limfocyty cytotoksyczne T CD8+ (CTL). CTL mogą mieć wpływ na wzrost guza, ponieważ w wyniku wywołania apoptozy, niszczą komórki nowotworowe (Matkowski i wsp., 2009).

## I 2.4. Wpływ aktywności fizycznej na układ immunologiczny

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. W wyniku ćwiczeń fizycznych poziom IL-1 w surowicy rośnie. Po zakończonym wysiłku fizycznym, podwyższony poziom IL-1 utrzymuje się w organizmie przez kolejne 48 godzin. Stężenie IL-2 we krwi maleje pod wpływem aktywności fizycznej, wpływając na osłabienie odpowiedzi typu komórkowego. Oddziaływanie aktywności fizycznej na układ immunologiczny jest zależne od czynników zewnętrznych, ponieważ podejmowanie wysiłku fizycznego w niskich temperaturach indukuje obniżenie TNF- $\alpha$ . Natomiast kilukogodzinny wysiłek fizyczny powoduje wzrost stężenia TNF- $\alpha$ . Podczas wysiłku fizycznego dochodzi do wzrostu poziomu w surowicy cytokin przeciwzapalnych (IL-4 i IL-10) lecz ich stopień wzrostu jest różny (Deptuła i wsp., 2005).

Należy pamiętać, że wpływ wysiłku fizycznego na mechanizmy odpowiedzi nieswoistej jest różny w zależności od tego, czy jest to wysiłek intensywny i krótkotrwały, czy przewlekły i regularny.

Wysiłek krótkotrwały, intensywny prowadzi w przeciągu pierwszych 30 minut od jego zakończenia do znacznego, ale mijającego wzrostu liczby granulocytów objętochłonnych we krwi obwodowej. Kilka godzin po zakończonym wysiłku ponownie wzrasta liczba neutrofilów, tempo ich wzrostu zależne jest od czasu trwania i intensywności wysiłku fizycznego (Peake, 2002). Dwie godziny po zakończonym krótkotrwałym lecz intensywnym wysiłku dochodzi do wzrostu liczby monocytów. Pod wpływem amin katecholowych i kortyzolu dochodzi do ich przesunięcia z puli brzeżnej do krążenia obwodowego. Zauważono, że podczas intensywnego wysiłku dochodzi do wzrostu monocytów prozapalnych CD14+/CD16+ w stosunku do monocytów występujących w warunkach spoczynku tj. CD14+/CD16- (Steppich i wsp., 2000). W badaniach wykazano wzrost komórek dendrytycznych (Edwards i wsp., 1984). Z kolei komórki NK po początkowym wzroście ulegają redukcji do wartości mniejszej niż połowa wartości wyjściowej, a po kilku godzinach liczba komórek NK powraca ponownie do wartości wyjściowej (Shephard i Shek, 1999).

Wysiłek regularny o umiarkowanej intensywności nie wpływa znacząco na liczbę neutrofilów (Gleeson i Bishop, 2005). U osób, u których toczy się przewlekły proces zapalny w organizmie dochodzi do zmniejszenia się liczby neutrofilów w miejscu procesu zapalnego, a także do zmniejszenia liczby prozapalnych monocytów CD14+/CD16+ (Michishita i wsp., 2010).

### **I 3. Rola badań eksperymentalnych w ocenie wpływu aktywności fizycznej na rozwój raka piersi**

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 wydalniczych (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).

Pod wpływem aktywności fizycznej w badaniach eksperymentalnych obserwuje się zarówno regresję jak i progresję raka listwy mlecznej.



Badania Zongjian i wsp. wykazały u samic szczurów rasy Sprague-Dawley i podaniu nitrozomocznika o 13% mniej przypadków zachorowania na raka listwy mleczej 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).

Mann i wsp. również u samic rasy Sprague-Dawley i podaniu nitrozomocznika stwierdzili w grupach poddanych treningowi fizycznemu mniejszą liczbę zmian nowotworowych w porównaniu do grupy kontrolnej, bez treningu (72% vs 96%) oraz mniejszą liczbę guzów (1,78 vs 2,84). Niższa liczba zachorowań była jednak niezależna od charakteru treningu fizycznego, zatem od zastosowania koła obrotowego z napędem bądź bez (Mann i wsp., 2010).

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 mleczej, 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 mleczej 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 mlecznej (Saez i wsp., 2007).

Wśród prowadzonych badań można także zaobserwować wyniki odnoszące się do braku wpływu aktywności fizycznej na rozwój raka listwy mlecznej (Jones i wsp., 2010; Westerlind i wsp., 2002).

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 mlecznej 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 badanego

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).

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.

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

Grupa	GK	NPI	UPI	WPI	Łącznie
<b>Model 1</b>	14	12	10	7	43
<b>Model 2</b>	8	9	9	6	32
<b>Razem</b>	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)
<b>Model 1</b>	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	
<b>Model 2</b>	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 mlecznej**

Wyindukowanie guza raka listwy mlecznej 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  $-80^{\circ}\text{C}$  (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  $4^{\circ}\text{C}$ ). Po odwirowaniu otrzymano osocze, które zostało zamrożone.

### **III 2.4. Histopatologia**

Badanie histopatologiczne zrealizowano na pociętych z bloczków parafinowych preparatach 6- $\mu\text{m}$  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 $\mu$ m, 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 inkubowaniu 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 – diaminobenzyny (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 4 $\mu$ m, 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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  $\mu$ 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 anti-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 antygeny 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 przepływową

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

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

Dodawano po 20 $\mu$ 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 $\mu$ l 1% BSA i dokładnie zawieszano komórki w roztworze. Tak przygotowane próbki mierzono przy użyciu FACS'u.

Badanie 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.

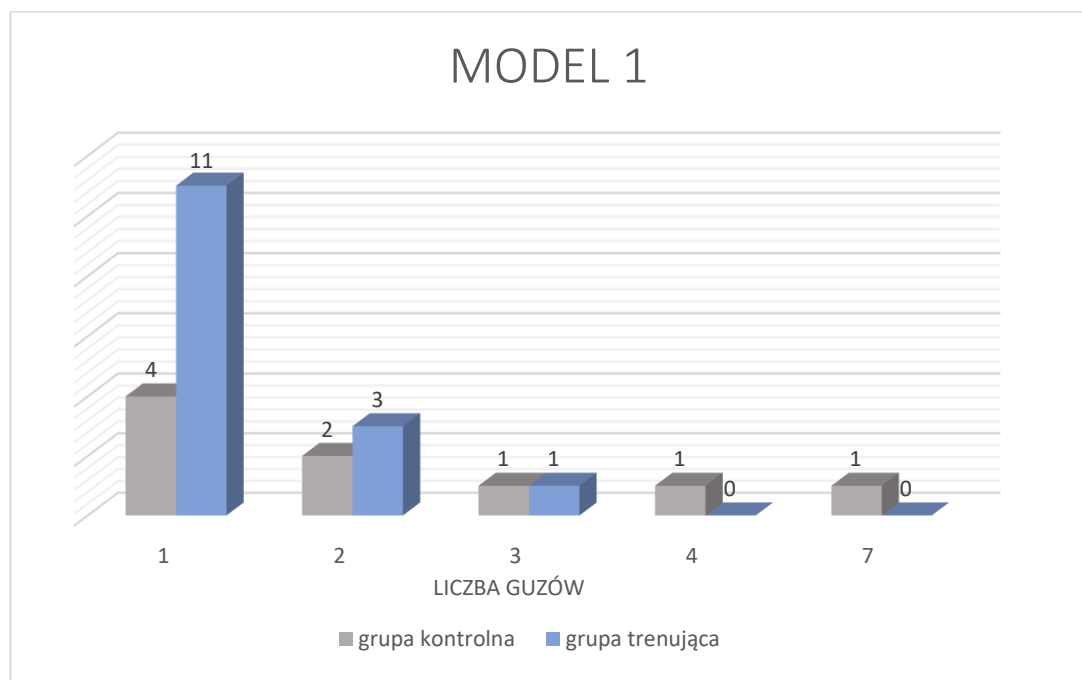
## IV WYNIKI

### IV 1. Grupa trenująca vs grupa kontrolna

#### IV 1.1. Indukcja guzów

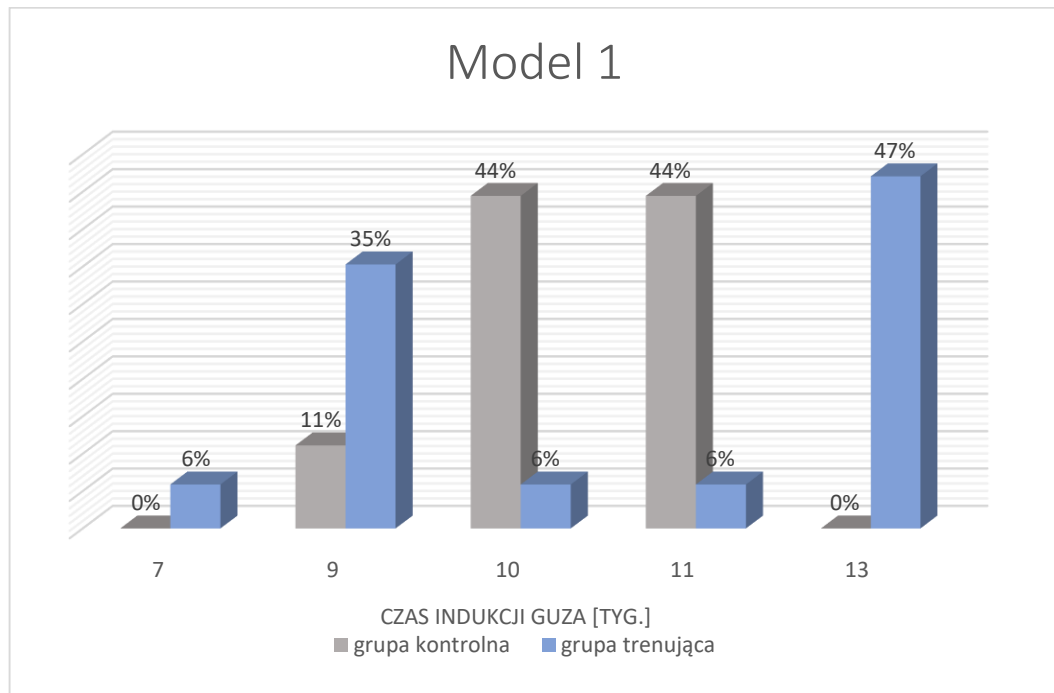
##### MODEL 1

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.2. 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.3. 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.

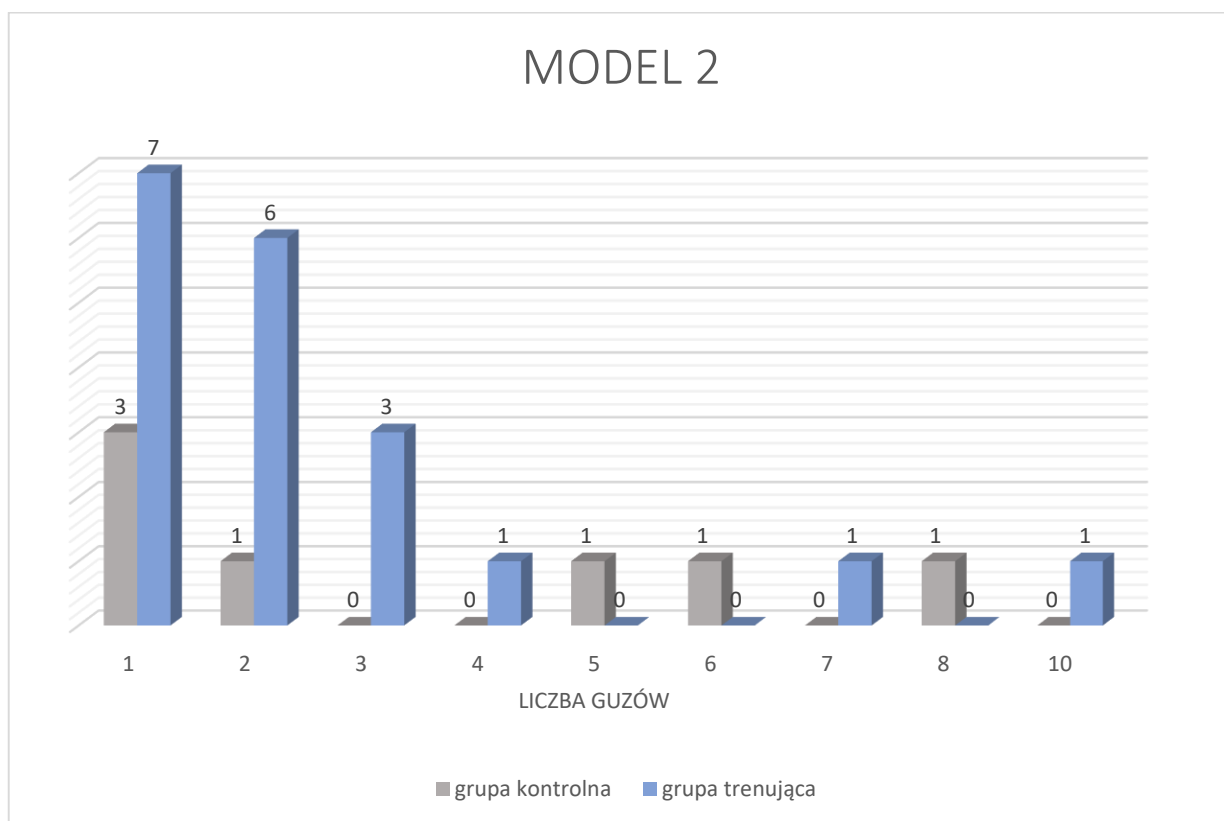
Grupa	n	Średnia	Mediana	Odch. Std.	p (test Manna – Whitney)
kontrolna	9	10,3	10	0,7	0,878
trenująca	15	10,7	9	2,1	



## 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%).

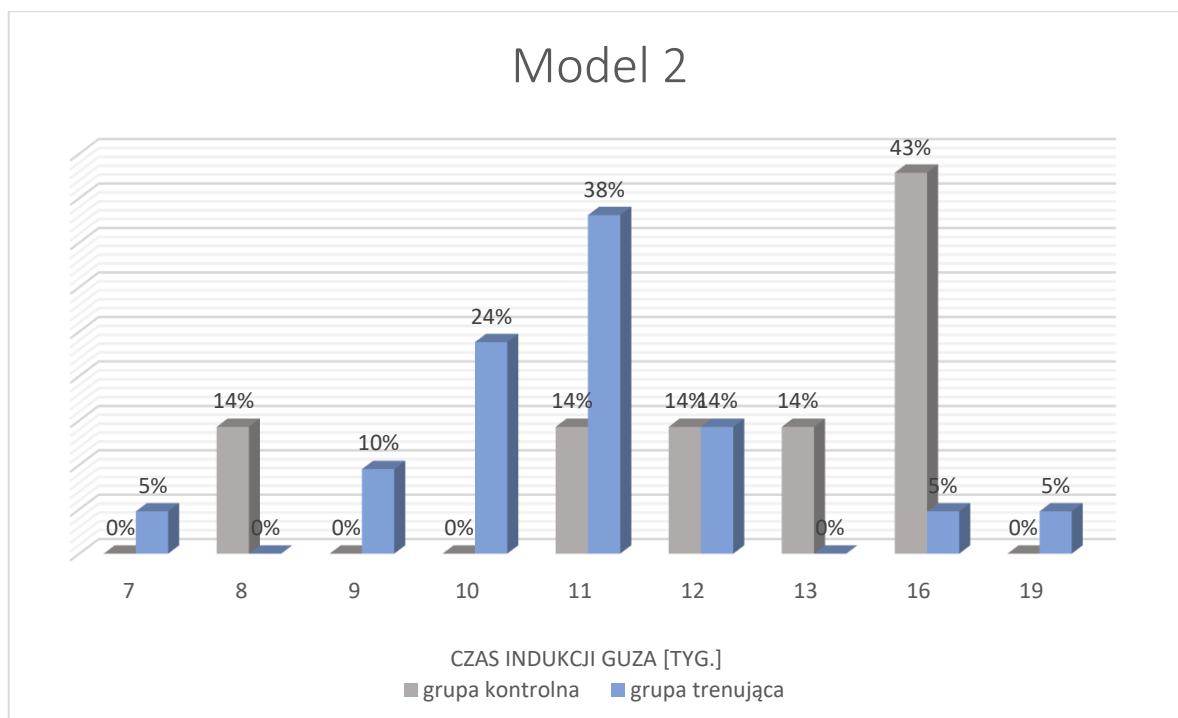
W grupie trenującej w większości przypadków u jednego szczura występowały maksymalnie 3 guzy, natomiast w grupie kontrolnej występowały guzy wielokrotne (Ryc.4).



