

## مطالعه تأثیر دوازده هفته تمرین شنای زیربیشینه بر رنگ‌پذیری Ras و Raf-1 سلول‌های اپیتلیال ریهٔ موش‌های صحرائی در معرض کارسینوژن NNK

شادمهر میردار هریجانی<sup>۱</sup>، نرگس موسوی<sup>۲\*</sup>

۱. استادی، فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران

۲. دانشجوی دکتری، فیزیولوژی ورزشی، دانشکده تربیت‌بدنی و علوم ورزشی، دانشگاه مازندران

شماره صفحات: ۱۱۳ تا ۱۲۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۸/۲۲

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۳/۱

### چکیده

هدف این مطالعه، بررسی تغییرات رنگ‌پذیری Ras و Raf-1 در سلول‌های اپیتلیال ریهٔ موش‌های صحرائی در معرض کارسینوژن NNK پس از تمرین شنا بود. به این منظور، ۵۰ سر موش صحرائی به صورت تصادفی به پنج گروه کنترل، تمرین، تمرین-NNK، NNK و حلال تقسیم شدند. NNK به میزان ۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، به صورت زیرجلدی، یک‌روز در هفته، به مدت دوازده هفته تزیق شد. تمرین نیز شامل دوازده هفته شنا با شدت زیربیشینه بود. درصد واکنش Ras و Raf-1 سلول‌های اپیتلیال ریه به روش ایمونوهیستوشیمی اندازه‌گیری شد. در پاسخ ایمونوهیستوشیمی Ras و Raf-1 سلول‌های اپیتلیال ریهٔ گروه تمرین در مقایسه با گروه کنترل تغییر معنی‌داری مشاهده نشد (به ترتیب  $p=0/889$ ،  $p=0/999$ ). افزایش قابل توجهی در پاسخ ایمونوهیستوشیمی Ras و Raf-1 گروه NNK در مقایسه با گروه کنترل یافت شد ( $p=0/001$ ). علاوه بر این، در گروه تمرین-NNK در مقایسه با گروه NNK کاهش قابل توجهی در پاسخ ایمونوهیستوشیمی Ras و Raf-1 مشاهده شد ( $p=0/001$ ). به‌طور کلی، می‌توان تأیید کرد که تمرین شنا از طریق کاهش پاسخ گیرنده‌های استیل کولینی نیکوتینی و گیرنده‌های بتا‌آدرنرژیک به کاهش رنگ‌پذیری Ras و Raf-1 سلول‌های اپیتلیال ریهٔ موش‌های صحرائی منجر شد. کلیدواژه‌ها: سرطان، ریه، دود سیگار، nAChRs،  $\beta$ -ARs.

### The effect of 12 weeks of submaximal swimming training on immunoreactivity of Ras and Raf-1 in lung epithelial cells of Wistar rats exposed to carcinogen NNK

Mirdar Harijani, Sh<sup>1</sup>., Musavi, N<sup>2</sup>.

1. Full Professor, Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Mazandaran University, Iran
2. PhD Student, Sport Physiology, Faculty of Physical Education and Sport Sciences, Mazandaran University, Iran

#### Abstract

The aim of this study was to investigate changes in immunoreactivity of Ras and Raf-1 in lung epithelial cells of rats exposed to carcinogen NNK after swimming training. 50 Wistar rats were randomly divided into five groups: control, training, training + NNK, NNK and sham. NNK-induced groups received NNK Subcutaneously once a week at a dose of 12/5 mg per kg body weight for 12 weeks. The exercise training consisted of submaximal swimming training for 12 weeks. The percentage of reaction of Ras and Raf-1 in lung epithelial cells were measured by HIC. It was observed no significant change in the Ras and Raf-1 immunoreactivity of lung epithelial cells in training group compared to control. A significant increment of the Ras and Raf-1 immunoreactivity was found in NNK group compared to control group ( $p=0.001$ ). Furthermore, a significant reduction of the Ras and Raf-1 immunoreactivity was observed in exercise + NNK group when compared to NNK group ( $p=0.001$ ). Generally it could be confirmed that regular submaximal aerobic training plays an important role in inhibition of the effects of lung carcinoma induced by NNK via reduction of Ras and Raf-1 activity.

