



تأثیر تمرین شنا و قرارگیری در معرض نیتروز آمین کتون مشتق از تنباکو (NNK) بر پاسخ ایمنوهایستوشیمیایی ماکروفاژهای مرتبط با تومور در موش‌های صحرایی

علی برزگری^{۱*}، شادمهر میردار^۲، محمد رعنائی^۳

^۱گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشکده علوم تربیتی و روان‌شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

^۲گروه فیزیولوژی ورزش، دانشکده تربیت بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران، بابل، ایران.

^۳گروه پاتولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران.

پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۷/۱۸

اصلاح مقاله: ۱۳۹۷/۰۶/۲۵

دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۱۱/۱۵

چکیده

هدف: نیتروز آمین کتون مشتق از تنباکو (NNK)، یکی از قوی‌ترین کارسینوژن‌های تنباکو است که با تغییر در آزادسازی ماکروفاژهای مرتبط با تومور (TAM) در القای سرطان ریه مؤثر است. هدف از این مقاله، تأثیر تمرین شنا و قرارگیری در معرض نیتروز آمین کتون مشتق از تنباکو (NNK) بر پاسخ ایمنوهایستوشیمیایی ماکروفاژهای مرتبط با تومور در موش‌های صحرایی است.

روش‌ها: بدین منظور ۴۶ سر موش صحرایی نر بالغ و بیستار به صورت تصادفی به پنج گروه تمرین، تمرین+NNK، NNK، حلال و کنترل دسته بندی شدند. گروه‌های تحت القای NNK به صورت زیر جلدی ۱ بار در هفته و به میزان ۱۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در ۱۲ هفته NNK دریافت کردند. گروه‌های تمرین نیز به مدت ۱۲ هفته به شنا زیر بیشینه پرداختند. بیان ماکروفاژهای مرتبط با تومور در بافت ریه با روش ایمنوهایستوشیمی اندازه گیری شد. با استفاده از تحلیل واریانس یک-طرفه و آزمون پیگیری توکی در سطح معنی داری $P \leq 0.05$ استفاده شد.

نتایج: نتایج نشان داد که بیان ایمنوهایستوشیمیایی TAM در گروه تمرین نسبت به گروه NNK ($P = 0.001$)، به طور معنی داری کمتر بود (۹۲٪). بیان ایمنوهایستوشیمیایی TAM نیز در گروه تمرین+NNK نسبت به گروه NNK ($P = 0.001$) به طور معنی داری کمتر بود (۹۲٪). علاوه بر این، بیان ایمنوهایستوشیمیایی TAM در گروه NNK، نسبت به گروه حلال ($P = 0.001$) به طور معنی داری بیشتر بود (۷۶٪).

نتیجه گیری: به طور کلی می‌توان ادعا داشت که تمرین ورزشی منظم هوازی زیر بیشینه، در مهار آثار التهابی ریه ناشی از القای NNK با کاهش میزان فعالیت ماکروفاژهای مرتبط با تومور نقش مؤثری دارد.

واژه‌های کلیدی: نیتروز آمین کتون مشتق از تنباکو، تمرین شنا، زیر بیشینه، ماکروفاژهای مرتبط با تومور، ایمنوهایستوشیمی.

مقدمه

التهاب نقش اصلی در شیوع و گسترش تومورهای سرطانی، آنژیوژنز و مقاومت در مقابل درمان دارد، برخی مطالعات، ضرورت تنظیم دستگاه دفاعی سریع و کارآمد در برابر حمله میکروارگانیسمها در سطح موضعی توسط پروتئینهای هماهنگ کننده التهاب و پاسخ فاز حاد را ضروری دانسته اند. بسیاری از پروتئینهای دخیل در این مسیر پیام رسانی، عمدتاً به صورت پیش التهابی یا ضد التهابی در شروع یا ادامه فرآیند پاسخ ایمنی نقش دارند (۱۲).

در این راستا، ماکروفاژهای مرتبط با تومور^۴ (TAM) جزء مهمی از ریز محیط تومور بوده (۱۳) و به عنوان تنظیم کننده ایمنی در ریز محیط تومور در درمان سرطان از اهداف اصلی محسوب می شود. TAMها به دلیل پلازمازیاسیون مجزا در زنجیره های M1 و M2 می تواند اثرات تومورزایی و ضدتوروری ایجاد نماید. ماکروفاژهای M1، سایتوکاینهای پیش التهابی را آزاد نموده و می تواند سبب تقویت پاسخهای 1Th و تخریب بافت توموری شود. از سوی دیگر، فعال سازی ماکروفاژهای M2 موجب پاسخهای 2Th و تقویت بازسازی، آنژیوژنز، سرکوب دستگاه ایمنی و رشد تومور می شود (۱۴). CD68 یکی از نشانگرهای شناسایی TAM می باشد (۱۵). بانات و همکاران (۲۰۱۵)، سان و همکاران (۲۰۱۶)، افزایش سلولهای CD68 را در بافت ریه بیماران مبتلا به سرطان ریه در مقایسه با افراد سالم مشاهده کردند. آنها پیشنهاد نمودند که TAMها با رشد تومور، پیشرفت بیماری و تشخیص ضعیف در سرطانها مرتبط است (۱۶).

از آنجا که سرطان ریه از جمله شایع ترین سرطانهای منجر به مرگ و میر به شمار می رود، با توجه به نقش تشخیصی زودهنگام در درمان این عارضه، پزشکان و محققان نیاز به یافتن راهبردهای بدیع برای روشهای درمانی مؤثر دارند. تحقیقات اخیر نشان می دهد که تغییر مولکولهای اصلی یا مسیرهای پیام رسانی، از طریق تأثیر بر تکثیر، مهاجرت و تهاجم سلولی می تواند بر میزان آسیب اکسایشی و التهاب و در نتیجه وقوع و پیشرفت سرطان ریه مؤثر باشد (۳). در این راستا، عوامل قابل اصلاحی مانند فعالیت بدنی وجود