Ryc.4. 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.5. 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	<b>0,044</b>
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	<b>0,004</b>
	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%	<b>0,0344</b>
	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%	<b>0,0431</b>
	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	<b>0,022</b>
	trenująca	1824,3	1390,0	2207,0	
CD3- CD116/c+	kontrolna	6328,8	6593,5	4047,8	<b>0,021</b>
	trenująca	14131,9	12209,0	13216,0	
CD3+CD161+	kontrolna	184,4	66,5	397,2	<b>0,001</b>
	trenująca	303,9	247,0	222,4	
CD3-CD161-	kontrolna	87221,5	87003,5	6723,6	<b>0,001</b>
	trenująca	76245,4	75373,0	8277,0	
CD3+CD45R A+	kontrolna	396,7	225,0	619,9	<b>0,002</b>
	trenująca	483,8	504,5	152,9	
CD3- CD45RA+	kontrolna	6234,6	6612,5	3283,3	<b>0,002</b>
	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	<b>0,040</b>
	trenująca	4182,2	3821	2475,1	
CD4+CD8 +	kontrolna	1563,1	1568	537,2	<b>0,058</b>
	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	<b>0,050</b>
	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.

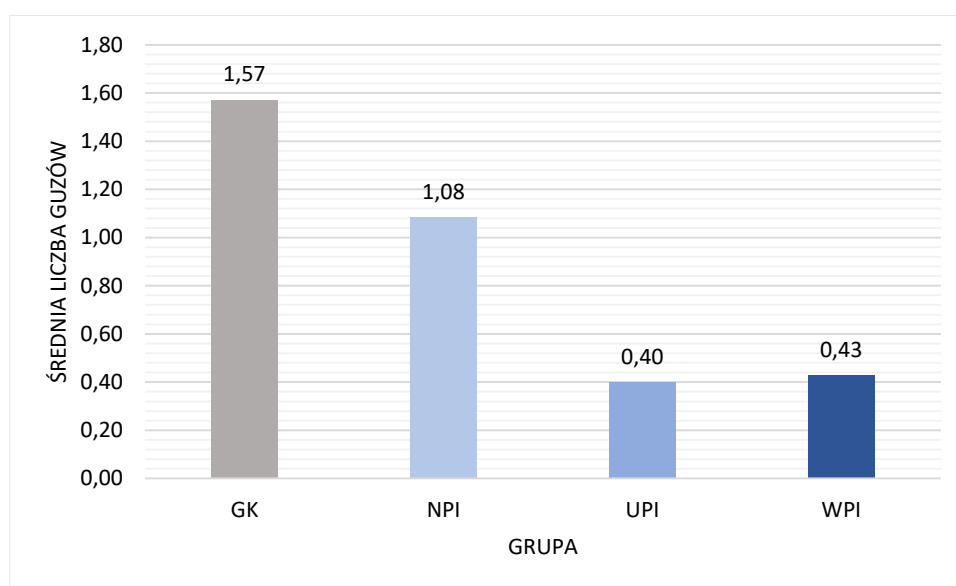
Grupa	Zmienna	Model	Średnia	Mediana	Odch.std	p (test Manna-Whitneya)
Kontrolna	CD3+CD4+	1	10058,6	10134,0	6705,2	0,3568
		2	11505,6	11117,0	3285,6	
	CD3+CD8+	1	4600,7	3973,0	2990,4	0,0750
		2	6275,1	5575,0	2172,8	
	CD4+CD8+	1	960,2	720,5	813,0	<b>0,0105</b>
		2	1563,1	1568,0	537,2	
	CD3-CD116/c+	1	6328,8	6593,5	4047,8	<b>0,0019</b>
		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	<b>0,0359</b>
		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	<b>0,0070</b>
		2	84361,1	86527,0	8093,0	
	CD3+CD45RA+	1	483,8	504,5	152,9	<b>0,0039</b>
		2	324,2	297,0	195,7	
CD3-CD45RA+	1	11636,6	11509,0	4745,1	<b>0,0345</b>	
	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.6. 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 Kruskiala-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 Kraskala – Wallisa liczebności wyindukowanych guzów na szczura.

	NPI	UPI	WPI
GK	0,439	<b>0,024</b>	<b>0,047</b>
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 wyidukowano 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
<b>Ogółem</b>	14	12	10	7

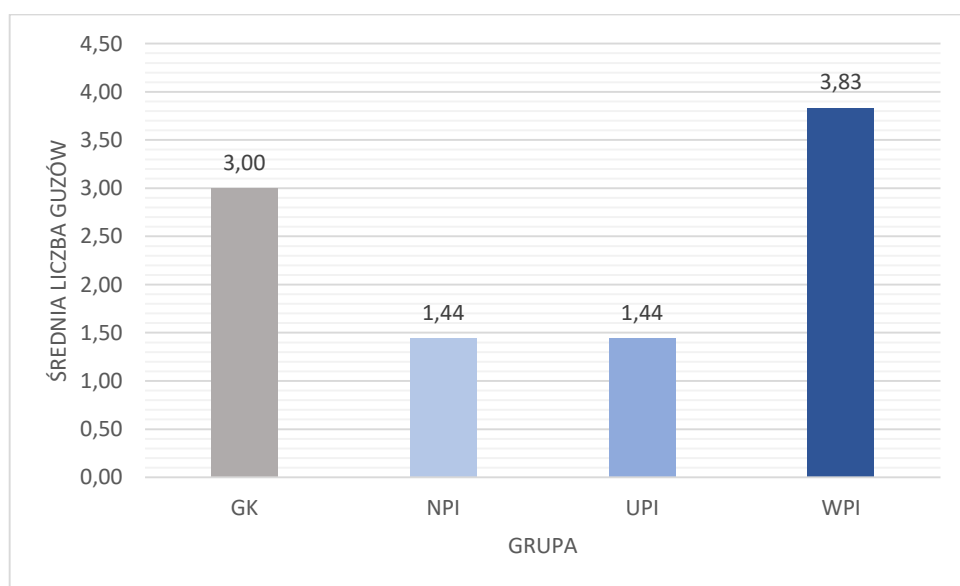
W modelu 1 przeciętny czas indukcji guza okazał się najdłuższy w grupie WPI. Jednak niewielka liczebność tej grupy nie pozwala na uznanie istotności statystycznej zaobserwowanych różnic (Tab.16). Ewentualne znalezienie statystycznego potwierdzenia wydłużania się czasu indukcji w miarę zwiększania intensywności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

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

<b>Grupa</b>	<b>Średnia</b>	<b>Mediana</b>	<b>Odch.std.</b>	<b>p (test Kruskala-Wallisa)</b>
<b>NPI</b>	10,9	11,5	2,3	0,338
<b>UPI</b>	10,0	9,0	2,0	
<b>WPI</b>	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.7. 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
<b>Ogółem</b>	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	<b>0,008</b>
	2	1,44	1,0	0,73	
WPI	1	0,43	0,0	0,53	<b>0,047</b>
	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%	<b>0,011</b>
	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%	<b>0,048</b>
	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	<b>0,048</b>	<b>0,018</b>
UPI	1,000	1,000	XXXXX	1,000
WPI	<b>0,040</b>	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 różnicowania (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 różnicowanie 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+	S.C.	10058,6	10134,0	6705,2	0,051
	LIT	7644,5	7644,5	4966,0	
	MIT	17882,0	17419,0	6366,1	
	HIT	11461,6	13681,0	4584,1	
CD3+CD8+	S.C.	4600,7	3973,0	2990,4	0,459
	LIT	4023,5	4023,5	2850,3	
	MIT	6705,7	6501,0	3278,0	
	HIT	5152,4	6286,0	2134,6	
CD4+CD8+	S.C.	960,2	720,5	813,0	0,124
	LIT	1154,5	1154,5	1127,8	
	MIT	2572,8	1390,0	3459,4	
	HIT	1374,0	1372,0	483,9	
CD3-CD116/c+	S.C.	6328,8	6593,5	4047,8	<b>0,007</b>
	LIT	9926,0	9926,0	6823,6	
	MIT	22002,0	15139,0	16639,0	
	HIT	7463,4	6337,0	4690,4	
CD3+CD161+	S.C.	184,4	66,5	397,2	<b>0,002</b>
	LIT	322,5	322,5	89,8	
	MIT	448,1	379,0	255,2	
	HIT	154,3	144,0	81,7	
CD3-CD161-	S.C.	87221,5	87003,5	6723,6	<b>0,006</b>
	LIT	80024,0	80024,0	2336,3	
	MIT	72540,4	73085,0	5050,1	
	HIT	78870,9	78165,0	10772,4	

<b>CD3+CD45RA+</b>	<b>S.C.</b>	396,7	225,0	619,9	<b>0,021</b>
	<b>LIT</b>	423,0	423,0	118,8	
	<b>MIT</b>	511,4	452,0	128,5	
	<b>HIT</b>	473,4	544,0	193,1	
<b>CD3-CD45RA+</b>	<b>S.C.</b>	6234,6	6612,5	3283,3	<b>0,001</b>
	<b>LIT</b>	12987,0	12987,0	4543,9	
	<b>MIT</b>	15189,6	16024,0	2024,6	
	<b>HIT</b>	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  $p < 0,05$ .

<b>Cecha</b>	<b>Testy porównań wielokrotnych post hoc (p)</b>			
	<b>GRUPA</b>	<b>NPI</b>	<b>UPI</b>	<b>WPI</b>
<b>CD3-CD116/c+</b>	<b>GK</b>	1,000	<b>0,004</b>	1,000
	<b>NPI</b>		1,000	1,000
	<b>UPI</b>			0,065
<b>CD3+CD161+</b>	<b>GK</b>	0,204	<b>0,002</b>	1,000
	<b>NPI</b>		1,000	1,000
	<b>UPI</b>			0,281
<b>CD3-CD161-</b>	<b>GK</b>	1,000	<b>0,004</b>	0,323
	<b>NPI</b>		1,000	1,000
	<b>UPI</b>			1,000
<b>CD3+CD45RA+</b>	<b>GK</b>	1,000	<b>0,044</b>	0,057
	<b>NPI</b>		1,000	1,000
	<b>UPI</b>			1,000
<b>CD3-CD45RA+</b>	<b>GK</b>	0,320	<b>0,001</b>	1,000
	<b>NPI</b>		1,000	1,000
	<b>UPI</b>			<b>0,041</b>

**MODEL 2**

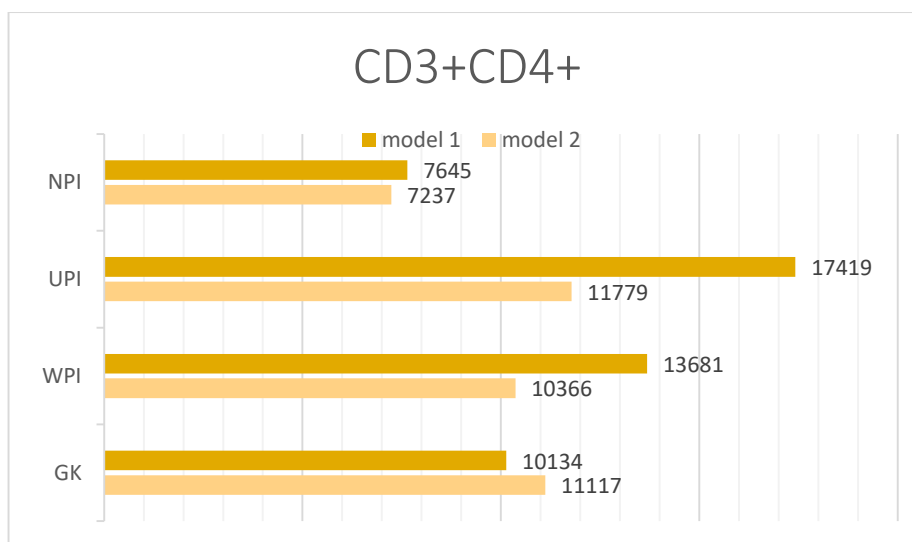
We wszystkich zmiennych CD nie stwierdzono istotnych różnic między grupami (Tab.28).

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	

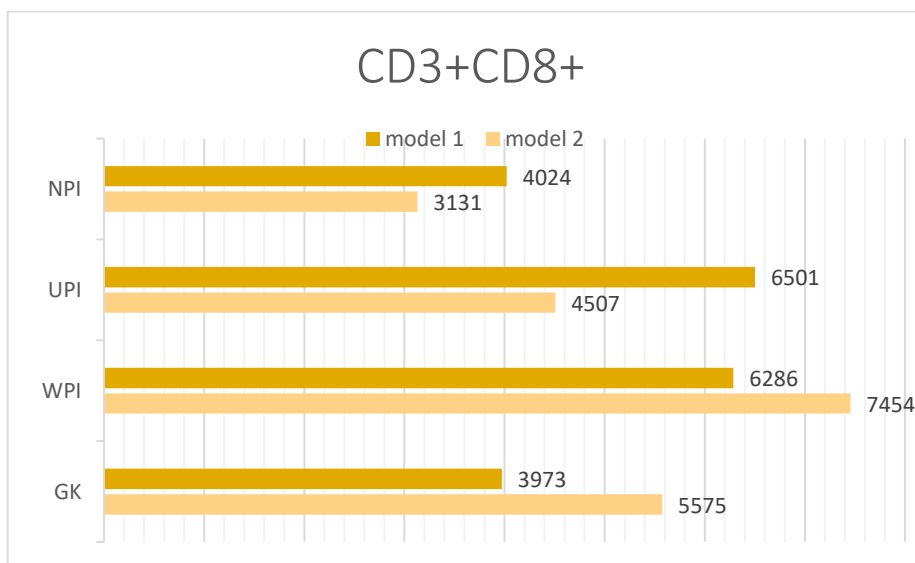
## MODEL 1 VS MODEL 2

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

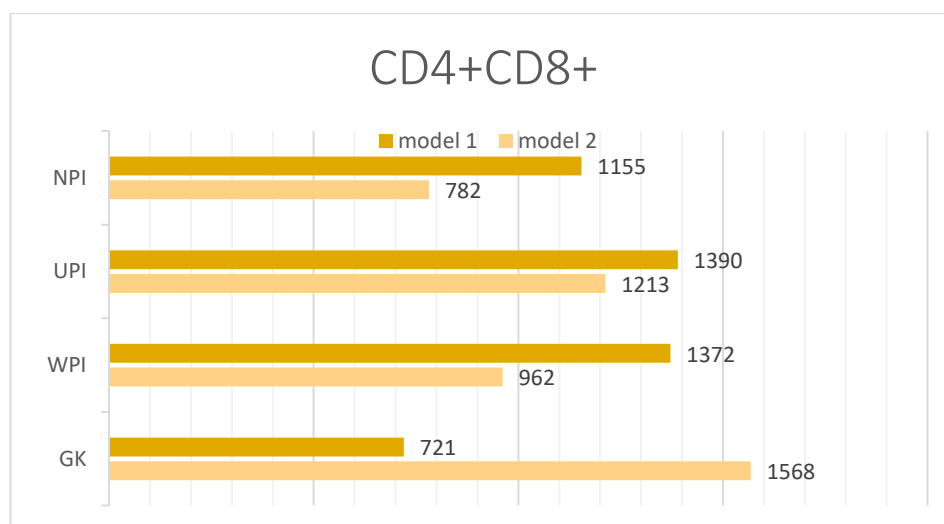
W przypadku CD3+CD8+ również w grupie UPI różnica rozkładu w modelu 1 i modelu 2 okazała się statystycznie istotna ( $p=0,045$ ) (Ryc.9).



Ryc.9. Mediany rozkładu CD3+CD8+ w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.