**keywords:** Lung, Cancer, Cigarette Smoke, nAChRs,  $\beta$ -ARs.

\*. narciss.mousavi61@gmail.com

## مقدمه

بر طبق پژوهش‌ها، در سراسر جهان، سرطان ریه یکی از کشنده‌ترین سرطان‌ها است و ارتباط نزدیکی با مصرف سیگار دارد (۱-۴). نیکوتین جزء اصلی انواع محصولات توتون، تنباکو و سیگار است که اعتیادآور است و فرآورده‌های متابولیکی آن بیشتر از هفتاد نوع کارسینوژن دارد. مهم‌ترین این فرآورده‌ها عبارت‌اند از نیتروزآمین‌های مشتق از تنباکو، هیدروکربن‌های آروماتیک چندحلقه‌ای<sup>۱</sup> و آمین‌های آروماتیک. این مواد باعث ابتلا به سرطان یا افزایش خطر ابتلا به آن در حیوان و انسان می‌شوند (۵). از بین ترکیبات خانواده نیتروزآمین‌های مشتق از تنباکو، نیتروزآمین کتون مشتق از نیکوتین یا ۴-متیل نیتروزآمینو-۱-(۳-پیریدیل)-۱-بوتانول<sup>۲</sup> (NNK) فراوان‌ترین و قوی‌ترین ترکیب کارسینوژن به‌شمار می‌رود. NNK می‌تواند هم به صورت مستقیم و هم غیرمستقیم آثار کارسینوژنی خود را در بدن اعمال کند (۵). NNK با اتصال به گیرنده‌های سطح غشا، چندین مسیر سیگنالی را که به سرطان منجر می‌شوند تحریک می‌کند. اتصال NNK به گیرنده‌های بتا آدرنرژیک<sup>۳</sup> ( $\beta$ -AR) روی سلول‌های اپی‌تلیال ریوی، آدنوزین مونوفسفات حلقوی<sup>۴</sup> (cAMP) را فعال می‌کند. سیگنال cAMP ناشی از  $\beta$ -AR ممکن است مسیرگیرنده فاکتور رشد اپیدرمال<sup>۵</sup> (EGFR) را فعال می‌کند که شامل افزایش بیان پروتئین کیناز سرین-ترئونین فیبروسارکوم تسریع‌شده<sup>۶</sup> (Raf-1)، کینازهای تنظیم‌شده به وسیله سیگنال خارج سلولی<sup>۷</sup> (ERK1/2) مرتبط با پروتئین کیناز فعال‌شده به وسیله میتوژن و فسفریلاسیون ERK1/2 است. سیگنال cAMP و مسیر EGFR/ Raf-1/ ERK1/2 می‌توانند میزان رشد و توسعه آدنوکارسینوما ریوی ناشی از NNK را تنظیم کنند (۶). راه‌اندازی رویدادهای وابسته به NNK، در ادامه، سبب مهاجرت سلولی، تهاجم و تکثیر سلولی کنترل‌نشده می‌شود (۷). فعالیت بیش‌ازحد مسیر Ras/Raf/ERK ناشی از افزایش تحریک یا جهش‌های عملکردی، باعث رشد و بقای بسیاری از سرطان‌های انسانی می‌شود (۸). بنابراین، هدف‌مندسازی عوامل مؤثر پایین دست این مسیر، راهبردی ضدسرطان به حساب می‌آید. یکی از این راهبردها می‌تواند فعالیت بدنی باشد. وایدگرن و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که فعالیت یک پا با شدت ۴۰ درصد و سپس با شدت ۷۰ درصد اکسیژن مصرفی بیشینه، به مدت ۳۰ دقیقه، به ترتیب به افزایش ۱۱ و ۳۹ برابری فسفریلاسیون ERK در بافت عضله ساق پا منجر شد (۹). در پژوهش ژی و همکاران (۲۰۰۷) نیز سطوح پروتئین Ras در بافت پوست موش‌های صحرائی در واکنش به یک جلسه فعالیت ۶۰ دقیقه‌ای با شدت بالا روی چرخ کارسینج افزایش یافت (۱۰). به این ترتیب، فعالیت ورزشی و NNK مسیرهای مشابهی را در بدن راه‌اندازی می‌کنند. در نگاه اول، به نظر می‌رسد فعالیت ورزشی در فرد سیگاری در جهت تشدید اثر سمی NNK پیش می‌رود؛ زیرا ورزش مسیر تکثیر سلولی را، که در اثر تحریک NNK نیز در بدن راه‌اندازی می‌شود، تحریک