سرطان ریه یکی از مهم ترین علل مرگ و میر در سراسر دنیا می باشد، به طوری که ۲۵ درصد از تمامی سرطانها با نرخ شیوع سالانه ۱/۲ میلیون نفر را به خود اختصاص داده است (۱). از نظر بالینی، سرطان ریه به دو دسته اصلی شامل سرطان ریه سلول کوچک (حدود ۱۳ درصد) و سرطان ریه سلول غیر کوچک (حدود ۸۷ درصد) تقسیم می شود (۲). سیگار کشیدن مهمترین عامل خطر در ابتلا به سرطان ریه است، به طوری که ۸۵ درصد از دلایل بروز سرطان ریه را به خود اختصاص داده (۳) و همچنین خطر سرطان ریه در افراد سیگاری نسبت به افراد غیر سیگاری ۱۰ برابر بیشتر است (۴). از میان کارسینوژنهای مستقیم، دود استنشاقی سیگار حاوی ترکیباتی است که می تواند پاسخهای التهابی مزمن ریه را تحریک نموده (۵) و این روند با افزایش خطر ابتلا به سرطان ریه مرتبط است (۶). بیش از ۷۰ کارسینوژن در دود سیگار وجود دارد. بیشترین مولکولهای کارسینوژنیک در دود سیگار شامل هیدروکربنهای آروماتیک پلی سیکلیک و نیتروز آمینها می باشد. اگرچه نشان داده شده است که هر دو شکل آن به طور معنی داری با تومورزایی ریه مرتبط است (۷)، نیتروز آمینهای موجود در تنباکو^۲ (NNK) به طور گسترده ای به عنوان قوی ترین عامل سرطان زایی ریه شناخته می شود (۷)، همچنین، NNK به عنوان تنها کارسینوژن تشکیل دهنده تومور در ریه موشها، موشهای صحرائی و خرگوشها از طریق تزریق زیر جلدی، تزریق داخل عروقی و گاوژ شناخته شده است (۸). علاوه بر قدرت سرطان زایی، NNK می تواند برای گیرنده های استیل کولینی نیکوتینی^۲ (nAChRs) لیگاند تشکیل داده و در نوروها و برخی سلولهای غیر عصبی از جمله سلولهای ریه بیان می شود (۹). قرارگیری مزمن در معرض دود سیگار یا نیکوتین موجب فعال سازی گیرنده های استیل کولینی نیکوتینی، سرکوب دستگاه ایمنی و مهار آپوپتوز می شود (۱۰). همانطور که بارتا و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کرده اند که التهاب مزمن ریه ناشی از NNK، تومورزایی ریه در موشها را افزایش داده است (۱۱). از آنجا که

صحرائی بالغ نژاد ویستار با میانگین سنی ۶ تا ۸ هفته و میانگین وزنی $27/93 \pm 105/84$ گرم از انستیتو پاستور خریداری و پس از دو هفته آشنایی با محیط و پروتکل پژوهش، به طور تصادفی به ۵ گروه تمرین (۱۰ سر)، NNK (۱۰ سر)، تمرین + NNK (۱۰ سر)، حلال (۱۰ سر) و کنترل (۶ سر) تقسیم شدند. حیوانات در محیطی با میانگین دمای $22 \pm 1/4$ درجه سانتی گراد، رطوبت ۵۵ درصد و چرخه روشنایی تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت در قفس‌های مخصوص از جنس پلی کربنات نگهداری شدند. نگهداری حیوانات مطابق با راهنمای انستیتوی بین المللی سلامت و پروتکل‌های این مطالعه با رعایت اصول اعلامیه هلسینکی و ضوابط اخلاق پزشکی انجام شد. حیوانات از غذای پلت و آب که به صورت آزاد در اختیار قرار می‌گرفت، تیمار شدند. غذای مصرفی حیوانات با توجه به وزن کشی هفتگی به میزان ۱۰ گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن در اختیار حیوان قرار داشت. پس از خریداری NNK (ساخت شرکت Sigma-Aldrich آلمان) به صورت زیر جلدی ۱ بار در هفته و به میزان ۱۲/۵ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در ۱۲ هفته به صورت زیر جلدی تزریق شد. گروه حلال نیز آب مقطر دریافت کرد (۱۷، ۲۲). این مطالعه توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی بابل (کد: No: MUBABOL.HRI.REC. ۱۳۹۵، ۱۰۹) تایید شده است.

پروتکل پژوهش

موش‌های صحرائی گروه‌های تمرین + NNK قبل از شروع پروتکل اصلی، به مدت یک هفته (۵ روز) هر بار به مدت ۲۰ دقیقه به منظور آشنایی با آب و کاهش استرس شنا و سازگاری با شرایط تمرینی، در داخل استخر آب قرار می‌گرفتند. سپس با تزریق NNK به موش‌های صحرائی در گروه‌های تمرینی یک بار در هفته تا پایان دوره تحقیق در یک مخزن آب به ابعاد $50 \times 50 \times 100$ سانتی متری با درجه حرارت ۳۰-۳۲ درجه سانتی گراد در طی ۱۲ هفته به شنا پرداختند. مدت زمان تمرین در آب در روز اول، اجرای پروتکل ۲۵ دقیقه بود که با افزایش ۵ دقیقه در هفته، این

دارند که به پیشگیری و درمان سرطان ریه از طریق تنظیم و تعدیل فرایند التهابی کمک می‌کنند (۱۷). در این میان، فعالیت بدنی هوازی با ایجاد سازوکار حفاظتی، موجب حفظ هومئوستاز سلولی، کاهش ترشح سایتوکاین‌های التهابی و تعدیل پاسخ‌های ایمنی می‌شود (۱۸). دمارزو و همکاران (۲۰۰۸) به اثر ضد التهابی و ضد تکثیر سلولی تمرین ورزشی شنای طولانی مدت با شدت متوسط در سرطان کولون اشاره کردند (۱۹). اگر چه سازوکارهای احتمالی پیشنهاد شده است، اما نتایج مطالعات در مورد رابطه بین فعالیت بدنی و ابتلا به سرطان متناقض است. در تحقیق تام و همکاران (۲۰۱۲) هیچ تغییری در بیان CD68 بافت چربی زیر پوستی در گروه فعالیت بدنی و محدودیت غذایی پس از گذشت ۶ ماه مشاهده نشد (۲۰). هر چند در مطالعه گروشانگ (۲۰۱۳) نشان داده شد که فعالیت بدنی موجب افزایش سطوح CD68 در بافت عضلانی می‌شود (۲۱). با توجه به اثر NNK در ایجاد التهاب و متعاقب آن ایجاد سرطان و بدخیمی‌های ریه (۷)، از یکسو و نقش‌های متعدد ماکروفاژهای مرتبط با تومور از جمله CD68 در فرآیندهای التهابی و نیز پیشرفت تومور (۱۵) از سوی دیگر، به نظر می‌رسد یک از سازوکارهایی که فعالیت ورزشی می‌تواند موجب تعدیل فرآیند تومورژنز NNK شود، تقویت پاسخ‌های ایمنی از طریق سرکوب عامل‌های التهابی باشد. از آنجا که مطالعه‌ای که به بررسی اثر شنای زیر بیشینه بر بیان CD68 در بافت ریه آزمودنی‌های در معرض NNK یافت نشده است و نیز اطلاعات اندک و متناقضی در خصوص تأثیر فعالیت‌های ورزشی بر بیان ماکروفاژهای مرتبط با تومور وجود دارد، پژوهش حاضر در پی پاسخ به این پرسش است که آیا یک دوره تمرین شنای زیربیشینه می‌تواند آثار مخرب احتمالی قرار گرفتن در معرض NNK را کاهش دهد؟