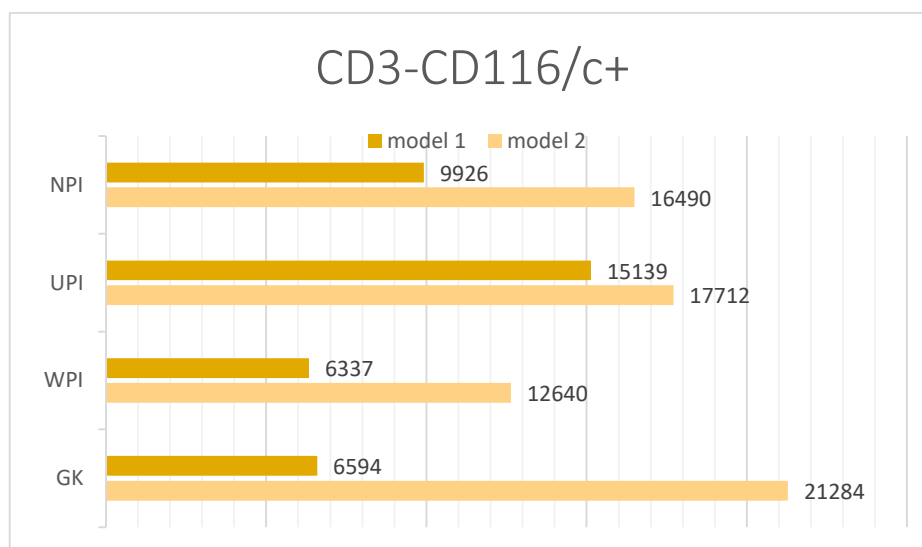


Mediany rozkładu CD4+CD8+ są wyższe w modelu 1 we wszystkich grupach trenujących. Jednak stwierdzone różnice między modelami nie mogą być uznane za statystycznie istotne na poziomie  $p \leq 0,05$ . Jedynie w grupie kontrolnej mediana rozkładu CD4+CD8+ w modelu 1 okazała się istotnie niższa od mediany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



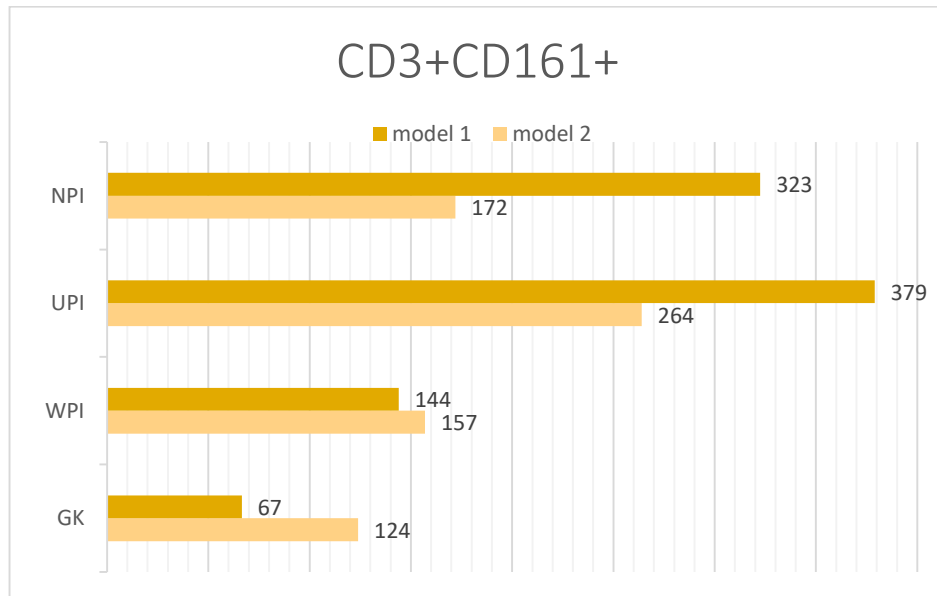
Ryc.10. Mediany rozkładu CD4+CD8+ w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.

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).



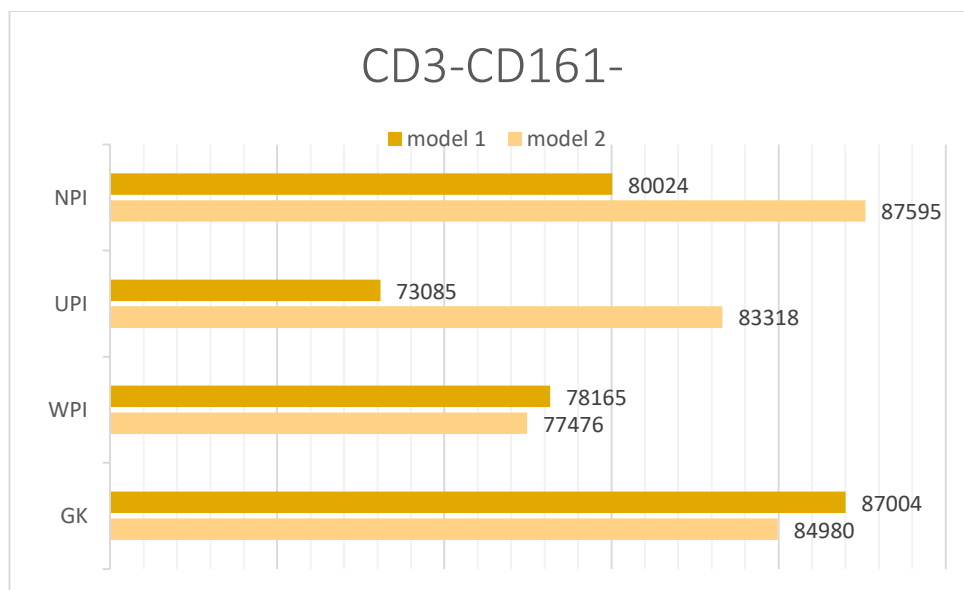
Ryc.11. Mediany rozkładu CD3-CD116/c+ w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.

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



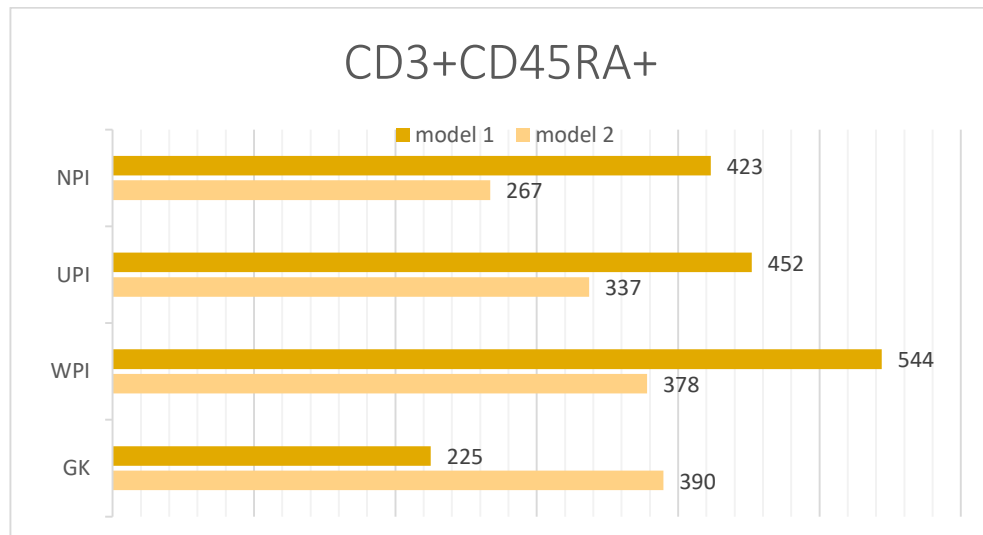
Ryc.12. Mediany rozkładu CD3+CD161+ w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.

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



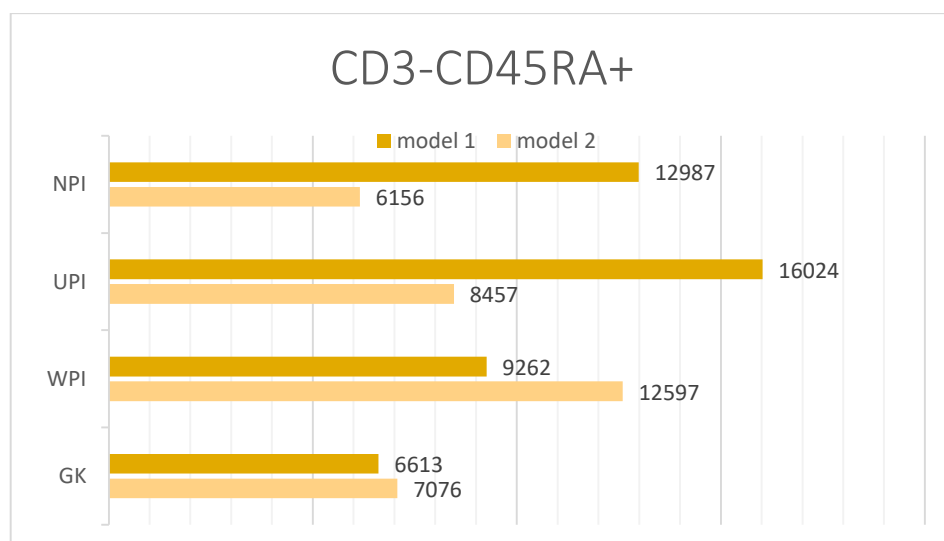
Ryc.13. Mediany rozkładu CD3-CD161- w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.

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.14. 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.15. 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. Wyłuszczone kolorem czerwonym korelacje najsilniejsze (choć statystycznie nieistotne).

	MODEL 1	MODEL 2	MODEL 1	MODEL 2	MODEL 1	MODEL 2
	n=15	n=25	n=15	n=25	n=15	n=25
Zmienna	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+	<b>0,42</b>	0,26	0,01	-0,16	<b>0,45</b>	-0,30
CD3+CD161+	<b>0,50</b>	-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+	<b>0,49</b>	-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 DYSKUSJA

Przeprowadzone badania na grupach trenujących i kontrolnych dotyczące indukcji guza na modelu I (prewencja pierwotna) miały ukazać czy dzięki eliminacji czynnika ryzyka raka piersi jakim jest sedentarny tryb życia można doprowadzić do zmniejszenia zachorowalności na raka piersi. Na podstawie powyższych badań oceniających częstość występowania guzów wielokrotnych wykazano znaczącą różnicę pomiędzy grupą trenującą, a grupą kontrolną (guzy wielokrotne występowały częściej w grupie kontrolnej). Wskazywać to może, iż regularnie podejmowana aktywność fizyczna redukuje zachorowalność na raka gruczołu listwy mlecznej u szczurów.

Podobne wyniki można zaobserwować wśród innych autorów. Badania eksperymentalne Zongjian i wsp. (2008) wykazały, że w grupie trenującej (aktywność nieprzymuszona na bieżni ruchomej) samic szczurów rasy Sprague-Dawley i podaniu nitrozomocznika, zachorowanie na raka gruczołu listwy mlecznej było niższe o 13% w porównaniu z grupą kontrolną (nietrenującą). Również Mann i wsp. (2010) zaobserwał, że w grupie trenującej samic rasy Sprague-Dawley i podaniu nitrozomicznka, wystąpiła mniejsza liczba zmian nowotworowych w porównaniu do grupy kontrolnej (nietrenującej), (72% vs 96%) oraz mniejsza liczba guzów (1,78 vs 2,84). Podobne spostrzeżenia wykazała także Malicka i wsp. (2015), gdzie w grupie trenującej (na bieżni ruchomej) samic rasy Sprague-Dawley i podaniu nitrozomocznika, pojawiły się tylko pojedyncze guzy u mniejszej liczby zwierząt (40%) w stosunku do grupy kontrolnej, zarówno dla sumarycznej liczby guzów (64%), jak i ich liczby przypadającej na jednego osobnika (od 2 do 7).

Wang i wsp. badając dorastające samice szczurów rasy Sprague Dawley wykazali ponadto, że aktywność fizyczna podejmowana szczególnie przez młode osobniki może wiązać się z redukcją zachorowania na nowotwory listwy mlecznej. Zaobserwowano także, że u aktywnych fizycznie samic szczurów w okresie dojrzewania, gruczoły mleczne posiadały mniejszą ilość TEB oraz większą liczbę zróżnicowanych pąków pęcherzykowych i zrazików. Także zmianie uległy poziomy białek tj. ER- $\alpha$  zostały znacznie zmniejszone,

a ER- $\beta$  zwiększone (Wang i wsp. 2009). Odwrotne wyniki przedstawili z kolei Steiner i wsp. wykazując po dobrowolnym treningu fizycznym myszy na kole obrotowym większą liczbę rozwijających się guzów (Steiner i wsp., 2013).

W odniesieniu do populacji ludzkiej zespół ekspertów Bianchini i wsp. (2002) z Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem WHO szacuje, że ryzyko zachorowania na raka piersi spada o 20-40% wśród najbardziej aktywnych fizycznie kobiet, bez względu na rodzaj i/lub intensywność wysiłku fizycznego, a także niezależnie od stanu menopauzy. Także Kruk (2005) podkreśla korzystny wpływ aktywności fizycznej wykazując, że ryzyko wystąpienia nowotworu piersi jest mniejsze o 30–40 % u kobiet podejmujących wzmożoną aktywność fizyczną. Również Lynch i wsp. (2011) wskazują zmniejszone o 25% ryzyko pojawienia się nowotworu piersi u kobiet aktywnych fizycznie w porównaniu z kobietami mniej aktywnymi. Istotny wpływ podejmowanej regularnie aktywności fizycznej w dzieciństwie i młodym wieku na spadek ryzyka zachorowania na raka piersi w wieku dorosłym przedstawili Kruk (2007) oraz Szkiela i wsp. (2014). Podobnie Westerlind i wsp. (2002) zauważyli zmniejszenie ryzyka zachorowania na raka piersi o 30–50% u dziewczynek, które w wieku 10-15 lat były znacznie bardziej aktywne fizycznie aniżeli ich rówieśniczki. Ponadto Rack i wsp. (2010) zaznaczyła, że brak aktywności fizycznej jest związany nie tylko ze zwiększonym ryzykiem zachorowania na raka piersi, ale także ze wzmożoną częstotliwością nawrotów choroby jak i wyższą śmiertelnością.

W badaniach własnych w omawianym modelu nie stwierdzono istotnej zależności czasu indukcji guza od podejmowania treningu fizycznego. Znaczna rozpiętość czasu indukcji guza, a także mała liczebność grup nie pozwoliła na uwidocznienie różnic. W celu weryfikacji hipotezy należałoby zatem przeprowadzić szersze badania z wykorzystaniem większej liczby osobników. Westerlind i wsp. (2003) prowadząc badania u dorastających szczurów, którym podano MNU oraz prowadzono trening o umiarkowanej intensywności wykazał jednak opóźnienie rozwoju choroby oraz spowolnienie rozwoju guza.

Przeprowadzone badania na grupach zależnych od poziomu treningu fizycznego dotyczące indukcji guza na modelu 1 (prewencja pierwotna) ukazały, że średnia liczba

wyindukowanych guzów na szczura jest niższa w grupach trenujących w porównaniu z grupą kontrolną. Liczba wyindukowanych guzów maleje wraz ze wzrostem intensywności treningu fizycznego od poziomu niskiej intensywności (NPI) do średniej i wysokiej (UPI i WPI). W modelu 1 wielokrotne guzy obserwowano jedynie u szczurów z grupy kontrolnej (GK) i w grupie o niskiej intensywności (NPI). W grupach UPI i WPI wyindukowano jedynie guzy pojedyncze. Zatem wyniki badań własnych sugerują korzystny wpływ treningu o umiarkowanej i wysokiej intensywności.

Znaczenie treningu o umiarkowanym poziomie treningu fizycznego potwierdzili Westerlind i wsp. (2003). Z kolei badania przeprowadzone przez Malicką i wsp. (2015) podkreślają istotną statystycznie redukcję liczby guzów wraz ze wzrostem poziomu intensywności treningu fizycznego.

Badania populacyjne również wskazują na znaczenie intensywności treningu fizycznego w redukcji ryzyka zachorowania na raka piersi. McTiernan i wsp. (2004) wykazali, że prowadzona u kobiet w wieku 50-75 lat, przez okres 12 miesięcy, 5 dni w tygodniu, po 45 min. aktywność fizyczna na poziomie umiarkowanym powoduje spadek ryzyka rozwoju raka piersi. Natomiast podejmowana 3 razy w tygodniu przez 35-letnie kobiety intensywne aktywność fizyczna zmniejsza ryzyko zachorowania na raka piersi o 14% (McTiernan i wsp., 2003, McTiernan i wsp., 2004).

Przeprowadzone badania na grupach trenujących oraz kontrolnych dotyczące indukcji guza na modelu 2 (prewencja wtórna) miały ukazać czy dzięki eliminacji czynnika ryzyka raka piersi jakim jest sedentarny tryb życia można doprowadzić do zmniejszenia występowania liczby guzów nowotworowych, zahamowania rozwoju choroby. Na podstawie powyższych badań oceniających częstość występowania guzów wielokrotnych wykazano znaczącą różnicę pomiędzy grupą trenującą a grupą kontrolną (guzy wielokrotne występowały częściej w grupie kontrolnej, natomiast w grupie trenującej w większości przypadków u jednego szczura występowały maksymalnie 3 guzy). Wskazywać to może, iż regularnie podejmowana aktywność fizyczna redukuje liczbę występujących guzów nowotworowych.

Już wczesne badania eksperymentalne Thompson (1994) oraz Whittal-Strange i wsp. (1998) wykazały, że trening fizyczny zmniejsza liczbę wyindukowanych guzów. Do podobnych wniosków doszli także Alvarado i wsp. (2017). Prowadzony u szczurów trening fizyczny na bieżni ruchomej zredukował ilość wyindukowanych guzów w porównaniu z grupą prowadzącą siedzący tryb życia.