1. Polycyclic Aromatic

Hydrocarbons

2. 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-

Pyridyl)-1-Butanone

3. B-Adrenergic Receptor

4. Cyclic Adenosine Monophosphate

5. Epidermal Growth Factor Receptor

6. Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

1

7. Extracellular Signal Regulated

Kinases

می‌کند. اما در عمل، گزارش‌های همه‌گیرشناسی نشان می‌دهند که آمادگی بدنی با کاهش وقوع انواع بیماری‌ها، از جمله انواع سرطان‌ها ارتباط دارد (۱۱). مسیر تکثیر سلولی که توسط هر دو متغیر فعال می‌شود، بسته به شرایط فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی بدن می‌تواند مفید یا مضر باشد. تکثیر سلولی یک فرایند طبیعی در هنگام رشد اندام‌های بدن است (۱۲). اما در بافتی که دچار آسیب کارسینوزنی شده است به معنی گسترش آسیب در آن بافت و سرایت به بافت‌های دیگر است. با اینکه برخی پژوهش‌ها تأثیر فعالیت ورزشی را بر بهبود انواع سرطان‌ها، از جمله سرطان ریه، را تأیید کرده‌اند، سازوکارهای تکثیر سلولی مرتبط با این تأثیر، به‌ویژه تغییر پاسخ شاخص‌های تکثیر سلولی از قبیل **Raf-1** و **Ras**، در کانون توجه قرار نگرفته‌اند. همچنین، تاکنون پژوهشی که تأثیر تمرین ورزشی شنای زیربیشینه را بر تغییرات مسیرهای سیگنالی درگیر در القای سرطان به‌وسیله **NNK** بررسی کرده باشد یافت نشده است. یکی از مهم‌ترین چالش‌های بیماران مبتلا به سرطان، مشکلات روحی و روانی به‌ویژه افسردگی و عدم تمایل به فعالیت ورزشی است (۱۳). تمرین شنا به‌عنوان یک فعالیت ورزشی مفرح و آرامش‌بخش در مقایسه با دویدن (حداقل در این گروه خاص از افراد) ممکن است با کاهش مشکلات روانی و ایجاد انگیزه برای ورزش کردن نقش مؤثرتری در روند درمان ایفا کند. بنابراین، پژوهش حاضر قصد دارد به بررسی این موضوع بپردازد که دوازده هفته تمرین شنای استقامتی چه تأثیری بر فعالیت **Raf-1** و **Ras** سلول‌های اپی‌تلیال ریهٔ موش‌های صحرایی در معرض کارسینوزن **NNK** دارد.

### روش‌شناسی

**آزمودنی‌ها:** تعداد ۵۰ موش نر صحرایی نژاد ویستار با میانگین سنی ۵۰ روز و میانگین وزنی ۲۱۰ گرم، به‌صورت جداگانه، در قفس‌های فلزی (هر چهار موش در یک قفس)، در محیط آزمایشگاهی با دمای  $22 \pm 1/4$  درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت نسبی  $55 \pm 5\%$  و چرخهٔ روشنایی-تاریکی ۱۲ ساعته (روشنایی ۶ صبح و خاموشی ۶ عصر) قرار گرفتند. غذای استاندارد پلت و آب نیز تا پایان پروتکل به‌صورت آزاد در اختیار موش‌ها قرار گرفت. برای اطمینان از مناسب بودن محیط و حفظ رطوبت، دما و تهویه (برای تعدیل سطح آلودگی موجود در محل و کاهش بوی بد محیط ناشی از تجمع آمونیاک حاصل از ادرار حیوانات و کاهش احتمال بیماری‌های تنفسی در حیوانات) از دستگاه تهویهٔ هوا، دماسنج و رطوبت‌سنج برای پایش تغییرات شبانه‌روزی دما و رطوبت استفاده شد. هفتهٔ اول، حضور موش‌ها در آزمایشگاه جهت سازگاری با محیط آزمایشگاه بود. سپس، موش‌ها به‌صورت تصادفی به پنج گروه ده‌تایی شامل گروه کنترل، گروه تمرین، گروه **NNK**، گروه تمرین-**NNK**، و گروه حلال تقسیم شدند. گروه تمرین، شنای زیربیشینه را به‌مدت دوازده هفته انجام دادند. در گروه **NNK** تزریق **NNK** به‌صورت زیرجلدی یک‌بار در هفته و به میزان ۱۲/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن طی دوازده هفته انجام شد. گروه تمرین-**NNK** شامل ترکیب هم‌زمان تمرین و تزریق **NNK** بود. گروه کنترل نیز آب مقطر دریافت کردند. به‌منظور تفکیک اثر احتمالی استرس اکسایشی ناشی از تزریق **NNK** بر داده‌های

نهایی پژوهش، از گروهی با عنوان گروه حلال استفاده شد که به آنها به جای NNK، حلال آن (اتانول مطلق و آب مقطر) تزریق شد (۱۴).