روش پژوهش

نمونه‌های پژوهش

در این طرح تجربی که در آزمایشگاه گروه فیزیولوژی ورزشی دانشگاه مازندران انجام شد، تعداد ۴۶ سر موش

سپس بافتها را در اتاقک مرطوب در دمای اتاق یا ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و سطح بافتها را با پلیمر لیبل شده با پراکسیداز (آنتی بادی ثانویه) به مدت ۳۰ دقیقه پوشانده شد. در ادامه آن را در بافر T.B.S به مدت ۵ دقیقه (۲ بار) شستشو داده و بافتها را در اتاقک مرطوب در دمای اتاق یا دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و سطح بافت را با محلول کروموژن +DAB سوبسترا ChemMate™ DAKO EnVision™ Detection Kit, Peroxidase/DAB, Rabbit/Mouse ساخت کمپانی داکو، کشور دانمارک) به میزان یک قطره کروموژن در یک میلی لیتر سوبسترا به مدت ۱۰ الی ۳۰ دقیقه پوشانده شد. بعد از رنگ آمیزی لامها با استفاده از میکروسکوپ نوری Olympus (مدل U-MDOB3 ساخت کشور ژاپن)، موقعیت آنتی ژن در بافت بررسی شد.

در تحقیق حاضر جهت ارزیابی سطوح CD68، سلولهای مثبت به عنوان سلولهایی شناخته شدند که رنگ آنها در سیتوپلاسم به صورت ذرات زرد-قهوه‌ای درآمد. همچنین شناسایی و بررسی تغییرات سطوح این عامل توسط متخصص پاتولوژی صورت گرفت. بافر مسدود کننده پراکسیداز، ۰/۰۱ مول بر لیتر (PH=۶) محلول تری سدیم سیترات بازیابی آنتی ژن و ۰/۰۱ مول بر لیتر (PH= ۷/۴) بافر فسفات) از شرکت Maxim Biotech Co خریداری شد. بیان مثبت CD68 به وسیله گرانوله‌های زرد-قهوه‌ای رنگ، در سیتوپلاسم سلولهای تومور مشخص شد و در استروما^۵ بیان پیش هسته‌ای^۶ کمتری مشاهده شد. بیشتر

مدت در هفته هشتم به ۶۰ دقیقه رسید و سپس این زمان تا پایان دوره تمرین به مدت ۱۲ هفته تثبیت شده و ادامه یافت. اضافه بار تمرینی از طریق تنظیم قدرت هنگام شنا انجام شد. قدرت آب بر حسب لیتر در دقیقه از ۴ لیتر در هفته اول به ۱۰ لیتر در هفته یازدهم افزایش یافت که این مقدار برای هفته آخر تثبیت شد (۲۳) (جدول ۱).

روش‌های آزمایشگاهی

جهت حذف اثر حاد تمرین، نمونه برداری از حیوانات ۴۸ ساعت پس از آخرین جلسه تمرینی شنا انجام گرفت. بدین منظور ابتدا حیوانات با استفاده از تزریق صفاقی کتامین (30mg/kg) و زایلازین (3-5 mg/kg) بی هوش و سپس کشته شدند. پس از شکافتن قفسه سینه، لوب تحتانی ریه چپ را جدا نموده و پس از شستشو در سرم فیزیولوژی و بررسی ماکروسکوپی به منظور تثبیت در محلول فرمالین بافر ۱۰ درصد قرار داده شدند تا در مطالعات ایمونوهیستوشیمی مورد بررسی قرار گیرند. به منظور رنگ آمیزی ایمونوهیستوشیمی، برش‌های بافتی در بافر تری سدیم سیترات در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه جهت بازیابی آنتی ژن حرارت یافتند. سپس برای اندازه گیری بیان نشان گر CD68، با آنتی بادی اولیه Monoclonal Mouse Anti Human CD68 (DakoAutostainer_Ready to_Use (CloneKP1, Autostainer Plus) (ساخت شرکت داکو، کشور دانمارک) به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شدند.

جدول ۱. پروتکل ۱۲ هفته‌ای تمرین شنای زیر بیشینه در گروه‌های تمرین (۱۰ سر)، تمرین + NNK (۱۰ سر)

هفته	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
زمان (دقیقه)	۲۵	۳۰	۳۵	۴۰	۴۵	۵۰	۵۵	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰	۶۰
قدرت آب (لیتر در دقیقه)	۴	۴	۵	۵	۶	۶	۷	۷	۸	۹	۱۰	۱۰

نرم افزار SPSS 20 انجام شد.