Liczne badania populacyjne pokazują, że kobiety, które przedstawiają wysoki poziom aktywności, a także wydolności fizycznej cechują się niższym ryzykiem przedwczesnego zgonu o 50% w porównaniu do osób prowadzących bierny tryb życia (Holick i wsp., 2008 ; Irwin i wsp., 2011, Ruiz-Casado i wsp., 2016). Ponadto Kroenke i wsp. (2005) zaznaczają, że prowadzenie sedentarnego trybu życia po rozpoznaniu raka piersi prowadzi do zwiększenia masy ciała, co związane jest bezpośrednio z mniejszą szansą przeżycia. Podobne związki wykazali Holmes i wsp. (2005) oraz Lahmann i wsp. (2005). U aktywnych kobiet z nowotworem piersi występuje wyższa szansa na przeżycie ze względu na niższy wskaźnik masy ciała (BMI) oraz mniejsze przybieranie na wadze.

W badaniach własnych w omawianym modelu wykazano, że średnia rozkładu czasu indukcji guza w grupie trenującej wyniosła 10,8 tygodni, a w grupie kontrolnej 13,1 tygodni. Należy podkreślić, że różnica ta jest istotna statystycznie, niemniej jednak nie znaleziono podobnych badań, by odnieść się do uzyskanego wyniku.

Przeprowadzone badania na grupach zależnych od poziomu intensywności treningu fizycznego dotyczące indukcji guza na modelu 2 (prewencja wtórna) ukazały, że średnia liczba wyindukowanych guzów na szczura nie wykazuje zależności od intensywności treningu. W tym modelu wielokrotne guzy występowały we wszystkich badanych grupach.

W badaniach eksperymentalnych przeprowadzonych na modelu zwierzęcym, 90-ciu szczurów Sprague-Dawley, którym wstrzyknięto MNU wykazano, że trening fizyczny o umiarkowanej intensywności na bieżni ruchomej oraz regulacja spożycia energii z dietą wpływa hamująco na karcynogenezę gruczołu mlekowego (Zhu i wsp., 2009). Natomiast Saez i wsp. (2007) zauważyli, że wysoki poziom intensywności treningu fizycznego ma wpływ na wzrost tempa wzrostu raka listwy mlekowej u szczurów, ze względu



na podwyższone podczas ćwiczeń fizycznych uwalnianie hormonu stresu, który może być współodpowiedzialny na rozwój nowotworów złośliwych.

Badania populacyjne przeprowadzone przez Cohen i wsp. (1992) podkreślają protekcyjne działanie treningu o umiarkowanej intensywności. Badania Holick i wsp. (2008) wykazały, że wzrost aktywności fizycznej u kobiet o 5 MET – godzin tygodniowo zmniejsza ryzyko zgonu o 15% z powodu raka piersi u kobiet. Z kolei Dieli–Conwright i wsp. (2016) podkreślają, że aktywność fizyczna oddziałuje na hormony metaboliczne, zmniejsza otyłość, a w efekcie minimalizuje wzrost i proliferację komórek raka piersi. Według Palesh i wsp. (2018) podjęcie dodatkowej aktywności fizycznej o umiarkowanej intensywności (około 4 MET) w efekcie powodowało wzrost szansy przeżycia oraz redukcję zgonu o 23%.

Natomiast badania populacyjne Cohen i wsp. (1992), podkreślają, że podczas prowadzenia treningu o wysokiej intensywności dochodzi do wzrostu częstości występowania zmian nowotworowych. Badania te jednak nie są spójne, ponieważ Irwin i wsp. (2011) udowodnili, że trening fizyczny prowadzony na wysokim poziomie intensywności ( $\geq 9$  MET/tydzień) wpływa na zmniejszenie ryzyka zgonu o 39% u kobiet po leczeniu z powodu nowotworu piersi.

W przeprowadzonych badaniach na grupach trenujących oraz kontrolnych dotyczących objętości guzów, poziomu proliferacji i apoptozy na modelu 1 (prewencja pierwotna) wykazany został tylko istotny wpływ podejmowanego treningu w przypadku zmiennej tunel. Nie zauważono istotnych różnic w obu grupach w kwestii rozkładu objętości guza oraz rozkładu antygenu Ki-67.

Pokrewne wnioski badań eksperymentalnych realizowanych w grupie szczurów rasy Sprague-Dawley i podaniu nitrozomocznika przedstawiła Malicka i wsp. (2015) podkreślając brak wpływu wysiłku fizycznego na podwyższenie ryzyka proliferacji komórek oraz zwiększenie objętości guza. Wykazano również wpływ wysiłku fizycznego na liczbę komórek apoptotycznych. Podobne spostrzeżenia przestawili także Higgins i wsp. (2014) oraz Teixeira i wsp. (2012). Gryzonie poddane treningowi fizycznemu wykazywały zwiększoną apoptozę komórek nowotworowych w stosunku do grupy kontrolnej w przypadku raka płuc i prostaty. Steiner i wsp. (2013) zaobserwowali natomiast wpływ

treningu fizycznego na objętość guza, czego nie wykazano w badaniach własnych. Trening myszy na kole obrotowym spowodował zmniejszenie średniej objętości guza.

W przeprowadzonych badaniach na grupach zależnych od poziomu intensywności treningu dotyczących objętości guzów, poziomu proliferacji i apoptozy na modelu 1 (prewencja pierwotna) wykazany został brak istotnej zależności rozkładów tych 3 zmiennych od intensywności treningu. Średnia liczba komórek apoptycznych wzrastała wraz z poziomem intensywności treningu. Największy udział procentowy komórek apoptycznych wykryto u szczurów trenowanych na poziomie umiarkowanej i wysokiej intensywności.

Malicka i wsp. (2017) zaznaczają, że apoptoza jest zdecydowanie mocniejsza w grupach trenujących niż biernych. Tendencja wzrostowa jest widoczna tylko w grupach o umiarkowanej intensywności treningu. Podobnie Westerlind i wsp. (2002) wykazali, że u zwierząt dochodzi do wzrostu apoptozy w grupie o umiarkowanej intensywności treningu.

W przeprowadzonych badaniach na grupach trenujących oraz kontrolnych dotyczących objętości guzów, poziomu proliferacji i apoptozy na modelu 2 (prewencja wtórna) podobnie jak w modelu 1, jedynie rozkład zmiennej tunel różnił się istotnie w grupie trenującej. Wyniki badań tym samym podkreślają, że trening fizyczny nie zwiększa ryzyka proliferacji komórek oraz nie wpływa na wzrost objętości guza. Natomiast dzięki apoptozie komórek nowotworowych (zmienna tunel) może dojść do ograniczenia wzrostu nowotworu.

Podobne wnioski przedstawiła Siewierska i wsp. (2020), która również oceniała wpływ aktywności fizycznej na poziom apoptozy komórek nowotworowych w profilaktyce wtórnej u szczurów rasy Sprague-Dawley i podaniu nitrozomocznika. W tym wypadku nie wykazano istotnej różnicy pomiędzy grupą trenującą a kontrolną. Wykazano również wpływ treningu fizycznego na redukcję wrażliwości komórek na działanie proliferacyjne. Wyższą liczbę komórek apoptycznych u szczurów poddanych treningowi fizycznemu w guzach Walkera 256 (guzy wywodzące się z gruczołu sutkowego) wykazali również De Lima i wsp. (2011). Dodatkowo wskazali oni również na istotnie niższą proliferację guza w grupie trenującej w porównaniu z grupą kontrolną (De Lima i wsp., 2011). Wyniki badań

odnoszących się do prewencji wtórnej nie są jednak jednoznaczne. Przeciwnie wnioski, zarówno w odniesieniu do badań własnych, jak i powyższych autorów przedstawili Whittal-Strange i wsp. (1998), którzy wskazali na zwiększone ryzyko rozwoju raka listwy mleczej i wzrostu masy guza w następstwie ćwiczeń fizycznych, szczególnie tych o wysokim poziomie intensywności. Niejednoznaczne wyniki przedstawił także Steiner i wsp. Mimo, że dobrowolny trening myszy na kole obrotowym wpłynął na zmniejszenie średniej objętości guza, to spowodował on zarazem większą liczbę rozwijających się zmian nowotworowych (Steiner i wsp. 2013). Niekorzystne obserwacje przedstawił również Westerlind i wsp., wykazując u wszystkich zwierząt podejmujących trening fizyczny wzrost proliferacji komórek nowotworowych. Powyższy wynik może mieć jednak związek z rodzajem zastosowanego innego markera proliferacji. W badaniu Westerlinda użyto antygenu PCNA, natomiast w badaniach własnych Ki-67 (Westerlind i wsp. 2002).

Przeprowadzone badania na grupach zależnych od poziomu intensywności treningu modelu 2 wykazały, że objętość guzów niezależnie od poziomu podejmowanego treningu fizycznego nie przejawia istotnego zróżnicowania. Należy podkreślić, że w modelu 2 w grupie NPI istnieją istotnie niższe wartości antygenu Ki-67 w porównaniu z grupą UPI i WPI. Zatem uzyskane wyniki mogą wskazywać na to, że ćwiczenia fizyczne nie zwiększają ryzyka proliferacji komórek w grupie o niskiej intensywności, natomiast zwiększają ją w grupie o umiarkowanej i wysokiej intensywności.

Również badania przeprowadzone przez zespół De Lima i wsp. potwierdziły, że szczury w grupie trenującej charakteryzowały się znacznie niższą i istotną statystycznie masą guza w porównaniu z grupą kontrolną (De Lima i wsp., 2011). Przeciwnie zmiany w objętości guzów do poprzednich badań wykazał Whittal-Strange i wsp., którzy dostrzegli, że pod wpływem treningu fizycznego, zwłaszcza o wysokiej intensywności dochodzi do wzrostu masy guza (Whittal-Strange i wsp., 1998).

Ponadto w badaniu własnym zaobserwowano różnicę między liczbą komórek apoptotycznych w modelach. W modelu prewencji wtórnej średnie wartości zmiennej tunel rosną wraz ze zwiększeniem wysiłku, natomiast w modelu prewencji pierwotnej najwyższy poziom apoptozy komórek nowotworowych jest osiągnięty podczas treningu

o umiarkowanej intensywności. Zatem uzyskane wyniki mogą wskazywać, że do zwiększenia apoptozy komórek nowotworowych dochodzi w modelu 2 podczas ćwiczeń fizycznych o wysokiej intensywności, natomiast w modelu 1 o umiarkowanej intensywności.

Przeprowadzone badania dotyczące subpopulacji limfocytów miały wskazać możliwe zmiany w obrębie układu immunologicznego w badanych modelach i grupach.

Zrealizowane badania na grupach trenujących oraz kontrolnych dotyczące poziomu subpopulacji limfocytów na modelu 1 (prewencja pierwotna) miały ukazać czy istnieje zróżnicowanie subpopulacji limfocytów w porównaniu z grupą kontrolną. Wykazano, że w większości analizowanych przypadków występują istotnie wyższe wartości średnie w grupie trenującej w stosunku do grupy kontrolnej. Badania własne dla modelu prewencji pierwotnej sugerują zatem mobilizację układu immunologicznego poprzez wzrost liczebności poszczególnych frakcji limfocytów.

Natomiast przeprowadzone badania dotyczące poziomu subpopulacji limfocytów w grupach zależnych od poziomu intensywności wysiłku na modelu 1 (prewencja pierwotna) miały ukazać czy występują istotne różnice między grupami. Wykazano, że w większości przypadków występują istotne różnice. Wartości median rozkładów zmiennych CD w grupie UPI okazały się istotnie różne od wartości median w grupie GK. Badania własne dają do zrozumienia, że największe znaczenie odgrywa umiarkowany poziom intensywności treningu fizycznego, który w przeprowadzonej ocenie wpływa stymulująco na antynowotworową odpowiedź organizmu.

Badania eksperymentalne (Escribano i wsp., 2005; Korhonen i wsp., 2000; Krumrych, 2009; Raidal i wsp., 2000) przeprowadzone na zdrowych koniach, które były poddane treningowi o umiarkowanej intensywności, o krótkotrwałym czasie jego trwania <30 min. wykazują działanie immunostymulujące wysiłku. W efekcie ćwiczeń dochodzi do niedużego wzrostu liczby leukocytów oraz zwiększenia fagocytarnej i bakteriobójczej aktywności neutrofilów. Również badania Demarzo i wsp. (2008) na grupie szczurów rasy Wistar uwiarydliły, że wraz ze wzrostem aktywności fizycznej dochodzi do zwiększenia ilości limfocytów i ich aktywności we krwi obwodowej. Wielu autorów takich jak: Bacurau

i wsp. (2000), ), De Lima i wsp. (2008), Kurowski i Kowalski (2014) oraz Nieman (2001) zaznaczają, że regularnie podejmowany trening fizyczny o umiarkowanej intensywności wpływa na stymulację mechanizmów odpornościowych, dzięki czemu zmniejsza się prawdopodobieństwo infekcji organizmu. Natomiast wyczerpujący wysiłek fizyczny według Nieman (2001) ma właściwości immunosupresyjne, przez co zwiększa się ryzyko zakażenia. Największe szanse na pojawienie się infekcji to czas tak zwanego otwartego okna czyli pierwsze 3-72 godziny po zakończonym wysiłku. Badania eksperymentalne Demarzo i Garcia (2004) podkreślają, że u zwierząt poddanych intensywnemu wysiłkowi fizycznemu dochodzi do wzrostu ryzyka powstania nowotworów oraz ich przerzutów z powodu uszkodzeń oksydacyjnych DNA wolnych rodników. Obserwacje Korhonen i wsp., (2000), Raidal i wsp. (2000), Robson i wsp. (2003) przeprowadzone na koniach, które były poddane treningowi o wysokiej intensywności wskazały na leukocytozę, wzrost neutrofilów, a także limfopenię (mniejszy udział komórek T CD4 + i NK). Dodatkowo u zwierząt tych dochodziło do osłabienia funkcji komórek odpornościowych poprzez spadek fagocytarnej i bakteriobójczej aktywności neutrofilów, monocytów i makrofagów płucnych, zaburzenia proliferacji limfocytów, a także upośledzenia cytotoksycznej aktywności komórek NK (Korhonen i wsp., 2000; Malinowski i wsp., 2004; Robson i wsp., 2003).

Badania Hack i wsp. (1994) oraz Nieman (2000) wykazują, że intensywny wysiłek fizyczny, podejmowany jednorazowo lub regularnie o obciążeniu trwającym >60 min, >60% VO<sub>2</sub>max, prowadzi do zaburzenia aktywności czynnościowej komórek odpornościowych. Również Kurowski i Kowalski (2014) twierdzą, że trening o wysokiej intensywności, może doprowadzić do podwyższonej wrażliwości na infekcje poprzez zaburzenie stymulacji mechanizmów odpornościowych. Ostrowski i wsp. (2001) zauważyli wysoki wzrost stężenia IL-8 i MIP-1 $\alpha$  w osoczu uczestników 30 minut po zakończonym biegu maratońskim. Z kolei Peake (2002) podkreślają, że do dużego lecz przemijającego wzrostu poziomu granulocytów prowadzi pierwsze 30 minut intensywnego lecz krótkotrwałego treningu. Zwiększenie liczby monocytów prozapalnych CD14+/CD16+ także podczas intensywnego wysiłku zaobserwowali Steppich i wsp. (2000).

Wpływ treningu fizycznego na układ immunologiczny w chorobie nowotworowej jest bardzo istotny. Należy podkreślić, że wysiłek fizyczny jest stosowany w terapii wielu

przewlekłych chorób (Hambrecht i wsp., 2000; Knowler i wsp., 2002). Jednak włączenie aktywności fizycznej w terapię przeciwnowotworową jest relatywnie nowe. Dopiero w latach 90 XX wieku przedstawiono pierwsze dane odnośnie oddziaływania treningu fizycznego na układ immunologiczny u chorych na nowotwory (Uhlenbruck i Order, 1991).

Przeprowadzone badania na grupach trenujących oraz kontrolnych dotyczące poziomu subpopulacji limfocytów na modelu 2 (prewencja wtórna) miały ukazać czy istnieje zróżnicowanie subpopulacji limfocytów w porównaniu z grupą kontrolną. W tym modelu, analizując wybrane subpopulacje limfocytów wykazano z kolei istotnie niższe wartości średniej w grupie trenującej w porównaniu z grupą kontrolną. Tym samym w prewencji wtórnej nie obserwuje się immunostymulującego działania zastosowanego treningu fizycznego. Natomiast badania przeprowadzone na grupach zależnych od poziomu intensywności treningu fizycznego wykazały brak istotnych różnic między grupami.