**پروتکل تمرینی:** پروتکل تمرینی مطابق پروتکل میردار و همکاران (۱۳۹۱) طراحی شد. طبق این پروتکل، به منظور آشنایی با آب، کاهش استرس شنا و سازگاری با شرایط تمرینی، موش‌های گروه تمرین و تمرین - NNK در طی یک هفته به مدت ۱۰ تا ۳۰ دقیقه داخل استخر آب قرار گرفتند. سپس، هم‌زمان با تزریق NNK، موش‌های هر دو گروه تمرین و تمرین - NNK به صورت یکبار در روز و پنج روز در هفته تا پایان پژوهش در یک مخزن آب به ابعاد ۵۰×۵۰×۱۰۰ سانتی‌متر با درجه حرارت ۳۰-۳۲ درجه سانتی‌گراد در طی سه ماه به شنا پرداختند. مدت زمان تمرین در آب در روز اول ۳۰ دقیقه بود که با افزایش ۵ دقیقه روزانه، این مدت در هفته سوم به ۶۰ دقیقه رسید و سپس این زمان تا پایان دوره تمرین به مدت دوازده هفته تثبیت شد و ادامه یافت. اضافه‌بار تمرینی از طریق تنظیم قدرت و سرعت آب هنگام شنا انجام شد و به تدریج از ۷ به ۱۵ لیتر در دقیقه افزایش یافت (۱۵).

تعیین شدت تمرین شنا: از آنجاکه میزان شدت تمرین در این پژوهش به صورت زیربیشینه بود، جهت اطمینان از شدت تمرین، از میان شاخص‌های مختلفی که جهت تعیین شدت تمرین وجود دارد، همچون ضربان قلب، حداکثر اکسیژن مصرفی و میزان لاکتات خون، از روش اندازه‌گیری میزان لاکتات خون استفاده شد. بدین منظور، تعداد ۲۰ موش با میانگین وزنی  $27/93 \pm 105/84$  گرم، به چهار گروه تمرینی با شدت جریان آب ۴، ۷، ۱۰ و ۱۳ لیتر بر دقیقه تقسیم شدند. پس از آشنایی موش‌ها با محیط آزمایشگاه و تمرین شنا، تمرینات اصلی شنا جهت تعیین میزان لاکتات خون انجام شد. بدین منظور، استخر ویژه موش‌ها به صورت دو بخش مجزا تقسیم شد. با توجه به متفاوت بودن شدت جریان آب از ابتدای محل جریان آب تا انتهای آن، بخش‌ها تا نصف استخر تنظیم شد تا موش‌ها بتوانند با حداکثر جریان به وجود آمده شنا کنند. پروتکل تمرین به صورت ۳۰ دقیقه شنا با شدت ۴، ۷، ۱۰ و ۱۳ لیتر بر دقیقه بود. جهت تعیین میزان لاکتات از لاکتومتر مدل لاکتات اسکات ساخت کشور آلمان (شکل ۱) استفاده شد.