نتایج

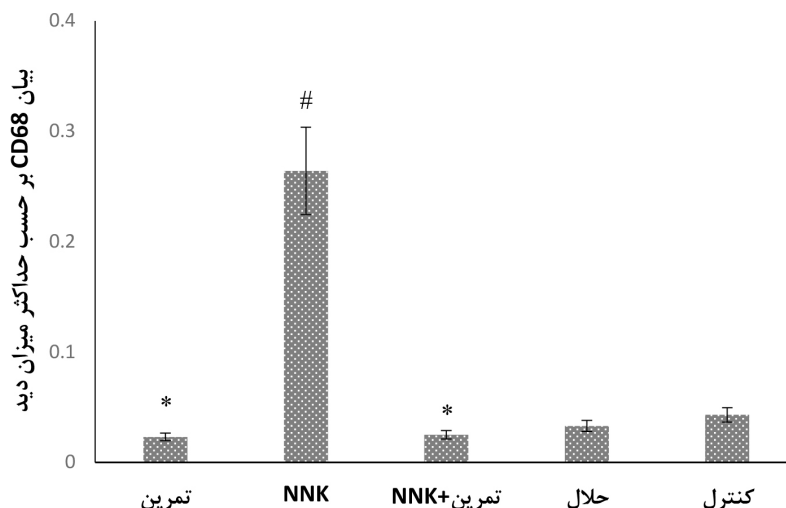
نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که تفاوت معنی داری در وزن موش‌های گروه‌های مختلف تحقیق وجود نداشت ($P < 0/05$). همچنین نتایج آزمون تحلیل واریانس یک طرفه نشان داد که بین مقادیر بیان ایمنوهِیستوشیمیایی CD68 ریه در گروه‌های تحقیق تفاوت آماری معنی داری وجود دارد ($P < 0/001$). نتایج آزمون تعقیبی توکی بیانگر آن بود که بیان ایمنوهِیستوشیمیایی TAM در گروه تمرین نسبت به گروه NNK ($P = 0/001$)، به طور معنی داری کمتر بود (۹۲٪)، در حالی که در گروه تمرین نسبت به گروه‌های کنترل و تمرین+ NNK تفاوت معنی داری وجود نداشت (به ترتیب: $P = 0/08$ و $P = 0/99$).

ضمناً مشاهده شد که بیان ایمنوهِیستوشیمیایی TAM در گروه NNK، نسبت به گروه حلال ($P = 0/001$)، به طور معنی داری بیشتر است (۷۶۶٪). علاوه بر این، نشان داده شد که بیان ایمنوهِیستوشیمیایی TAM نیز در گروه تمرین+ NNK نسبت به گروه NNK ($P = 0/001$)، به طور معنی داری کمتر است (۹۲٪)، در حالی که کاهش بیان ایمنوهِیستوشیمیایی TAM نسبت به گروه حلال معنی دار

از ۱۰ درصد رنگ آمیزی سلولی^۷، به صورت واکنش مثبت تعریف شد و کمتر از ده درصد به عنوان واکنش منفی شناخته شد. بیان کم به صورت ۱۰ تا ۲۵ درصد مثبت مشخص شد. سطح بیان متوسط به صورت ۲۶ تا ۵۰ درصد سلول‌های مثبت مشخص شد و بیان قوی به صورت ۵۰ درصد سلول‌های مثبت شناسایی شد (جدول ۳-۷). بیان مثبت CD68 در سیتوپلاسم و ماکروفاژها به صورت دانه‌های قهوه‌ای-زرد رنگ و قهوه‌ای مشخص شد. بدین گونه که با استفاده دوربین از هر اسلاید میکروسکوپیک تصویربرداری صورت گرفت و در نهایت تصاویر برای بررسی کیفیت واکنش مورد آنالیز قرار گرفت و به صورت داده‌های رتبه‌ای و کمی توصیف شدند.

تحلیل آماری

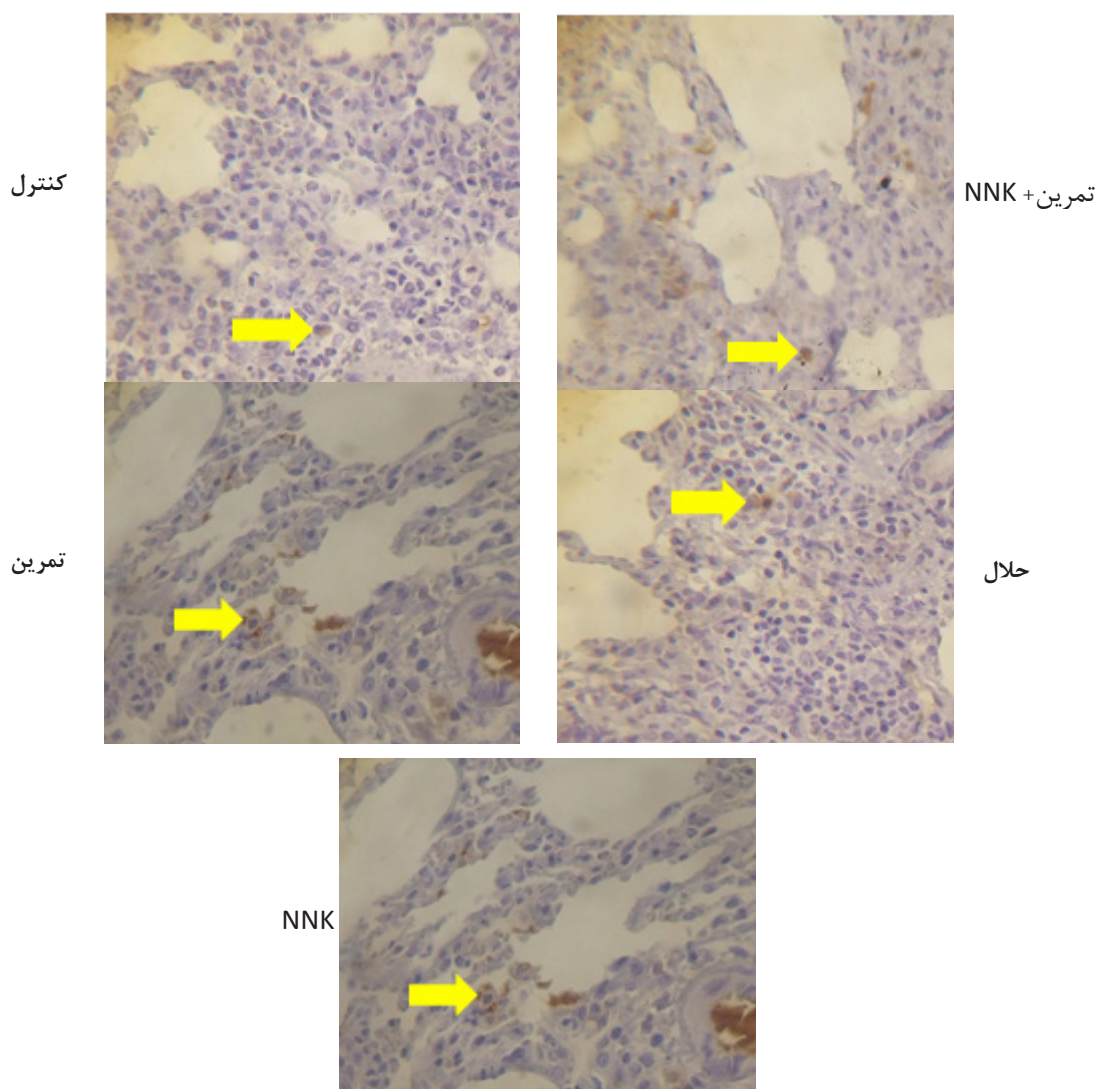
برای تجزیه و تحلیل یافته‌های این پژوهش از آزمون کولموگروف اسمیرنوف برای بررسی وضعیت طبیعی توزیع داده‌ها در گروه‌های مورد مطالعه و از آزمون آماری ANOVA برای مقایسه بین گروهی و در صورت معنی دار بودن، از آزمون تعقیبی توکی برای مقایسه‌های دو به دو استفاده شد. سطح معنی داری برای همه آزمون‌های آماری $P \leq 0/05$ در نظر گرفته شد. تحلیل‌های آماری با استفاده از