Badania eksperymentalne przeprowadzone na myszach przez Pedersen i Hoffman-Goetz (2000) wykazały, że trening fizyczny na bieżni ruchomej prowadzony przez okres 8 tygodni skutkuje nie tylko zmniejszeniem wielkości guza, ale także podwyższeniem aktywności komórek NK oraz wzrostem aktywności makrofagów.

Abdalla i wsp. (2014) podkreśla, że aktywność fizyczna w postaci pływania w mysim modelu raka sutka wspomagała polaryzację przeciwnowotworową (M1 – makrofagi otrzewnowe po stymulacji lipopolisacharydamu). Natomiast w grupie niepodjęjącej aktywności fizycznej myszy utrzymywały fenotyp pierwotny M2. Dodatkowo na wzrost cytolyzy komórek nowotworowych przez makrofagi otrzewnowe o 50% wpłynął długotrwały trening na bieżni (Lu i wsp., 1999). Powyższe dane nasuwają wniosek, że wysiłek fizyczny wpływa na zmiany polaryzacji makrofagów, co może spotęgować przeciwnowotworowe działanie TAM (receptory tyrozyny kinaz). Związek między wysiłkiem fizycznym a poziomem limfocytów regulatorowych T (Treg), czyli odpowiedzią przeciwnowotworową w mysim modelu przeprowadził Goh i wsp. (2013) wykazując, że 10 tygodni dobrowolnego treningu na kole myszy (transgenicznym MMTV-PyMT) z rakiem sutka przyczyniło się do redukcji wielkości guza i 4-krotnego zmniejszenia

ekspresji CCL22. Natomiast badanie przeprowadzone przez Abdalla i wsp. (2013) ukazało, że u myszy z rakiem sutka aktywność fizyczna pomniejsza odsetek Treg w śledzionie. Przeciwnie wnioski sugeruje natomiast Wang i wsp. (2012), którzy uważają, że aktywność fizyczna intensyfikuje liczbę Treg.

Zrealizowane badania kliniczne przez Walsh i wsp. (2011) oraz Daroux-Cole i wsp. (2013) sugerują, że układ odpornościowy u osób z nowotworem stymulują ćwiczenia fizyczne. Również Woźniwski (2002) podkreśla korzystny wpływ regularnie podejmowanej aktywności fizycznej na aktywację procesów odpornościowych, która zwiększa działanie układu immunologicznego. Z kolei badania Fairey i wsp. (2005a) ukazały wzrost ilości komórek NK u kobiet aktywnych fizycznie, po wcześniejszym leczeniu raka piersi. Badacze tacy jak Ballard-Barbash i wsp. (2012) oraz Goh i wsp. (2014) podkreślają lepsze wyniki leczenia chorych na raka piersi w wyniku prowadzonych ćwiczeń.

Autorzy Zhang i wsp. (2019) stawiają hipotezę, że ćwiczenia wpływają na fizjologiczne mikrośrodowisko guza, czyli na normalizację mikrokrążenia guza, co w efekcie wiąże się z polepszeniem odpowiedzi immunologicznej. Również wpływ ćwiczeń na mikrośrodowisko guza podkreślają inni autorzy (Betof i wsp., 2015; Jones i wsp., 2010; Jones i wsp., 2012), którzy twierdzą, że wysiłek fizyczny redukuje niedotlenienie guza, koryguje dojrzałość naczyń i polepsza perfuzję. Co więcej Koelwyn i wsp. (2017) zaznaczają, że korzystny wpływ treningu fizycznego na zahamowanie rozwoju nowotworów wynika z przeprogramowania mikrośrodowiska guza związanego ze zmianami w metabolizmie, angiogenezie, wydolności tlenowej i odpowiedzi immunologicznej. Należy podkreślić, że niedotlenienie guza wpływa na progresję guza oraz na jego radio- i chemio – odporność. Dzięki lepszej perfuzji oraz mniejszej hipoksji w mikrośrodowisku guza może ulec poprawie dystrybucja leku, może dojść do zwiększenia odpowiedzi guza na chemioterapię, a w efekcie końcowym może dojść do polepszenia rokowania. Również w modelu zwierzęcym Jones i wsp. (2010) zaobserwowali, że podejmowanie ćwiczeń fizycznych u myszy z rakiem piersi powoduje wzrost perfuzji wewnątrzkomórkowej oraz obniżenie hipoksji wewnątrzkomórkowej.

Allen i wsp. (2017) oraz Chouaib i wsp. (2017) podkreślają, że wysiłek fizyczny wpływa także na proces przemieszczania się komórek odpornościowych do guzów. Zaobserwowano wpływ aktywności fizycznej na normalizację unaczynienia guza, dzięki której poprawie ulega dynamika przedostawania się cząstek adhezyjnych komórek śródbłonna, co w efekcie końcowym powoduje lepsze wejście do miększu guza komórek układu odpornościowego - leukocytów. Również Betof i wsp. (2015) i Schadler i wsp. (2016) zauważyli, że w mysim modelu raka po wysiłku fizycznym dochodzi do normalizacji naczyniowej guzów.

Badania wysiłkowe wykazały, że ćwiczenia fizyczne wpływają na wrodzony układ odpornościowy, który stanowi pierwszą linię obrony przed powstającymi nowotworami, poprzez zwiększoną tendencję do intensywnego reagowania komórek NK i makrofagów na nowotwory. Wysiłek fizyczny o wysokiej intensywności powoduje wzrost komórek NK we krwi o 50–500% (Millard i wsp., 2013; Hoffman–Goetz i wsp., 1990). Badacze Kagi i wsp. (1994) oraz Pardo i wsp. (2002) twierdzą, że komórki nowotworowe bezpośrednio zabijają komórki NK dzięki wykorzystaniu mechanizmu polegającego na destrukcji komórek poprzez uwolnienie białka: perforyny. Według Hayakawa i Smyth (2006) komórki NK są zaangażowane w komunikację krzyżową z komórkami dendrytycznymi. W dalszej części szlaku powyżej opisana komunikacja krzyżowa może zintensyfikować prezentację antygeny i odpowiedzi komórek efektorowych (Ames i Murphy, 2014; Srivastava i wsp., 2013; Vitale i wsp., 2005).

Hutnick i wsp. (2005) i Fairey i wsp., (2005a) sugerują, że u kobiet z rakiem piersi komórki odpornościowe takie jak komórki NK, limfocyty mogą zostać aktywowane poprzez ćwiczenia aerobowe o umiarkowanej intensywności oraz połączenie treningu aerobowego z oporowym. Również badania Mohamady i wsp. (2013) wskazują na poprawę aktywności komórek NK po wprowadzonej interwencji sportowej u pacjentek z rakiem piersi po zabiegu mastektomii. Także Evans i wsp. (2015) zgłosili zwiększenie odsetka komórek NK u osób z nowotworem piersi biorących udział w ćwiczeniach. Badania Fairey i wsp. (2003) przeprowadzone na grupie pacjentek z wczesnym stadium raka piersi wykazały, że 15-tygodniowy aerobowy trening wpływa na zmianę znaczenia funkcji komórek NK. W powyższym badaniu sprawdzono produkcję cytokin w komórkach jądrzastych lecz nie



zaobserwowano istotnych różnic w cytokinach prozapalnych takich jak: IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 oraz w cytokinach przeciwzapalnych: IL-4, IL-10. Odwrotne wyniki badań uzyskał Payne i wsp. (2008), którzy wykazali wpływ ćwiczeń fizycznych na poziom IL-6 i kortyzolu w surowicy w grupie 20 pacjentek po menopauzie z rakiem piersi otrzymujących terapię hormonalną. Demark-Wahnefried i wsp. (2015), Schmitz i wsp. (2010) podkreślają korzystny wpływ treningu łączonego (trening aerobowy i oporowy) u osób, które przeżyły raka piersi. Podejmowanie treningu fizycznego na poziomie: 150 minut ćwiczeń w tygodniu, w tym 2 dni treningu oporowego skutkowało w tej grupie osób redukcją poziomu prozapalnych cytokin. Dlatego osoby, które przeszły nowotwór piersi powinny wykonywać powyżej opisany schemat ćwiczeń w celu polepszenia ich profilu zapalnego, ponieważ utrzymujący się permanentnie stan zapalny na niskim poziomie, może spowodować powstanie nowotworów wtórnych (Donin i wsp., 2016).

Natomiast Fairey i wsp., (2005b) oraz Pierce i wsp. (2009b) wskazują, że wysiłek fizyczny wpływa na spadek poziomu CRP (białko C-reaktywne, biomarker ostrej fazy, wzrasta gdy w organizmie występuje stan zapalny). Dodatkowo Ergun i wsp. (2013) zaobserwowali spadek poziomu białka odpowiedzialnego za aktywację neutrofilów nabłonka i cytokin prozapalnych u kobiet, które przeżyły raka piersi i prowadziły 12-tygodniowy trening aerobowy w domu.

Hutnick i wsp. (2005) zauważyli wpływ ćwiczeń na adaptacyjny układ odpornościowy. Na podstawie przeprowadzonych nadzorowanych przez okres 12 tygodni ćwiczeń na grupie pacjentek z rakiem piersi po chemioterapii zaobserwowano, że trening fizyczny wpłynął na zwiększenie liczby komórek CD4<sup>+</sup> / CD9<sup>+</sup> (CD9 marker aktywacji limfocytów T) o 50% w porównaniu z grupą kontrolną, która nie brała udziału w ćwiczeniach. Jednak nie zmieniły się liczby komórek: CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, B lub NK. Badacze sugerują wnioski, że aktywność fizyczna zwiększa zdolności odpornościowe u pacjentek z rakiem piersi, które podejmowały się treningu fizycznego.

Hanahan i Weinberg (2011) zaznaczają, że nowotwory cechuje zmieniony metabolizm komórkowy. Powszechnym zjawiskiem jest efekt Warburga charakteryzujący się intensywnym wytwarzaniem mleczanu w szlakach glikolizy i glutaminolizy w wyniku

pobudzania przez tlen. Gottfried i wsp. (2006), Hirschhaeuser i wsp. (2011) oraz Husain i wsp. (2013) przypuszczają, że metabolity guza mogą oddziaływać na funkcje komórek immunologicznych. Powyżej wymienieni badacze twierdzą, że na hamowanie przeciwnowotworowej odpowiedzi immunologicznej wpływa zwiększona produkcja egzogenego mleczanu przez guzy poprzez hamowanie funkcji cytolitycznych NK i migracje makrofagów, a także poprzez wpływ na aktywację komórek dendrytycznych i prezentację przez nie antygenów. Natomiast Barsoum i wsp. (2014) sugerują, że do ucieczki nowotworów przed cytotoksycznymi limfocytami T przyczynia się hipoksja. Trening fizyczny aerobowy normalizuje immunosupresyjne kwaśne środowisko guza. Wykonane przez Aveseh i wsp. (2015) badania wykazały, że u myszy z rakiem sutka podejmujących trening na bieżni do biegania dochodzi do redukcji guza i zmniejszenia stężenia mleczanu o 17% w krwiobiegu, w porównaniu z myszami o sedentarnym trybie życia. Natomiast badania przeprowadzone przez Pedersen i wsp. (2015) sugerują, że trening o wysokim poziomie intensywności np. 1 godzina pływania u myszy, które posiadają guz MDA-MB-231, powoduje wzrost regulacji sygnalizacji AMPK w obrębie guza. Tak więc ćwiczenia fizyczne mogą aktywować szlaki metaboliczne.

Szereg badań wskazuje, że rak piersi jest związany z otyłością. Nowotwory wykorzystują tkankę tłuszczową do replikacji i rozwoju. Wysiłek fizyczny może łagodzić zaburzenia immunometaboliczne tkanki tłuszczowej w chorobach nowotworowych. Komórki odpornościowe pełnią rolę w modulowaniu stanu zapalnego poprzez wydzielanie adipocytokin. Aktywność fizyczna pod postacią ćwiczeń aerobowych może doprowadzić do modyfikacji adipocytokiny i miokiny. Zatem trening aerobowy w populacji otyłej jest w stanie zmniejszyć zaburzenia metaboliczne odpowiedzialne za stan zapalny i w ten sposób zapobiegać związkowi między otyłością a nowotworem.

Reasumując, badania zarówno eksperymentalne jak i populacyjne sugerują obszerne pozytywne działanie aktywności fizycznej na rozwój i przebieg raka piersi, podkreślają również rolę aktywności fizycznej w zmniejszeniu częstotliwości występowania nowotworów i ich przerzutów. Mimo wszystko doniesienia odnoszące się do potencjalnych mechanizmów immunologicznych stanowiące fundamenty pozytywnego efektu są w dalszym ciągu we wczesnym stadium opracowania. Wyniki badań wskazują, że trening

fizyczny może oddziaływać na układ immunologiczny. Potrzebne jest jednak dogłębniejsze przeprowadzenie analiz, aby zrozumieć ten mechanizm. Prawidłowo zaprogramowane badania są niezbędne dla uzyskania potwierdzenia czy aktywność fizyczna wpływa bezpośrednio na mechanizmy odpornościowe w celu zapobiegania nowotworom oraz czy trening fizyczny może być stosowany razem z podstawowymi immunoterapiami w celu poprawy wyników klinicznych u kobiet z rakiem piersi.

## VI 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.

## VII PIŚMIENICTWO

1. Abdalla DR, Aleixo AA, Murta EF, Michelin MA. Innate immune response adaptation in mice subjected to administration of DMBA and physical activity. *Oncol Lett* 2014, 7(3): 886-890.
2. Abdalla DR, Murta EF, Michelin MA. The influence of physical activity on the profile of immune response cells and cytokine synthesis in mice with experimental breast tumors induced by 7,12-dimethylbenzanthracene. *Eur J Cancer Prev* 2013, 22(3): 251-258.
3. Allen E, Jabouille A, Rivera LB, Lodewijckx I, Missiaen R, Steri V, Feyen K, Tawney J, Hanahan D, Michael IP, Bergers G. Combined antiangiogenic and anti-PD-L1 therapy stimulates tumor immunity through HEV formation. *Sci Transl Med* 2017, 9(385): eaak9679.
4. Allin KH, Nordestgaard BG. Elevated C-reactive protein in the diagnosis, prognosis, and cause of cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011, 48(4): 155-170.
5. Alvarado A, Gil da Costa RM, Faustino-Rocha AI, Ferreira R, Lopes C, Oliviera PA, Colaco B. Effects of exercise training on breast cancer metastasis in a rat model. *Int J Exp Pathol* 2017, 98(1): 40-46.
6. Ames E, Murphy WJ. Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2014, 63(1): 21-8.
7. Anderson SK. Biology of Natural Killer Cells: What is the relationship between natural killer cells and cancer? Will an increased number and/or function of natural killer cells result in lower cancer incidence? *J Nutr* 2005, 135(12): 2910.
8. Arditi JD, Venihaki M, Karalis KP, Chrousos GP. Antiproliferative effect of adiponectin on MCF7 breast cancer cells: a potential hormonal link between obesity and cancer. *Horm Metab Res* 2007, 39(1): 9-13.
9. Aveseh M, Nikooie R, Aminaie M. Exercise-induced changes in tumour LDH-B and MCT1 expression are modulated by oestrogen-related receptor alpha in breast cancer-bearing BALB/c mice. *J Physiol* 2015, 593(12): 2635-2648.

- 10.** Bacurau RF, Belmonte MA, Seelaender MCL, Costa Rosa LF. Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of tumour-bearing rats. *Cell Biochem Funct* 2000, 18(4): 249–258.
- 11.** Ballard-Barbash R, Friedenreich CM, Courneya KS, Siddiqi SM, McTiernan A, Alfano CM. Physical activity, biomarkers, and disease outcomes in cancer survivors: a systematic review. *J Natl Cancer Inst* 2012, 104(11): 815–840.
- 12.** Barsoum IB, Koti M, Siemens DR, Graham CH. Mechanisms of hypoxia-mediated immune escape in cancer. *Cancer Res* 2014, 74(24): 7185–7190.
- 13.** Bernstein L. Exercise and breast cancer prevention. *Curr Oncol Rep* 2009, 11(6): 490–496.
- 14.** Betof AS, Lascola CD, Weitzel D, Landon C, Scarbrough PM, Devi GR, Palmer G, Jones LW, Dewhirst MW. Modulation of murine breast tumor vascularity, hypoxia and chemotherapeutic response by exercise. *J Natl Cancer Inst* 2015, 107(5): djv040.
- 15.** Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. Weight control and physical activity in cancer prevention. *Obes Rev* 2002, 3(1): 5-8.
- 16.** Brylińska J, Kwiatkowska J. Zwierzęta laboratoryjne – metody hodowli i doświadczeń. Wyd. Universitas, Kraków 1996.
- 17.** Campbell MJ, Scott J, Maecker HT, Park JW, Esserman LJ. Immune dysfunction and micrometastases in women with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005, 91(2): 163-171.
- 18.** Cardiff RD, Wellings SR. The Comparative Pathology of Human and Mouse Mammary Glands. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999, 4(1): 105–122.
- 19.** Cavallo F, Giovarelli M, Gulino A, Vacca A, Stoppacciaro A, Modesti A, Forni G. Role of the neutrophils and CD4+ T lymphocytes in the primary and memory response to nonimmunogenic murine mammary adenocarcinoma made immunogenic by IL-2 gene. *J Immunol* 1992, 149(11): 3627-3635.
- 20.** Chouaib S, Noman MZ, Kosmatopoulos K, Curran MA. Hypoxic stress: obstacles and opportunities for innovative immunotherapy of cancer. *Oncogene* 2017, 36(4): 439-445 .