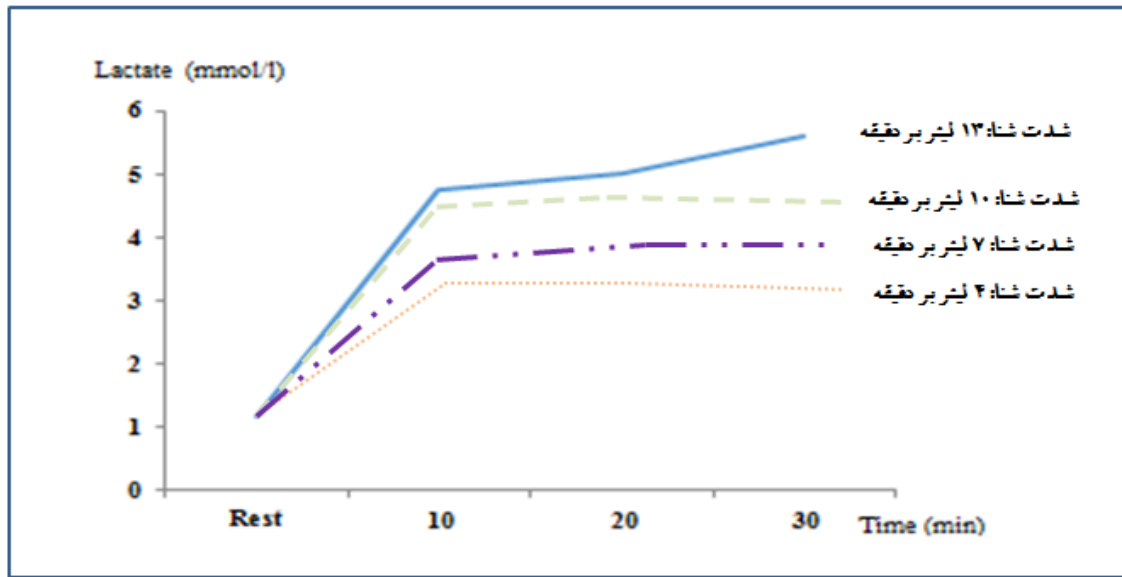
شکل ۱. لاکتات اسکات، دستگاه سنجش لاکتات

ابتدا، قبل از تمرین شنا، خون‌گیری از ناحیه سیاهرگ دمی موش‌ها انجام شد و میزان لاکتات خون استراحتی ثبت شد. سپس، تمرینات شنا برای هر دو موش با فاصله زمانی ۵ دقیقه (جهت دقت در خون‌گیری و عدم تداخل زمان تمرینی) در دو قسمت متفاوت شروع شد. پس از هر دقیقه تمرین شنا، خون‌گیری و تعیین میزان لاکتات بدین صورت انجام شد. مدت زمان ۳۰ ثانیه جهت بیرون‌آوردن موش‌ها از استخر و قراردادن مجدد آنها در استخر مجاز بود. بدین‌منظور، بلافاصله پس از بیرون‌آوردن موش‌ها از آب، با حوله کاملاً خشک شدند (به‌خصوص ناحیه دم موش‌ها) و پس از ضدعفونی کردن ناحیه خون‌گیری با الکل، با استفاده از تیغ بیستوری شکاف بسیار کوچکی در ناحیه دم موش‌ها ایجاد شد و حداکثر یک قطره خون روی کیت قرار گرفت و دوباره پس از ضدعفونی کردن ناحیه خون‌گیری در داخل آب قرار داده شدند. میزان لاکتات خون پس از ۱۰ ثانیه، از طریق لاکتومتر محاسبه شد. تعیین میزان لاکتات قبل از تمرین شنا جهت محاسبه لاکتات زمان استراحت و پس از ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه بعد از پایان تمرین، جهت محاسبه لاکتات زمان تمرین انجام شد. میانگین لاکتات خون موش‌ها در شدت‌های مختلف تمرین شنا به مدت ۳۰ دقیقه در جدول (۱) ارائه شده است.

جدول ۱. میانگین و انحراف استاندارد لاکتات خون موش‌ها در شدت‌های مختلف تمرین شنا (میلی‌مول بر لیتر)

۳۰	۲۰	۱۰	استراحت	زمان (دقیقه)
				شدت (لیتر بر دقیقه)
۳/۲۰±۰/۱۳	۳/۳۰±۰/۸۳	۳/۲۰±۰/۷۱	۱/۱۰±۰/۱۲	۴
۳/۶۶±۰/۱۳	۳/۶۴±۰/۱۱	۳/۵۲±۰/۰۸	۱/۲±۰/۱۱	۷
۴/۶۸±۰/۰۸	۴/۶۶±۰/۱۱	۴/۵۸±۰/۱۹	۱/۲±۰/۰۷	۱۰
۵/۶±۰/۱۱	۵/۰±۰/۱۲	۴/۷۴±۰/۱۱	۱/۱۸±۰/۰۸	۱۳

میزان تغییرات لاکتات در شدت‌های مختلف تمرین در نمودار ۱، نشان می‌دهد در شدت‌های تمرینی ۴، ۷، ۱۰ و ۱۳ لیتر بر دقیقه، میزان لاکتات خون موش‌ها پس از ۱۰ دقیقه تمرین به حالت یک‌نواخت رسیده است، درحالی‌که در بار تمرینی ۱۳ لیتر در دقیقه لاکتات خون در کل تمرین روندی صعودی دارد.