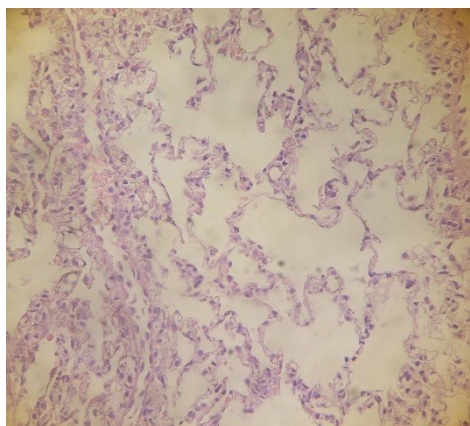
شکل ۱. تغییرات مقادیر CD68 (ماکروفاژهای مرتبط با تومور) بر حسب حداکثر میدان دید در گروه‌های تحقیق گروه تمرین (۱۰ سر)، NNK (۱۰ سر)، تمرین + NNK (۱۰ سر)، حلال (۱۰ سر) و کنترل (۶ سر) (* نشانه تغییرات معنی دار نسبت به NNK، # نشانه تغییرات معنی دار نسبت به گروه حلال).

ریه در گروه‌های کنترل و حلال کاملاً طبیعی است، در حالی که در گروه NNK، در ناحیه‌ای از بافت ریه تجمع سلول‌های آتیپیک به همراه سلول‌های التهابی دیده شد و می‌توان اظهار داشت که کانون کوچکی از منطقه توموری رویت شد. همچنین در گروه تمرین نیز اغلب ساختار پارانشیمی ریه حفظ شد. در گروه تمرین NNK+، التهاب حاد خفیف دیده شده و ساختار پارانشیمی نسبتاً حفظ شده و البته کانون‌هایی از کاهش حجم آلئول و آمفیزم دیده شده است (شکل ۳).

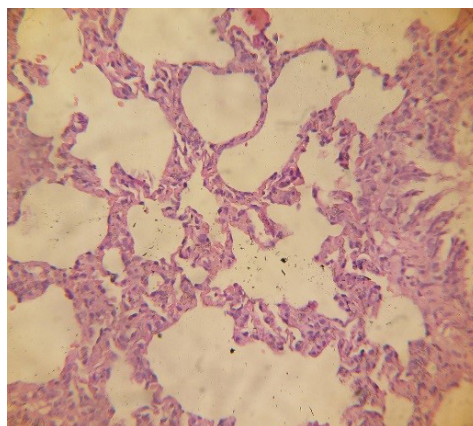
نبوده است (P= ۰/۷۵) (شکل ۱). بر اساس مطالعات ایمنو‌هیستوشیمی، واکنش منفی نشانگر CD68 ملاحظه شد و مقادیر آن به ترتیب در گروه‌های کنترل (۰/۰۴)، حلال (۰/۰۳)، تمرین + NNK (۰/۰۲) و تمرین (۰/۰۲) حداکثر میدان دید گزارش گردید. با این حال، در گروه NNK، واکنش نشان گر CD68 مثبت تعیین شد و مقدار آن (۰/۲۶) حداکثر میدان دید بود (شکل ۲). همچنین مطالعات هیستوپاتولوژیک نشان داد که ساختار بخش پارانشیمی بافت



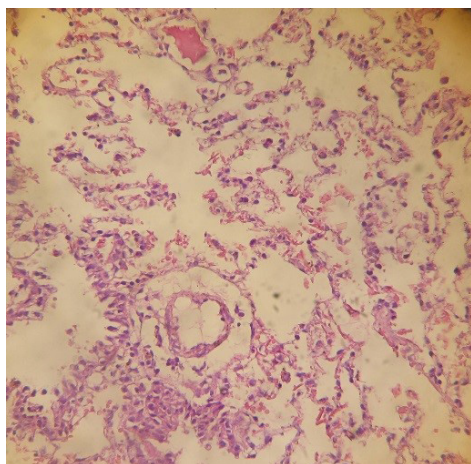
شکل ۲. بیان ایمنو‌هیستوشیمیایی نشان گر CD68 در بخش پارانشیمی بافت ریه گروه‌های مختلف (آزمون ایمنو‌هیستوشیمی با کروموزن DAB، رنگ آمیزی افتراقی هماتوکسیلین با بزرگ نمایی $\times 400$). واکنش‌های سفید رنگ (فلش) در بافت نشانه بیان نشان-گر CD68 می‌باشد.



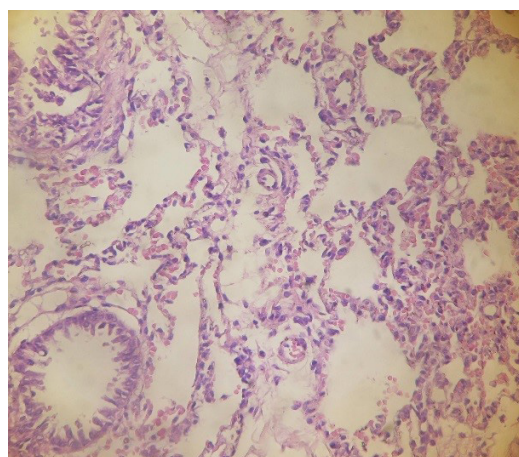
کنترل



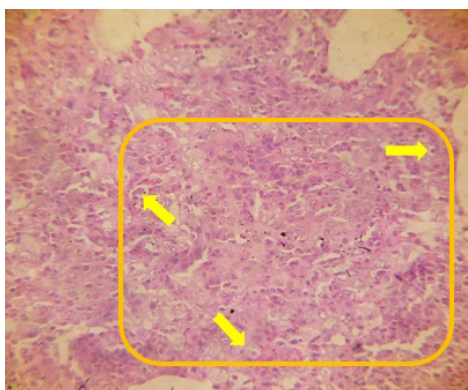
NNK + تمرین



تمرین



حلال



NNK

شکل ۳. ساختار هیستوپاتولوژیک بافت ریه در گروه‌های مختلف تحقیق (فلش‌های سفید نشان دهنده تجمع سلول‌های آتیپیک به همراه سلول‌های التهابی است) به طوری که کانون کوچکی از منطقه توموری مشاهده شد.