- 21.** 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.
- 22.** Cohen LA. Physical activity and cancer. *Cancer Prev* 1991, 26: 1-10.
- 23.** Cohen LA, Boylan E, Epstein M, Zang E. Voluntary Exercise and Experimental Mammary Cancer. *Adv Exp Med Biol* 1992, 322: 41- 59.
- 24.** Curigliano G. Immunity and autoimmunity: revising the concepts of response to breast cancer. *Breast* 2011, 20(3): 71-74.
- 25.** Daroux-Cole L, Pettengell R, Jewell A. Exercise for cancer survivors: A review. *OA Cancer* 2013, 20: 5.
- 26.** De Lima C, Alves L, Iagher F, Machado AF, Bonatto SJ, Kuczera D, De Souza CF, Pequito DC, Muritiba AL, Nunes EA, Fernandes LC. Anaerobic exercise reduces tumor growth, cancer cachexia and increases macrophage and lymphocyte response in Walker 256 tumor-bearing rats. *Eur J Appl Physiol* 2008, 104(6): 957–964.
- 27.** De Lima C, Alves L, Iagher F, Machado AF, Kryczyk M, Yamazaki RK, Brito GA, Nunes EA, Naliwaiko K and Fernandes LC. Tumor growth reduction in Walker 256 tumorbearing rats performing anaerobic exercise: participation of Bcl2, Bax, apoptosis, and peroxidation. *Appl Physiol Nutr Metab* 2011, 36(4): 533-538.
- 28.** Demark-Wahnefried W, Rogers, LQ, Alfano CM, Thomson CA, Courneya KS, Meyerhardt JA, Stout NL, Kvale E, Ganzer H, Ligibel JA. Practical clinical interventions for diet, physical activity, and weight control in cancer survivors. *CA Cancer J Clin* 2015, 65(3): 167-189.
- 29.** Demarzo MM, Garcia SB. Exhaustive physical exercise increases the number of colonic preneoplastic lesions in untrained rats treated with a chemical carcinogen. *Cancer Lett* 2004, 216(1): 31–34.
- 30.** Demarzo MM, Martins LV, Fernandes CR, Herrero FA, Perez SE, Turatti A, Garcia SB. Exercise reduces inflammation and cell proliferation in rat colon carcinogenesis. *Med Sci Sports Exerc* 2008, 40(4): 618–621.



- 31.** 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.
- 32.** Deptuła W, Tokarz-Deptuła B, Pisarski RK. *Immunologia- fakty znane i nieznanne*. W: PWSZ, Legnica, 2014.
- 33.** Deptuła W, Tokarz-Deptuła B, Stosik M. *Immunologia dla biologów*. W: US, Szczecin, 2008.
- 34.** 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.
- 35.** Dieli-Conwright CM, Lee K, Kiwata JL. Reducing the Risk of Breast Cancer Recurrence: an Evaluation of the Effects and Mechanisms of Diet and Exercise. *Curr Breast Cancer Rep* 2016, 8(3): 139–150.
- 36.** Dong C, Martinez GJ. T cells: the usual subsets. *Nat Rev Immunol* 2010: 11.
- 37.** Donin N, Filson C, Drakaki A, Tan HJ, Castillo A, Kwan L, Litwin M, Chamie K. Risk of second primary malignancies among cancer survivors in the United States. *Cancer* 2016, 122(19): 3075–3086.
- 38.** Donnelly CM, Blaney JM, Lowe-Strong A, Rankin JP, Campbell A, McCrum-Gardner E, Gracey JH. A randomised controlled trial testing the feasibility and efficacy of a physical activity behavioural change intervention in managing fatigue with gynaecological cancer survivors. *Gynecol Oncol* 2011, 122(3): 618-624.
- 39.** Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002, 3(11): 991-998.
- 40.** Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006, 6(11): 836-848.
- 41.** Dymarska E. *Czynniki modelujące układ immunologiczny człowieka*. Zeszyty Naukowe Państwowej Wyższej Szkoły Zawodowej im. Witelona w Legnicy 2016, 19(2): 21-37.

- 42.** Edwards AJ, Bacon TH, Elms CA, Verardi R, Felder M, Knight SC. Changes in the populations of lymphoid cells in human peripheral blood following physical exercise. *Clin Exp Immunol* 1984, 58(2): 420-427.
- 43.** Ergun M, Eyigor S, Karaca B, Kisim A, Uslu R. Effects of exercise on angiogenesis and apoptosis-related molecules, quality of life, fatigue and depression in breast cancer patients. *Eur J Cancer Care* 2013, 22 (5): 626–637.
- 44.** Escribano BM, Castejon FM, Vivo R, Santisteban R, Aguera EI, Rubio MD. Effects of training on phagocytic and oxidative metabolism of peripheral neutrophils in horses exercised in the aerobic-anaerobic transition area. *Vet Res Commun* 2005, 29(2): 149-158.
- 45.** Evans ES, Hackney AC, McMurray RG, Randell SH, Muss HB, Deal AM, Battaglini CL. Impact of Acute Intermittent Exercise on Natural Killer Cells in Breast Cancer Survivors. *Integr Cancer Ther* 2015, 14(5): 436-445.
- 46.** 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.
- 47.** Fairey AS, Courneya KS, Field CJ, Bell GJ, Jones LW, Mackey JR. Randomized controlled trial of exercise and blood immune function in postmenopausal breast cancer survivors. *J Appl Physiol* 2005a, 98(4): 1534–1540.
- 48.** 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.
- 49.** 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.
- 50.** Friedenreich CM. Physical activity and breast cancer: review of the epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Recent Results Cancer Res* 2011, 188: 125-139.
- 51.** Frisch RE, Wyshak G, Albright NL, Albright TE, Schiff I, Jones KP, Witschi J, Shiang E, Koff E, Marguglio M. Lower prevalence of breast cancer and cancers of the

reproductive system among former college athletes compared to non – athletes. *Br J Cancer* 1985, 52(6): 885 – 891.

**52.** Gajewski A. (red). *Kobieta, sport, zdrowie*. Polskie Stowarzyszenie Sportu Kobiet, Warszawa, 1998.

**53.** 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.

**54.** Gleeson M, Bishop NC. The T cell and NK cell immune response to exercise. *Ann Transplant* 2005, 10(4): 43-8.

**55.** Goh J, Niksirat N, Campbell KL. Exercise training and immune crosstalk in breast cancer microenvironment: exploring the paradigms of exercise-induced immune modulation and exercise-induced myokines. *Am J Transl Res* 2014, 6 (5): 422-438.

**56.** Goh J, Tsai J, Bammler TK, Farin FM, Endicott E, Ladiges WC. Exercise Training in Transgenic Mice Is Associated with Attenuation of Early Breast Cancer Growth in a Dose-Dependent Manner. *PLoS One* 2013, 8(11): e80123.

**57.** Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T. *Immunologia*. W: PZWL, Warszawa 2012.

**58.** Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T. *Immunologia*. W: PWN, Warszawa 2017.

**59.** Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreesen R, Mackensen A, Kreutz M. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* 2006, 107(5): 2013–2021.

**60.** Hack V, Strobel G, Weiss M, Weicker H. PMN cell counts and phagocytic activity of highly trained athletes depend on training period. *J Appl Physiol* 1994, 77(4): 1731-1735.

**61.** Hackshaw AK, Paul EA. Breast self-examination and death from breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 2003, 88(7): 1047-1053.

**62.** 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.

**63.** Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, Schoene N, Schuler G. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000, 342(7): 454–460.

**64.** Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, 144(5): 646–674.

**65.** Hayakawa Y, Smyth MJ. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J Immunol* 2006, 176: 1517-1524.

**66.** Higgins KA, Park D, Lee GY, Curran WJ, Deng X. Exercise-induced lung cancer regression: mechanistic findings from a mouse model. *Cancer* 2014, 120(21): 3302-3310.

**67.** Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res* 2011, 71(22): 6921–6925.

**68.** Hoffman-Goetz L, Simpson JR, Cipp N, Arumugam Y, Houston ME. Lymphocyte subset responses to repeated submaximal exercise in men. *J Appl Physiol* 1990, 68(3): 1069–1074.

**69.** Holick CN, Newcomb PA, Trentham-Dietz A, Titus-Ernstoff L, Bersch AJ, Stampfer MJ, Baron JA, Egan KM, Willett WC. Physical activity and survival after diagnosis of invasive breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008, 17(2): 379-386.

**70.** Holmes MD, Chen WY, Feskanich D, Kroenke CH, Colditz GA. A Physical Activity and Survival After Breast Cancer Diagnosis. *JAMA* 2005, 293(20): 2479–2486.

**71.** Husain Z, Huang Y, Seth P, Sukhatme VP. Tumor-derived lactate modifies antitumor immune response: effect on myeloid-derived suppressor cells and NK cells. *J Immunol* 2013, 191(3): 1486–1495.

**72.** Hutnick NA, Williams NI, Kraemer WJ, Orsega-Smith E, Dixon RH, Bleznak AD, Mastro AM. Exercise and lymphocyte activation following chemotherapy for breast cancer. *Med Sci Sports Exerc* 2005, 37(11): 1827–1835.

- 73.** Irwin ML, McTiernan A, Manson JE, Thomson CA, Sternfeld B, Stefanick ML, Wactawski-Wende J, Craft L, Lane D, Martin LW, Chlebowski R. Physical activity and survival in postmenopausal women with breast cancer: results from the women's health initiative. *Cancer Prev Res* 2011, 4(4): 522–529.
- 74.** Jakóbisiak M, Lasek W. *Immunologia nowotworów*. W: Gołąb J, Jakóbisiak M, Lasek W, Stokłosa T (red), *Immunologia*. PWN 2007, ss. 450-467.
- 75.** Janssens JP, Vandeloo M. Rak piersi: bezpośrednie i pośrednie czynniki ryzyka związane z wiekiem i stylem życia. *N J Oncol* 2009, 59(3): 159-167.
- 76.** Jasiulewicz, A, Lisowska KA, Bryl E, Witkowski JM. Rola limfocytów B w mechanizmach patogenezy wybranych chorób. *Forum Medycyny Rodzinnej* 2011, 5(1): 37-46.
- 77.** 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.
- 78.** Jethon Z, Murawska-Ciałowicz E. Wartość aktywności ruchowej w profilaktyce nowotworowej. W: Murawska-Ciałowicz E, Zatoń M. (red), *Znaczenie aktywności ruchowej dla zdrowia. Studia i monografie AWF, Wrocław, 2005, ss.155-175.*
- 79.** Jokiel M, Bielska-Lasota M. Czynniki ryzyka raka piersi - możliwości profilaktyki pierwotnej. *Przegl Epidemiol* 2010, 64(3): 435-438.
- 80.** Jones LW, Viglianti BL, Tashjian JA, Kothadia SM, Keir ST, Freedland SJ, Potter MQ, Moon EJ, Schroeder T, Herndon JE, Dewhirst MW. Effect of aerobic exercise on tumor physiology in an animal model of human breast cancer. *J Appl Physiol* 2010, 108(2): 343–348.
- 81.** Jones LW, Antonelli J, Masko EM, Broadwater G, CD Lascola, Fels D, Dewhirst MW, Dyck JR, Nagendran J, Flores CT, Betof AS, Nelson ER, Pollak M, Dash RC, Young ME, Freedland SJ. Exercise Modulation of the Host - Tumor Interaction in an Orthotopic Model of Murine Prostate Cancer. *J Appl Physiol* 2012, 113(2): 263-272.
- 82.** 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.

**83.** Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994, 369: 31-7 .

**84.** 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.

**85.** Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002, 346(6): 393-403.

**86.** 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.

**87.** Koelwyn GJ, Quail DF, Zhang X, White RM, Jones LW. Exercise-dependent regulation of the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 2017, 17(10): 620–632.

**88.** Korhonen PA, Lilius EM., Hyyppä S., Räsänen LA, Pösö AR. Production of reactive oxygen species in neutrophils after repeated bouts of exercise in Standardbred trotters. *J Vet Med A* 2000, 47(9): 565-573.

**89.** Kösters JP, Gøtzsche PC. Regular self-examination or clinical examination for early detection of breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2003, 2003(2): CD003373.

**90.** Krajowy Rejestr Nowotworów. Polskie Towarzystwo Onkologiczne. Dostęp: [http://onkologia.org.pl/raporty/#tabela\\_rok\\_](http://onkologia.org.pl/raporty/#tabela_rok_)

**91.** Kroenke CH, Chen WY, Rosner B, Holmes MD. Weight, weight gain, and survival after breast cancer diagnosis. *J Clin Oncol* 2005, 23(7): 1370-1378.

- 92.** 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.
- 93.** Kruk J. Deklarowana aktywność fizyczna a ryzyko raka piersi. *J Clin Oncol* 2007, 57(6): 677-684.
- 94.** Krumrych W. Effect of physical exercise on oxygen metabolism of neutrophils in horses. *Bull Vet Inst Pulawy* 2009, 53(1): 97-103.
- 95.** Kurowski M, Kowalski ML. Wpływ wysiłku fizycznego na odpowiedź immunologiczną – wybrane zagadnienia. *Alergia Astma Immunologia* 2014, 19(3): 144- 149.
- 96.** 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.
- 97.** Lahmann PH, Schulz M, Hoffmann K, Boeing H, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Key TJ, Allen NE, Khaw KT, Bingham S, Berglund G, Wirfält E, Berrino F, Krogh V, Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D, Kaaks R, Riboli E. Long-term weight change and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). *Br J Cancer* 2005, 93(5): 582-589.
- 98.** Larsson SC, Mantzoros CS, Wolk A. Diabetes mellitus and risk of breast cancer: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2007, 121(4): 856-862.
- 99.** Litwiniuk M, Kara I. Aktywność fizyczna a nowotwory. *Onco Review* 2012, 2(4): 228-233.
- 100.** Lu Q, Ceddia MA, Price EA, Ye SM, Woods JA. Chronic exercise increases macrophage-mediated tumor cytotoxicity in young and old mice. *Am J Physiol* 1999, 276(2): R482-9.
- 101.** Lynch BM, Neilson HK, Friedenreich CM. Physical activity and breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res* 2011, 186: 13-42.
- 102.** Mackiewicz J, Mackiewicz A. Immunoterapia nowotworów i perspektywy jej rozwoju. *Contemp Oncol*, 2010, 14(2): 59-71.

- 103.** Makowski M, Połać I, Petryński T. Oestrogens and breast cancer. *Menopause Review* 2007, 6(3):150-154.
- 104.** Malczyk E, Majkrzak Ż. Wybrane elementy stylu życia a ryzyko rozwoju raka piersi. *Probl Hig i Epidemiol* 2014, 95(4): 827-830.
- 105.** Male D, Roth DB, Roitt I, Brostoff J. *Immunologia*. Elsevier Urban & Partner, Wrocław, 2008.
- 106.** Malicka I, Pawłowska K. Aktywność ruchowa w prewencji pierwotnej i wtórnej raka piersi. *Rehabilitacja Medyczna* 2008, 12(1): 32-38.
- 107.** Malicka I, Siewierska K, Pula B, Kobierczyki C, Haus D, Paślowska 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.
- 108.** Malicka I, Siewierska K, Kobierzycki C, Grzegorzółka J, Piotrowska A, Paślowska U, Cegielski M, Dziegiel P, Podhorska-Okolow M, Woźniewski M. Impact of Physical Training on Sex Hormones and Their Receptors During N-Methyl- N-nitrosourea-induced Carcinogenesis in Rats. *Anticancer Res* 2017, 37(7): 3581-3589.
- 109.** Malinowski M, Kearns CF, Guirnalda PD, Roegner V, McKeever KH. Effect of chronic clenbuterol administration and exercise training on immune function in horses. *J Anim Sci* 2004, 82(12): 3500-3507.
- 110.** Mann PB, Jiang W, Zhu Z, Wolfe P, McTiernan A, Thompson HJ. Wheel running, skeletal muscle aerobic capacity and 1-methyl-1-nitrosourea induced mammary carcinogenesis in the rat. *Carcinogenesis* 2010, 31(7): 1279–1283.
- 111.** Matkowski R, Gisterek I, Halon A, Lacko A, Szewczyk, K, Staszek U, Pudelko M, Szynglarewicz B, Szelachowska J, Zolnierek A, Kornafel J. The prognostic role of tumor-infiltrating CD4 and CD8 T lymphocytes in breast cancer. *Anticancer Res* 2009, 29(7): 2445-2451.
- 112.** 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.