بحث و نتیجه گیری

شد. این نتایج با مطالعات گذشته که نشان دادند، افزایش نفوذ TAM در سرطان ریه سلول‌های غیر کوچک با استفاده از ماکروفاژ CD68 بوده، هم راستا بوده است (۳۰-۳۲). پرولوکس و همکاران (۲۰۰۴)، گزارش کردند که فعال‌سازی NNK موجب مهار TNF- α و اینترلوکین ۱۲ شده، در حالی که می‌تواند سبب افزایش بیان اینترلوکین ۱۰ و پروستاگلاندین ۲ شود. این نتایج نشان می‌دهد که NNK می‌تواند موجب فعال‌سازی ماکروفاژهای حبابچه‌ای از زنجیره M1 به M2 شود که در رشد تومور و آنژیوژنز مؤثر است (۳۳). محققان دریافتند که دود سیگار قادر به تنظیم منفی ژن‌های مرتبط با زنجیره M1 مانند 9CXCL و CXCL 11 بوده، در حالی که موجب تنظیم مثبت ژن‌های مرتبط با زنجیره M2 از جمله MMP-2 و MMP-7 می‌شود (۳۴). زنجیره M2 مربوط به TAM در مناطق هیپوکسیک و ایسکمیک تومورها غنی شده، تا جائیکه موجب بیان کارگیری ماکروفاژها می‌شود. بنابراین، نفوذ ماکروفاژهای تومور می‌تواند با نتایج نامطلوب و بقای کوتاه‌مدت در سرطان ریه مرتبط باشد. سایتوکاین‌های کموتاکسیک، تحریکات جهت داری را برای حرکت لکوسیت‌ها در التهاب و هومئوستاز فراهم نموده و تصور می‌شود در به کارگیری مونوسیت‌ها در تومورها نقش مهمی داشته باشند. روی هم رفته، نتایج نشان می‌دهد که TAM بیشتر منجر به رشد تومور و پیشرفت سرطان ریه می‌شود تا اینکه موجب پاسخ ضد توموری شود (۲۵).

در این پژوهش نشان داده شد که مداخله تمرین و NNK منجر به کاهش معنی‌دار بیان CD68 در مقایسه با گروه NNK می‌شود. براساس اطلاعات موجود، هیچ مطالعه‌ای اثر تمرین بر بیان TAM در پاسخ به NNK را مورد بررسی قرار نداده است. با این حال، نتایج قبل از ارزیابی بالینی نشان داد که تمرین ممکن است پلاریزاسیون و عملکرد ناشی از ماکروفاژهای خارج از تومور را تعدیل کند. در یک مدل شیمیایی القاء سرطان پستان، فعالیت بدنی موجب پلاریزاسیون M1 از ماکروفاژهای تحریک شده با

در این مقاله، تحلیل ایمنووهیستوشیمیایی بیان ماکروفاژهای مرتبط با تومور در پاسخ به نیتروز آمین کتون مشتق از تنباکو و تمرین‌های زیر بیشینه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که ۱۲ هفته تمرین‌های زیر بیشینه، موجب کاهش بیان ایمنووهیستوشیمیایی CD68 در بافت ریه موش‌های صحرایی در گروه تمرین می‌شود. با این حال، تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد. هم راستا با نتایج تحقیق حاضر، لی و همکاران (۲۰۱۶)، کاهش قابل ملاحظه بیان ماکروفاژهای M2 (مانند CD68) را پس از ۱۲ هفته فعالیت بدنی در افراد کم تحرک مشاهده کردند (۲۴). به نظر می‌رسد که برخلاف ماکروفاژهای زنجیره M1 که تمایل دارند در ساختارهای تاجی شکل سازماندهی شوند (۲۵)، ماکروفاژهای زنجیره M2 با فیبروز ریه مرتبط است (۲۶). لومنگ و همکاران (۲۰۰۷) نیز کاهش بیان نشان گر CD68 از زنجیره M2 را پس از تمرین گزارش کردند. آنها نشان دادند که کاهش مقادیر ماکروفاژهای بافتی همراه با زنجیره M2 با افزایش حساسیت به انسولین پس از تمرین مرتبط است و نیاز به سازوکار جبرانی کاهش می‌یابد (۲۷). فعالیت بدنی از یک طرف می‌تواند مونوسیت‌های التهابی را کاهش دهد و از طرف دیگر در بافت‌های خاص، پس از تمایز مونوسیت‌ها به ماکروفاژها، ممکن است به فنوتیپ التهابی (M1) کمک کند که برای ایمنی ضد تومور مفید است. از آنجا که عملکرد نوتروفیل‌ها پس از فعالیت بدنی تا حدودی شناخته شده است، با این حال به نظر نمی‌رسد که فعالیت بدنی به طور قابل ملاحظه‌ای تعداد نوتروفیل‌ها را تغییر دهد (۲۸). فعالیت بدنی به سرعت موجب تولید نوتروفیل شده که به دنبال آن افزایش تأخیری در تعداد نوتروفیل خون طی ۲-۱ ساعت پس از فعالیت بدنی اتفاق می‌افتد که با مدت و شدت فعالیت بدنی تعدیل می‌شود (۲۹).

علاوه بر این، در تحقیق حاضر افزایش معنی‌دار سلول‌های مثبت CD68 در گروه NNK نسبت به گروه حلال مشاهده

ضمن اینکه تمرینات شنای زیر بیشینه منظم توانسته است تا حدودی از طریق مهار بیان CD68 در کاهش پیامدهای ناشی از القای NNK بر بافت ریه، در بهبود التهاب ریه کمک شایانی کند.

تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر در قالب رساله دکتری انجام شد. بدین وسیله از کارکنان دانشگاه علوم پزشکی بابل و دانشگاه مازندران که در اجرای پژوهش حاضر کمک نموده اند قدردانی می‌شود. منابع مالی در این پژوهش توسط نویسندگان تهیه شد.

پی‌نوشت‌ها

¹Carcinogen

²Nicotine-derived Nitrosamine Ketone

³Nicotinic acetylcholine receptors

⁴Tumor-associated macrophages

⁵Stroma

⁶Perinuclear

⁷Cellular Staining

منابع

1. Granville CA, Dennis PA. An overview of lung cancer genomics and proteomics. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005; 32: 169-176.
2. Arunangshu D, James D. Bortner Jr, Cesar Aliaga, Timothy Cooper, Anne Stanley, Bruce A, Stanley, Chandra P. Belani, Karam El-Bayoumy. Proteomic profiling of hyperplasia/atypia and adenoma-induced by NNK in mouse lung identified multiple proteins as potential biomarkers for early detection. *EuPA Open Proteomics*. 2015; 9: 23-33.
3. Koutsokera A, Kiagia M, Saif MW, Souliotis

LPS (از طریق افزایش سطح سایتوکاین $IFN-\gamma$ $TNF-\alpha$ و اینترلوکین ۱۲) در مقایسه با موش‌های کم تحرک که دارای یک فنوتیپ M2 بیشتر است (سطح بالایی از $10IL-1$ و $TGF-\beta$) می‌شود (۲۸). در این راستا، آلمیدا و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که فعالیت بدنی ممکن است نفوذ TAM به داخل تومور را محدود کند. ۶ هفته تمرین شنا در موش‌های سوئیسی نر که به مدت ۴ هفته تزریق سلول‌های توموری داشتند، منجر به کاهش حجم تومور و کاهش نفوذ ماکروفاژ شد (۳۶). علاوه بر این، مک لین و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهشی بر مدل تومورزایی روده موش‌های $ApcMn+/+$ دریافتند که ۱۲ هفته تمرین دویدن روی نوار گردان موجب کاهش تعداد پولیپ‌های بزرگ و حضور ماکروفاژها می‌شود. ضمن اینکه میزان بیان زنجیره M1 (مانند اینترلوکین ۱۲) و زنجیره M2 (مانند CD206) در بافت روده کاهش می‌یابد (۳۷). فعالیت بدنی، TAM را ترجیحاً به سوی فنوتیپ M1 که همراه با اثرات ضد توموری است، پولاریزه می‌کند، در حالی که عدم فعالیت بدنی می‌تواند منجر به پولاریزه شدن TAM به سوی فنوتیپ M2 شده و سبب رشد تومور، تهاجم بافتی و در نهایت متاستاز شود. افراد تمرین کرده توانایی بهتری در پاسخ به التهاب زنجیره M2 در طول فعالیت داشته و این توانایی در جهت تنظیم منفی می‌تواند به عنوان یک عامل حمایتی به حساب آید (۳۷). اگرچه در این تحقیق بسیاری از متغیرها از قبیل گونه، نژاد، جنس، وزن، عوامل محیطی (صدا، نور، رطوبت، دما)، عوامل تمرینی (نوع، مدت و شدت فعالیت ورزشی) و برنامه غذایی تحت کنترل بودند. با وجود این، پژوهش حاضر با محدودیت‌هایی از جمله عدم کنترل فعالیت شبانه آزمودنی‌های پژوهش به ویژه گروه‌های بدون تمرین و تداخل احتمالی آن بر نتایج تحقیق و نیز عدم اندازه گیری میزان جذب NNK در آزمودنی‌ها مواجه بوده است.

به طور کلی، نتایج تحقیق حاضر بیانگر آن است که قرارگیری در معرض دخانیات و عناصر التهاب زای آن مانند NNK می‌تواند سبب افزایش التهاب بافت ریه شود.

- K, Syrigos KN. Nutrition Habits, Physical Activity, and Lung Cancer: An Authoritative Review. *Clinical Lung Cancer*. 2013; 14(4): 342-50.
4. Indovina P, Marcelli E, Pentimalli F, Tanganelli P, Tarro G, et al. Mass spectrometry-based proteomics: The road to lung cancer biomarker discovery. *Mass Spectrom Rev*. 2013; 32: 129-142.
 5. Peterson LA, Thomson NM, Crankshaw DL, Donaldson EE and Kenney PJ: Interactions between methylating and pyridyloxobutylating agents in A/J mouse lungs: implications for 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced lung tumorigenesis. *Cancer Res*. 2001; 61: 5757-63.
 6. Vernooij JHJ, Dentener MA, vanSuylen RJ, Buurman WA and Wouters EFM: Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology. *Am J Res Cell Mol Biol*. 2002; 26: 152-59.
 7. Hecht SS, Stepanov I, Carmella SG. Exposure and Metabolic Activation Biomarkers of Carcinogenic Tobacco-Specific Nitrosamines. *Acc Chem Res*. 2016; 49(1): 106–114.
 8. Akopyan G, Bonavida B. Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis (Review). *Int J Oncol*. 2006; 29(4):745-52.
 9. Conti-Fine BM, Navaneetham D, Lei S, Maus AD. Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? *Eur J Pharmacol*. 2000; 393: 279-94.
 10. Razani-Boroujerdi S, and Sopori ML. Early Manifestations of NNK-Induced Lung Cancer Role of Lung Immunity in Tumor Susceptibility. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2007; 36: 13-19.
 11. Barta P, Van Pelt C, Men T, Dickey B, Lotan R, Moghaddam SJ. Enhancement of lung tumorigenesis in a Gprc5a knockout mouse by chronic extrinsic airway inflammation, *Mol. Cancer*. 2012; 11:4
 12. Swisher JF, Khatri U, Feldman GM. Annexin A2 is a soluble mediator of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007; 82:1174-84.
 13. Noy R, Pollard JW. Tumor-Associated Macrophages: From Mechanisms to Therapy. *Immunity*. 2014; 41:49–61.
 14. Guo C, Buranych A, Sarkar D, Fisher PB, Wang XY. The role of tumor-associated macrophages in tumor vascularization. *Vasc Cell*. 2013; 5:20.
 15. Mei J, Xiao Z, Guo C, Pu Q, Ma L, Liu C, Lin F, Liao H, You Z, Liu L. Prognostic impact of tumor-associated macrophage infiltration in non-small cell lung cancer: A systemic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2016; 7(23): 34217-28.
 16. Sun S, Pan X, Zhao L, Zhou J, Wang H, and Sun Y. The Expression and Relationship of CD68-Tumor-Associated Macrophages and Microvascular Density with the Prognosis of Patients with Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Clin Exp Otorhinolaryngol*. 2016; 9(3): 270–277.
 17. Belinsky SA, Foley JF, White CM, Anderson MW, Maronpot RR. Dose-response