- 113.** 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.
- 114.** McTiernan A, Tworoger SS, Ulrich CM, Yasui Y, Irwin ML, Rajan KB, Sorensen B, Rudolph RE, Bowen D, Stanczyk FZ, Potter JD and Schwartz RS: Effect of exercise on serum estrogens in postmenopausal women: a 12-month randomized clinical trial. *Cancer Res* 2004, 64(8): 2923-2928.
- 115.** 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.
- 116.** Millard AL, Valli PV, Stussi G, Mueller NJ, Yung GP, Seebach JD. Brief exercise increases peripheral blood NK cell counts without immediate functional changes, but impairs their responses to ex vivo stimulation. *Front Immunol* 2013, 4: 125.
- 117.** Mohamady TM, Borhan WH, Abdallah W, Abdelghani S. Effect of selected exercise program on natural killer cytotoxic cells activity of post-mastectomy patients. *BJBAS* 2013, 2(2): 114-119.
- 118.** Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer* 2019, 11: 151-164.
- 119.** Mucha J, Majchrzak K, Taciak B, Hellmén E, Król M. MDSCs mediate angiogenesis and predispose canine mammary tumor cells for metastasis via IL-28/IL-28RA (IFN- $\lambda$ ) signaling. *PLoS One* 2014, 9(7): e103249.
- 120.** Mucha J, Rybicka A, Dolka I, Szymańska J, Manuali E, Parzeniecka-Jaworska M, Kluciński W, Król M. Immunosuppression in dogs during mammary cancer development. *Vet Pathol* 2016, 53(6): 1147-1153.
- 121.** Neilson HK, Friedenreich CM, Brockton NT, Millikan RC. Physical activity and postmenopausal breast cancer: proposed biological mechanisms and areas for future research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009, 18(1): 11-27.
- 122.** Nelson BH. CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 2010, 185(9): 4977-4982.

- 123.** Nelson HD, Tyne K, Naik A, Bougatsos C, Chan BK, Humphrey L. Screening for breast cancer: an update for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2009, 151(10): 727-737.
- 124.** Nicklas BJ, You T, Pahor M. Behavioural treatments for chronic systemic inflammation: effects of dietary weight loss and exercise training. *CMAJ* 2005, 172(9): 1199-1209.
- 125.** Niedźwierska-Rystwej P, Tokarz-Deptuła B, Pisarski R, Deptuła W. Subpopulacje limfocytów T. *Med Weter* 2013, 69(8): 461-465.
- 126.** Nieman DC. Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. *Med Sci Sports Exerc* 1994, 26(2): 128-139.
- 127.** Nieman DC. Exercise effects on systemic immunity. *Immunol Cell Biol* 2000, 78(5): 496-501.
- 128.** Nieman DC. Does exercise alter immune function and respiratory infections? President's Council on Physical Fitness and Sports Research Digest 2001, 3(13): 1-8.
- 129.** Niemiec J, Ryś J. Morfologia i immunocharakterystyka raka piersi w świetle nowych poglądów na temat karcinogenezy. *Pol J Pathol* 2009, 3(1): 1-9.
- 130.** Nienartowicz E. Diagnostyka mammograficzna raka piersi. W: Kornafel J (red), Rak piersi. CMKP, Warszawa, 2011, ss. 35-43.
- 131.** Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, Ohmi Y, Yahata T, Nakui M, Sato T, Habu S, Tashiro H, Sato M, Ohta A. Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo. *J Exp Med* 1999, 190(5): 617-628.
- 132.** 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.
- 133.** Ostrowski K, Rohde T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Chemokines are elevated in plasma after strenuous exercise in humans. *Eur J Appl Physiol* 2001, 84(3): 244-245.

- 134.** Palesh O, Kamen C, Sharp S, Golden A, Neri E, Spiegel D, Koopman C. Physical Activity and Survival in Women with Advanced Breast Cancer. *Cancer Nurs* 2018, 41(4): 31-38.
- 135.** Pardo J, Balkow S, Anel A, Simon MM. Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perf-facilitated tumor control. *Eur Immunol* 2002, 32(10): 2881-2887.
- 136.** Payne JK, Held J, Thorpe J, Shaw H. Effect of exercise on biomarkers, fatigue, sleep disturbances, and depressive symptoms in older women with breast cancer receiving hormonal therapy. *Oncol Nurs Forum* 2008, 35(4): 635–642.
- 137.** Peake MJ. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exerc Immunol Rev* 2002, 8:49-100.
- 138.** Pedersen L, Christensen JF, Hojman P. Effects of Exercise on Tumor Physiology and Metabolism. *Cancer J* 2015, 21(2): 111-116.
- 139.** Pedersen B, Hoffman – Goetz L. Exercise and Immune System: Regulation Integration and Adaptation, *Physiological Reviews*. 2000; 80 (30): 1055 – 1081.
- 140.** Pierce BL, Ballard-Barbash R, Bernstein L, Baumgartner RN, Neuhaus ML, Wener MH, Baumgartner KB, Gilliland FD, Sorensen BE, McTiernan A, Ulrich CM. Elevated biomarkers of inflammation are associated with reduced survival among breast cancer patients. *J Clin Oncol* 2009a, 27(21): 3437-3444.
- 141.** Pierce BL, Neuhaus ML, Wener MH, Bernstein L, Baumgartner RN, Ballard-Barbash R, Gilliland FD, Baumgartner KB, Sorensen B, McTiernan A, Ulrich CM. Correlates of circulating C-reactive protein and serum amyloid A concentrations in breast cancer survivors. *Breast Cancer Res Tr* 2009b, 114(1): 155–167.
- 142.** Podhorska-Okolow M, Krajewska B, Carraro U, Zabel M. Apoptosis in mouse skeletal muscles after physical exercise. *Folia Histochem Cytobiol* 1999, 37(2): 127–128.
- 143.** 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.

**144.** Rack B, Andergassen U, Neugebauer J, Salmen J, Hepp P, Sommer H, Lichtenegger W, Friese K, Backmann MW, Hauner D, Hauner H, Janni W. The German SUCCESS C Study - The First European Lifestyle Study on Breast Cancer. *Breast Care* (Basel) 2010, 5(6): 395-400.

**145.** Raidal SL, Love DN, Bailey GD, Rose RJ. Effect of single bouts of moderate and high intensity exercise and training on equine peripheral blood neutrophil function. *Res Vet Sci* 2000, 68(2): 141-146.

**146.** Robson PJ, Alston TD, Myburgh KH. Prolonged suppression of the innate immune system in the horse following an 80 km endurance race. *Equine Vet J* 2003, 35(2): 133-137.

**147.** Rosato V, Bosetti C, Talamini R, Levi F, Montella M, Giacosa A, Negri E, La Vecchia C. Metabolic syndrome and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *Ann Oncol* 2011, 22(12): 2687-2692.

**148.** Ruiz-Casado A, Alejo LB, Santos-Lozano A, Soria A, Ortega MJ, Pagola I, Fiuza-Luces C, Palomo I, Garatachea N, Cebolla H, Lucia A. Validity of the physical activity questionnaires IPAQ-SF and GPAQ for cancer survivors: insights from a Spanish cohort. *Int J Sports Med* 2016, 37(12): 979-985.

**149.** 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.

**150.** 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.

**151.** Schadler KL, Thomas NJ, Galie PA, Bhang DH, Roby KC, Addai P, Till JE, Sturgeon K, Zaslavsky A, Chen CS, Ryeom S. Tumor vessel normalization after aerobic exercise enhances chemotherapeutic efficacy. *Oncotarget* 2016, 7(40): 65429-65440 .

**152.** Schmitz KH, Courneya KS, Matthews C, Demark- Wahnefried W, Galvao DA, Pinto BM, Irwin ML, Wolin KY, Segal RJ, Lucia A, Schneider CM, von Gruenigen

VE, Schwartz AL. American College of Sports Medicine roundtable on exercise guidelines for cancer survivors. *Med Sci Sports Exerc* 2010, 42(7): 1409–1426.

**153.** Shephard RJ, Shek PN. Effects of exercise and training on natural killer cell counts and cytolytic activity: a meta-analysis. *Sports Med* 1999, 28(3): 177-95.

**154.** Siewierska K, Malicka I, Kobierzycki C, Grzegorzolka J, Piotrowska A, Paslawska U, Cegielski M, Podhorska-Okolow M, Dziegiel P, Wozniowski M. Effect of Physical Training on the Levels of Sex Hormones and the Expression of Their Receptors in Rats With Induced Mammary Cancer in Secondary Prevention Model - Preliminary Study. *In Vivo* 2020, 34(2): 495-501.

**155.** Smith RA, Cokkinides V, Brooks D, Saslow D, Brawley OW. Cancer screening in the United States, 2010: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin* 2010, 60(2): 99-119.

**156.** Srivastava RM, Lee SC, Andrade PA, Lord CA, Jie HB, Davidson HC, López-Albaitero A, Gibson SP, Gooding WE, Ferrone S, Ferris RL. Cetuximab-activated natural killer and dendritic cells collaborate to trigger tumor antigen-specific T-cell immunity in head and neck cancer patients. *Clin Cancer Res* 2013, 19(7): 1858-1872.

**157.** Staniszewski J. Age at menarche and breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1971, 47(5): 935-940.

**158.** Steiner JL, Davis JM, McClellan JL, Enos RT, Murphy EA. Effects of voluntary exercise on tumorigenesis in the C3(1)/SV40Tag transgenic mouse model of breast cancer. *Int J Oncol* 2013, 42(4): 1466–1472.

**159.** 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.

**160.** Swain SL. CD4 T cell development and cytokine polarization: an overview. *J Leukoc Biol* 1995, 57(5): 795-798.

**161.** 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.

- 162.** Tanchot C, Terme M, Pere H, Tran T, Benhamouda N, Strioga M, Banissi C, Galluzzi L, Kroemer G, Tartour E. Tumor-infiltrating regulatory T cells: phenotype, role, mechanism of expansion in situ and clinical significance. *Cancer Microenviron* 2013, 6(2): 147-157.
- 163.** Teixeira GR, Fa'varo WJ, Pinheiro PF, Chuffa LG, Amorim JP, Mendes LO, Fioruci BA, Oba E, Martins OA, Martinez M, Martinez FE. Physical exercise on the rat ventral prostate: steroid hormone receptors, apoptosis and cell proliferation. *Scand J Med Sci Sports* 2012, 22(5): 86–92.
- 164.** Thompson HJ. Effect of exercise intensity and duration on the induction of mammary carcinogenesis. *Cancer Res* 1994, 54(7): 1960-1963
- 165.** Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol* 1989, 47: 187-376.
- 166.** Uhlenbruck G, Order U. Can endurance sports stimulate immune mechanisms against cancer and metastasis? *Int J Sports Med* 1991, 12(1): 63-68.
- 167.** 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.
- 168.** Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Arico M, Moretta L, Moretta A. NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 2005, 106(2): 566- 571 .
- 169.** 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.
- 170.** Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, Fleshner M, Green C, Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, Rogers CJ, Northoff H, Abbasi A, Simon P. Position statement. Part one: Immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev* 2011, 17: 6-63.
- 171.** 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.

- 172.** Wang J, Song H, Tang X, Yang Y, Vieira VJ, Niu Y, Ma Y. Effect of exercise training intensity on murine T-regulatory cells and vaccination response. *Scand J Med Sci Sports* 2012, 22(5): 643-652 .
- 173.** Westerlind KC, McCarty HL, Gibson KJ, Strange R. Effect of exercise on the rat mammary gland: implications for carcinogenesis. *Acta Physiol Scand* 2002, 175(2): 147–156.
- 174.** 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.
- 175.** 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.
- 176.** 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.
- 177.** 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](http://onkologia.org.pl/wp-content/uploads/Nowotwory_2016.pdf) .
- 178.** 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](http://onkologia.org.pl/wp-content/uploads/Nowotwory_2018.pdf).
- 179.** World Health Organization. International agency for research on cancer. Cancer Tomorrow. Dostęp: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/>.
- 180.** Woźniewski M. Kultura fizyczna w życiu ludzi chorych na nowotwory złośliwe. *Adv Clin Exp Med* 2002, 11(1): 103-108.
- 181.** 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.
- 182.** Woźniewski M. Kultura fizyczna w życiu ludzi chorych na nowotwory złośliwe. *Adv Clin Exp Med* 2002, 11(1): 103-108.

- 183.** Zammaron BF, Chen WJ. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci* 2011, 7(5): 651-658.
- 184.** Zedler S, Faist E, Ostermeier B, von Donnersmarck GH, Schildberg FW. Postburn constitutional changes in T-cell reactivity occur in CD8+ rather than in CD4+ cells. *J Trauma* 1997, 42(5): 872-880.
- 185.** Zhang X, Ashcraft KA, Warner AB, Nair SK, Dewhirst MW. Can Exercise-Induced Modulation of the Tumor Physiologic Microenvironment Improve Antitumor Immunity? *Cancer Res* 2019, 79(10): 2447-2456.
- 186.** Zhu Z, Jiang W, McGinley JN, Thompson HJ. Energetics and mammary carcinogenesis: effects of moderate-intensity running and energy intake on cellular processes and molecular mechanisms in rats. *J Appl Physiol* 2009, 106(3): 911–918.
- 187.** Zongjian Z, Jiang W, Sells JL, Neil ES, McGinley JN, Thompson HJ. Effect of nonmotorized wheel running on mammary carcinogenesis: circulating biomarkers, cellular processes and molecular mechanisms in rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008, 17(8): 1920–1929.



## STRESZCZENIE

**TYTUŁ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ:** Wpływ wysiłku fizycznego na układ immunologiczny podczas karcinogenezy wywołanej N-metylo-N-nitrozomocznikiem u szczurów.

**SŁOWA KLUCZOWE:** rak piersi, trening fizyczny, N-metylo-N-nitrozomocznik, układ immunologiczny, szczury

### Wstęp

Rak piersi jest najczęściej występującym nowotworem złośliwym u kobiet stanowiąc jeden z największych problemów epidemiologicznych XXI wieku zarówno w Polsce jak i na świecie. Zarazem coraz większe znaczenie w prewencji pierwotnej, jak i wtórnej tej choroby przypisuje się aktywności fizycznej. Prawdopodobnie występuje szereg mechanizmów wpływających na tę zależność.

### Cel pracy i hipotezy badawcze

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

Przyjęto poniższe hipotezy:

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

## **Material badawczy**

Badaną grupę (n=105) stanowiły samice szczurów rasy Sprague-Dawley ze Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach. Gryzonie podzielono na 2 modele: model prewencji pierwotnej (50 szczurów) oraz model prewencji wtórnej (55 szczurów). Następnie każdy z powyższych modeli podzielono na 3 grupy ze względu na poziom intensywności treningu fizycznego (grupa o niskim / umiarkowany / wysokim poziomie) oraz odpowiednie grupy kontrolne (brak udziału w treningu). Badania wykonano po uzyskaniu zgody komisji etycznej w Zakładzie Patomorfologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu według standardów Unii Europejskiej.

## **Metody badawcze**

Pierwszy etap badań stanowiła indukcja guza raka listwy mleczej u miesięcznych samic szczurów poprzez dootrzewnowe podanie karcinogenu N-metylo-N-nitrozomocznika w dawce 180 mg/kg masy ciała. Po upływie 4 tygodni od podania środka podjęto proces wykrywania raka listwy mleczej w celu określenia liczby oraz objętości guzów nowotworowych za pomocą badania palpacyjnego oraz dzięki wykorzystaniu głowicy USG.

Drugie etap badań stanowił trening fizyczny. Szczury przydzielone do modelu prewencji pierwotnej podjęły go bezpośrednio po podaniu karcinogenu, natomiast zwierzęta z modelu prewencji wtórnej rozpoczęły trening po 12 tygodniach od podania MNU. Trening gryzoni realizowany był przez okres 12 tygodni (5 dni w tygodniu) przy wykorzystaniu 3- pozycyjnej bieżni dla zwierząt. Szczury z grupy kontrolnej prowadziły sedentarny tryb życia.

Trzeci etap badań stanowiło pobranie tkanek (wszystkie guzy wykryte palpacyjnie, płuca, wątroba, śledziona, nerki, powiększone węzły chłonne oraz krew) od uśmierconych zwierząt.

Następnie przygotowano mikromacierze tkankowe oraz przeprowadzono reakcje immunohistochemiczne na skrawkach guzów..