- relationship between O6-methylguanine formation in Clara cells and induction of pulmonary neoplasia in the rat by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Research*. 1990; 50(12), 3772-80.
18. Mirdar Harijani Sh, Aliasgharzade OH, Musavi N, Hamidian Gh. Effects of swimming endurance training during pregnancy on apoptotic index of rat's neonate liver. *Scientific Journals Management System*. 2014; 8(4): 31-38.
19. Demarzo MM, Martins LV, Fernandes CR, Herrero FA, Perez SE, Turatti A, et al. Exercise reduces inflammation and cell proliferation in rat colon carcinogenesis. *Med Sci Sports Exerc*. 2008; 40(4): 618-21.
20. Tam CS, Covington JD, Ravussin E, Redman LM; Pennington CALERIE Team. Little evidence of systemic and adipose tissue inflammation in overweight individuals. *Front Genet*. 2012; 19; 3:58
21. Jason GS. The Role of Macrophages in Exercise and Insulin Resistance in Human Skeletal Muscle. *Theses and Dissertations-Physiology*. 2013; 1-154.
22. Hansen HH. Lung Cancer (Advances in Basic and Clinical Research). Springer Science+Business Media, Llc 1995; 25-26.
23. Mirdar Sh, Arab A, Hedayati M, Hajizade A. The effect of pregnant rat swimming on hypoxia-inducible factor-1 α levels of neonatal lung. *Tehran University of Medical Sciences*. 2012; 69(12): 754-760.
24. Lee S, Norheim F, Langleite TM, Noreng HJ, Stora's TH, Afman LA, Frost G, Bell JD Thomas EL, Kolnes KrJ, Tangen DS, Stadheim HK, Gilfillan GD, Gulseth HL, Birkeland KI, Jensen J, Drevon CA, & Holen T. Effect of energy restriction and physical exercise intervention on phenotypic flexibility as examined by transcriptomics analyses of mRNA from adipose tissue and whole body magnetic resonance imaging. *Physiol Rep*, 2016; 4 (21). pii: e13019.
25. Eguchi, A, & Feldstein AE. Adipocyte cell death, fatty liver disease and associated metabolic disorders. *Dig Dis*. 2014; 32: 579-85.
26. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, Peterson CA, Kern PA. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 299(6):E1016-27.
27. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007; 117(1):175-84.
28. Walsh NP, Gleeson M, Shephard RJ, et al. Position statement. Part one: immune function and exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2011; 17:6-63.
29. Peake JM. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exerc Immunol Rev*. 2002; 8:49-100.
30. Zeni E, Mazzetti L, Miotto D, et al. Macrophage expression of interleukin-10 is a prognostic

- factor in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J*. 2007; 30(4): 627-32.
31. Wang R, Zhang J, Chen S, et al. Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression. *Lung Cancer*. 2011; 74(2):188-96.
32. Ohtaki Y, Ishii G, Nagai K, et al. Stromal macrophage expressing CD204 is associated with tumor aggressiveness in lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*. 2010; 5(10): 1507-15.
33. Proulx LI, Castonguay A, Bissonnette EY. Cytokine production by alveolar macrophages is down regulated by the alpha-methylhydroxylation pathway of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Carcinogenesis*. 2004; 25(6):997-1003.
34. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, et al. Smoking-dependent reprogramming of alveolar macrophage polarization: implication for pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *J Immunol*. 2009; 183(4):2867-83.
35. Zhang BC, Gao J, Wang J, et al. Tumor-associated macrophages infiltration is associated with peritumoral lymphangiogenesis and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Med Oncol*. 2011; 28:1447-1452.
36. Almeida PW, Gomes-Filho A, Ferreira AJ, et al. Swim training suppresses tumor growth in mice. *J Appl Physiol (1985)*. 2009; 107(1):261-5
37. McClellan JL, Steiner JL, Day SD, et al. Exercise effects on polyp burden and immune markers in the ApcMin/+ mouse model of intestinal tumorigenesis. *Int J Oncol*. 2014; 45:861-868.



The effect of swimming training and exposure to nicotine derived nitrosamine ketone (NNK) on the immunohistochemical response of tumor-associated macrophages in wistar rats

Ali Barzegari^{1*}, Shadmehr Mirdar², Mohammad Ranaei³

¹Department of physical education, Faculty of Educational Sciences and Psychology, Payame Noor University, Tehran, Iran.

²Department of Exercise Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, University of Mazandaran, Mazandaran, Iran.

³Department of Pathology, Faculty of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

Received: 05/02/2018

Revised: 16/09/2018

Accepted: 10/10/2018

Abstract

Purpose: The nicotine derived nitrosamine ketone (NNK) is one of the strongest carcinogens in tobacco that involved in induction of lung cancer by changing the stimulation of tumor associated macrophages. The aim of this study was to effect of swimming training and exposure to nicotine derived nitrosamine ketone (NNK) on the immunohistochemical response of tumor-associated macrophages in wistar rats.

Methods: For this purpose, 46 Wistar rats were randomly divided into five groups consist of training, training + NNK, NNK, saline and control. NNK-induced groups received NNK subcutaneously one day per week at a rate of 12/5 mg per kg body weight and the training groups performed submaximal swimming training for 12 weeks. Levels of CD68-Tumor associated macrophages in homogenized lung tissue were measured by immunohistochemistry. To analyze the data; ANOVA and tukey's test were used at a significance level of $p \leq 0.05$.

Results: The results showed that immunohistochemical expression of TAM in the training group was significantly lower than the NNK group ($P = 0.001$) (92%). Immunohistochemical expression of TAM was also significantly lower in the NNK + training group than in the NNK group ($P = 0.001$) (92%). In addition, the immunohistochemical expression of TAM in the NNK group was significantly higher than the solvent group ($P = 0.001$) (766%).

Conclusion: Generally, it could be confirmed that regular submaximal swimming training plays an important role in inhibition of the effects of lung inflammation induced by NNK via decreased of Tumor associated macrophages activity.

Keywords: Nicotine derived nitrosamine ketone, Submaximal swimming training, Tumor associated macrophages, Immunohistochemistry.