Dalszy proces polegał na odnalezieniu zmian apoptotycznych w guzach nowotworowych, ocenie reakcji IHC oraz oznaczeniu komórek układu immunologicznego dzięki cytometrii przepływowej.

### **Metody statystyczne**

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

Wykorzystano głównie testy nieparametryczne. Różnice międzygrupowe (2 grupy niezależne) oceniono za pomocą testu Manna-Whitneya. Tylko masa szczura stanowiła jedyną cechę o rozkładzie normalnym, dla której zastosowano testowanie parametryczne (test t-Studenta). Zaś różnice międzygrupowe (większa liczba grup niezależnych) oceniono przy wykorzystaniu testu ANOVA Kruskala-Wallisa.

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

### **Wyniki**

W modelu 1 (prewencja pierwotna) aktywność fizyczna o umiarkowanej intensywności wpływa stymulująco na antynowotworową odpowiedź organizmu poprzez wzrost poszczególnych frakcji limfocytów, dochodzi także do zwiększenia apoptozy komórek nowotworowych oraz do zmniejszenia liczby guzów nowotworowych. Natomiast podejmowana aktywność fizyczna w powyższym modelu niezależnie od poziomu intensywności treningu nie wpływa na proliferację komórek, różnice w objętości guzów, a także na czas indukcji guza.

W modelu 2 (prewencja wtórna) aktywność fizyczna o wysokiej intensywności wpływa na zwiększenie apoptozy komórek nowotworowych. Natomiast podejmowana aktywność fizyczna w powyższym modelu niezależnie od poziomu intensywności treningu nie wpływa na różnice w objętości guzów, liczbę wyinduowanych guzów na szczura lecz

oddziałuje na czas indukcji guza. Należy podkreślić, że ryzyko proliferacji komórek jest większe w grupie ćwiczącej o umiarkowanej i wysokiej intensywności.

### **Wnioski**

Zarówno w modelu 1 i modelu 2 zaobserwowano protekcyjny wpływ regularnie podejmowanego treningu fizycznego na ryzyko zachorowania i przebieg raka listwy mlecznej u szczurów trenujących w porównaniu z grupą kontrolną. Należy podkreślić, że systematyczny trening wpływa na zmienną tunnel, która powoduje zmniejszenie rozwoju nowotworu poprzez apoptozę komórek nowotworowych.

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 mlecznej poprzez wzrost liczebności poszczególnych frakcji limfocytów.

## ABSTRACT

**TITLE OF THE DOCTORAL DISSERTATION:** The effect of physical exercise on the immune system during N-methyl-N-nitrosourea-induced carcinogenesis in rats.

**KEY WORDS:** breast cancer, physical training, N-methyl-N-nitrosourea, immune system, rats

### Introduction

Breast cancer is the most common malignancy in women, thus constituting one of the largest epidemiological problems of the 21st century both in Poland and worldwide. At the same time, physical activity gains much significance in primary and secondary breast cancer prevention. There are probably a number of mechanisms that influence this relationship.

### Aim of the research and research hypotheses

The aim of this research was to evaluate the effect of physical activity on the immune system and the onset and development of N-methyl-N-nitrosourea-induced carcinoma of the mammary ridge (milk line) in rats.

The following hypotheses were adopted:

- Physical training has a protective effect on both the development and progression of mammary ridge cancer.
- The level of proliferation, apoptotic activity of tumor cells, and the level of lymphocyte subpopulations changing under the influence of physical training are the mechanisms affecting the development and the course of mammary ridge cancer.

### Study material

The study group (n=105) consisted of female Sprague-Dawley rats from the Medical University of Silesia in Katowice, Poland. The rodents were divided into 2 models:

the primary prevention model (50 rats) and the secondary prevention model (55 rats). Each model was then divided into 3 groups based on the level of physical training intensity (low, moderate and high) and the respective control groups (no training). The study was performed after obtaining approval from the Bioethics Committee at the Department of Pathomorphology, Wrocław Medical University according to the European Union standards.

### **Research Methods**

The first stage of the research was mammary ridge tumor induction in 1-month old female rats by intraperitoneal administration of the carcinogen N-methyl-N-nitrosourea (MNU) at a dose of 180 mg/kg. After 4 weeks of the administration of the agent, detection of mammary ridge cancer was initiated to determine the number and the volume of malignant tumors by palpation and ultrasound.

Physical training was the second stage of the research. Rats assigned to the primary prevention model undertook training immediately after administration of the carcinogen, while animals assigned to the secondary prevention model began training 12 weeks after MNU administration. Rat training was performed over a period of 12 weeks (5 days per week) using a 3-position animal treadmill. The rats in the control group had a sedentary lifestyle.

The third stage of the research included tissue collection (lungs, liver, spleen, kidneys, enlarged lymph nodes, blood; all tumors were detected by palpation) from euthanized animals. Next, tissue microarrays were prepared and immunohistochemical reactions were performed on tumor sections. The further stage consisted of finding apoptotic lesions in cancerous tumors, evaluation of IHC reactions, and determining immune cells through flow cytometry.

### **Statistical methods**

Statistical analysis of the material included determination of mean values, distribution medians, and standard deviations (SD). Nonparametric tests were mainly used. Intergroup differences (2 independent groups) were assessed using the Mann-Whitney U

test. The only trait with a normal distribution was rat weight, for which parametric testing (Student's t-test) was used. Intergroup differences (a greater number of independent groups) were assessed using the Kruskal-Wallis ANOVA test. Statistical significance of the differences in means and correlations was assessed by adopting the critical level of  $p < 0.05$ . Calculations were performed using the STATISTICA 13.1 (Dell).

## **Results**

In model 1 (primary prevention), moderate-intensity physical activity stimulated the anti-cancer response by increasing specific lymphocyte fractions. Additionally, tumor cell apoptosis was increased and the number of malignant tumors was decreased. In turn, the physical activity undertaken in the above model regardless of training intensity had no effect on cell proliferation, differences in tumor volume, or tumor induction time.

In model 2 (secondary prevention), high-intensity physical activity increased apoptosis of tumor cells. In turn, physical activity in the above model regardless of training intensity did not affect the differences in tumor volume, or the number of induced tumors per rat but affected the time of tumor induction. It should be noted that the risk of cell proliferation was higher in the moderate and high intensity exercise groups.

## **Conclusions**

In both models, a protective effect of regular physical training on the risk of the occurrence and the course of mammary ridge cancer in trained rats was noted compared to the control group. Of note, regular training affected apoptosis, which results in reduced tumorigenesis through apoptosis of tumor cells.

Physical training and its intensity level affected the immune system of rats and this observation refers to model 1. The research suggests the mobilization of the immune system to fight against the mammary ridge cancer through an increase in the number of particular lymphocyte fractions.

**SPIS RYCIN I TABEL:****SPIS RYCIN:**

<b>Ryc.1.</b> Immunoredagowanie nowotworu (Gołąb i wsp., 2017).....	27
<b>Ryc.2.</b> Częstość występowania guzów wielokrotnych.....	47
<b>Ryc.3.</b> Procentowy rozkład czasu indukcji guza.....	48
<b>Ryc.4.</b> Częstość występowania guzów wielokrotnych.....	49
<b>Ryc.5.</b> Procentowy rozkład czasu indukcji guza.....	50
<b>Ryc.6.</b> Średnia liczba guzów nowotworowych na szczura w zależności od intensywności treningu (model 1).....	58
<b>Ryc.7.</b> Średnia liczba guzów nowotworowych na szczura w zależności od intensywności treningu (model 2).....	62
<b>Ryc.8.</b> Mediany rozkładu CD3+CD4+ w zależności od poziomu wysiłku fizycznego. ....	72
<b>Ryc.9.</b> Mediany rozkładu CD3+CD8+ w zależności od poziomu wysiłku fizycznego. ....	72
<b>Ryc.10.</b> Mediany rozkładu CD4+CD8+ w zależności od poziomu wysiłku fizycznego. .	73
<b>Ryc.11.</b> Mediany rozkładu CD3-CD116/c+ w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.....	73
<b>Ryc.12.</b> Mediany rozkładu CD3+CD161+ w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.....	74
<b>Ryc.13.</b> Mediany rozkładu CD3-CD161- w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.	74
<b>Ryc.14.</b> Mediany rozkładu CD3+CD45RA+ - w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.....	75
<b>Ryc.15.</b> Mediany rozkładu CD3-CD45RA+ - w zależności od poziomu wysiłku fizycznego.....	75



**SPIS TABEL:**

<b>Tab.1.</b> Liczebności grup poddanych treningowi fizycznemu w zależności od modelu. ....	37
<b>Tab.2.</b> Porównanie średniej masy oraz dawki MNU podanej szczurom w grupach doświadczalnych. ....	37
<b>Tab.3.</b> Średnia masa oraz dawka MNU podana szczurom w grupach doświadczalnych w zależności od podejmowanego poziomu intensywności treningu fizycznego. ....	38
<b>Tab.4.</b> Protokół treningu o umiarkowanej intensywności. ....	40
<b>Tab.5.</b> Czas indukcji guza a podejmowany trening fizyczny. ....	48
<b>Tab.6.</b> Czas indukcji guza a podejmowany trening fizyczny. ....	50
<b>Tab.7.</b> Porównanie rozkładów liczby guzów w obu modelach: grupa trenująca vs grupa kontrolna. ....	51
<b>Tab.8.</b> Parametry rozkładu zmiennych V, Ki-67 i tunel w grupie trenującej i kontrolnej w modelu 1. ....	52
<b>Tab.9.</b> Parametry rozkładu zmiennych V, Ki-67 i tunel w grupie trenującej i kontrolnej w modelu 2. ....	53
<b>Tab.10.</b> Porównanie rozkładów zmiennych V, Ki-67, tunel w obu modelach w grupie trenującej i kontrolnej. ....	54
<b>Tab.11.</b> Poziom subpopulacji limfocytów (CD): grupa trenująca vs grupa kontrolna. ....	55
<b>Tab.12.</b> Poziom subpopulacji limfocytów (CD) w zależności od poziomu wysiłku fizycznego. ....	56
<b>Tab.13.</b> Poziom subpopulacji limfocytów (CD) w obu modelach. ....	57
<b>Tab.14.</b> Wartości p w teście porównań wielokrotnych (post hoc) w ANOVA Kraskala – Wallisa liczebności wyindukowanych guzów na szczura. ....	59
<b>Tab.15.</b> Rozkład liczby guzów nowotworowych na szczura w poszczególnych grupach w modelu 1. ....	60
<b>Tab.16.</b> Czas indukcji guza w poszczególnych grupach w zależności od intensywności wysiłku w modelu 1. ....	61
<b>Tab.17.</b> Rozkład liczby guzów nowotworowych na szczura w poszczególnych grupach w modelu 2. ....	63

<b>Tab.18.</b> Czas indukcji guza w poszczególnych grupach w zależności od intensywności wysiłku w modelu 2. ....	63
<b>Tab.19.</b> Rozkład liczby guzów nowotworowych na szczura w poszczególnych grupach w modelu 1 i modelu 2. ....	64
<b>Tab.20.</b> Rozkład zmiennych V, Ki-67, tunel w poszczególnych grupach różniących się poziomem wysiłku fizycznego w modelu 1. ....	65
<b>Tab.21.</b> Rozkład zmiennych V, Ki-67, tunel w poszczególnych grupach różniących się poziomem wysiłku fizycznego w modelu 2. ....	66
<b>Tab.22.</b> Testy porównań wielokrotnych (post-hoc). Wartości p dla ki-67 podane są powyżej przekątnej, dla tunelu – poniżej przekątnej. Kolorem czerwonym zaznaczono wartości $p<0,05$ . ....	67
<b>Tab.23.</b> Porównanie rozkładów zmiennej V w obu modelach każdej z grup o różnej intensywności treningu. ....	67
<b>Tab.24.</b> Porównanie rozkładów zmiennej Ki-67 w obu modelach każdej z grup o różnej intensywności treningu. ....	68
<b>Tab.25.</b> Porównanie rozkładów zmiennej tunel w obu modelach każdej z grup o różnej intensywności treningu. ....	68
<b>Tab.26.</b> Poziom subpopulacji limfocytów (CD) w poszczególnych grupach różniących się poziomem wysiłku fizycznego. ....	69
<b>Tab.27.</b> Testy porównań wielokrotnych post hoc w ANOVA Kruskala-Wallisa. Kolorem czerwonym zaznaczono wartości $p<0,05$ . ....	70
<b>Tab.28.</b> Poziom subpopulacji limfocytów (CD) w poszczególnych grupach. ....	71
<b>Tab.29.</b> Współczynniki korelacji r-Pearsona. Wyłuszczone kolorem czerwonym korelacje najsilniejsze (choć statystycznie nieistotne).....	76

## ZAŁĄCZNIK

## UCHWAŁA NR 37/2010

z dnia 21 lipca 2010 r.

I Lokalnej komisji etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach we Wrocławiu

## § 1

Na podstawie art. 30 ust. 1 pkt 1 ustawy z dnia 21 stycznia 2005r. o doświadczeniach na zwierzętach (Dz. U. Nr 33, poz. 289) i § 14 ust. 3 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153, poz. 1275), po rozpatrzeniu wniosku, pt.: „**Wpływ treningu fizycznego na proces karcinogenezy oraz rozwój raka piersi u szczurów**” z dnia 14.07.2010, złożonego przez prof. Marka Woźniewskiego z AWF we Wrocławiu, lokalna komisja etyczna:

## WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

## § 2

**W wyniku rozpatrzenia wniosku, o którym mowa w § 1, lokalna komisja etyczna ustaliła, że:**

1. Wniosek należy zaliczyć do kategorii:

## Badania naukowe na zwierzętach

2. Najwyższy stopień inwazyjności proponowanych procedur nie przekracza wartości 4
3. Doświadczenia będą przeprowadzone na zwierzętach (gatunek, liczba zwierząt): szczur, 120
4. Doświadczenia będą przeprowadzone przez (nazwisko i imię, nazwa jednostki doświadczalnej): prof. Piotra Dzięgieła, dr hab. Marzenę Podhorską-Okolów, prof. Andrzeja Szubę, AM we Wrocławiu; dr Iwonę Malicką, dr Katarzynę Pawłowską, AWF we Wrocławiu; lek. wet. Marka Cegielskiego
5. Doświadczenia będą przeprowadzane na tkankach i narządach uzyskiwanych od zwierząt w ramach:

## § 3

Integralną część niniejszej uchwały stanowi uzasadnienie i kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

[ Pieczęć lokalnej komisji etycznej ]








**I LOKALNA KOMISJA ETYCZNA  
DS. DOŚWIADCZEŃ NA ZWIERZĘTACH  
WE WROCŁAWIU**

Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN  
53-114 Wrocław, ul. Rudolfa Weigla 12  
tel.: (71) 373-22-74, (71) 373-23-16, fax: (71) 373-25-87

Otrzymują:

1. Wnioskodawca,
2. Kierownik jednostki doświadczalnej,
3. a/a

Podpisy członków lokalnej komisji etycznej  
biorących udział w głosowaniu:

1.  .....doc. dr hab. Joanna Wietrzyk, Przewodnicząca LKE
2. ....dr hab. Ireneusz Calkosiński
3.  .....mgr Elżbieta Habinia
4.  .....dr Anna Nasulewicz-Goldeman
5.  .....prof. dr hab. Bożena Obmińska-Mrukowicz
6.  .....prof. dr hab. Jerzy Rabczyński
7.  .....prof. dr hab. Leon Strządała
8. ....mgr Tadeusz Ścisłowicz
9.  .....prof. dr hab. Wanda Wojtkiewicz-Rok

**Pouczenie**

Strona niezadowolona z niniejszej uchwały może wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 dni od dnia otrzymania uchwały.  
Odwołanie składa się za pośrednictwem lokalnej komisji etycznej, która wydała uchwałę, zgodnie z § 20 rozporządzenia Ministra Nauki i Informatyzacji z dnia 29 lipca 2005r. w sprawie Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach oraz lokalnych komisji etycznych do spraw doświadczeń na zwierzętach (Dz. U. Nr 153 poz. 1275).

**UZASADNIENIE UCHWAŁY NR 37/2010**

z dnia 21 lipca 2010 r.

I Lokalnej komisji etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach we Wrocławiu

**Wniosek jest poprawny pod względem formalnym i merytorycznym. Na drodze głosowania Komisja zdecydowała o przyjęciu wniosku do realizacji (7 osób głosowało za przyjęciem wniosku, 1 osoba wstrzymała się od głosu). Komisja zwraca uwagę, że osoby prowadzące trening zwierząt oraz usypiające zwierzęta, zaliczają się do osób przeprowadzających doświadczenia i powinny być umieszczone w tabeli nr 1 (załącznik C).**