نمودار ۱. پاسخ لاکتات خون در تمرین شنا با شدت‌های متفاوت در زمان‌های مختلف

با توجه به پایدار شدن میزان لاکتات در نمونه‌های خون موش‌های گروه تمرین با شدت‌های ۴، ۷ و ۱۰ لیتر در دقیقه (شدت‌های تمرین مورد استفاده در این پژوهش)، می‌توان نتیجه گرفت که تمرین در این شدت‌ها را می‌توان تمرین زیربیشینه در نظر گرفت.

**نمونه‌برداری بافت ریه:** نمونه‌گیری بافتی از ریه موش‌های صحرایی، دو روز پس از طی مراحل تمرین و تزریق NNK انجام شد. برای این منظور، با تزریق ۳ واحد محلول کتامین و زایلازین با نسبت ۵ به ۲، موش‌های صحرایی بی‌هوش شدند و بافت ریه آنها خارج شد. نمونه‌های بافت ریه، پس از اندازه‌گیری وزن، به‌منظور تثبیت در محلول فیکساتیو فرمالین ۱۰ درصد قرار داده شد تا بعد از سپری شدن زمان مناسب، مراحل بعدی انجام شود.

**بررسی ایمونوهیستوشیمی:** از نمونه‌های بافت ریه قالب‌های پارافینی تهیه شد. سپس، جهت تهیه مقاطع میکروسکوپی از نمونه‌ها، برش‌هایی به ضخامت پنج میکرومتر توسط دستگاه میکروتوم روتاری تهیه شد و روی لام‌های شیشه‌ای قرار گرفت. برش‌ها با عبور از گزلیل و الکل دیپارافینه و آبدهی شدند. در مرحله بعد، به‌وسیله بافر فسفات سالین<sup>۱</sup> (PBS) شست‌وشو داده شد و سپس به‌منظور احیای آنتی‌ژنی از آنزیم تریپسین ۰/۰۵ درصد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. برش‌ها در PBS شست‌وشو داده شد و سپس در تریتون X-100 ۳ درصد به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. برش‌ها دوباره به‌وسیله PBS شست‌وشو داده شد و لام‌ها در سرم آلبومین بز<sup>۲</sup> ۱۰ درصد به‌منزله بلاکر به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه شدند و یک شب در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی اولیه خرگوشی علیه Ras (ab52939, Abcam, Ras

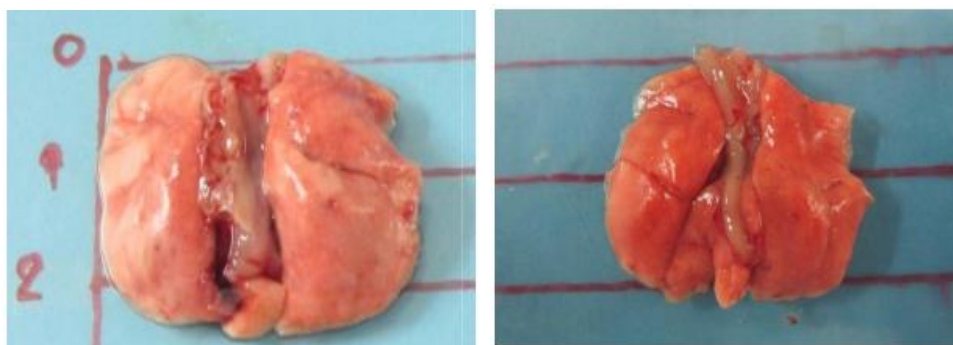
1. Phosphate-Buffered Saline

2. Goat Serum Albumin

Cambridge, UK) و (ab37435, Abcam, Cambridge, UK) Raf-1 به صورت جداگانه انکوبه شدند. غلظت آنتی‌بادی‌ها ۱:۱۰۰ بود که توسط PBS رقیق شدند. لام‌ها پس از ۳ بار شست‌وشو در PBS، در مرحله بعد، با آنتی‌بادی ثانویه فلورسنت مونوکونال (۱:۲۰۰، Alexa 488; Abcam; Cambridge, MA USA) با رقت ۱:۲۰۰ به مدت ۲ ساعت در دمای محیط در تاریکی انکوبه شدند. بعد از چندین شست‌وشو با PBS، رنگ‌آمیزی هسته با پروپیدیوم یدید<sup>۱</sup> به نسبت ۱:۱۵۰۰ انجام شد. لام‌ها دوباره با PBS شسته شدند و در پایان با بافر گلیسرول ۹۰ درصد رقیق شده با PBS پوشانده شدند و سپس توسط میکروسکوپ فلورسنت مدل اولیمپوس با لنز ۲۰۰ برای تأیید مارکرها مشاهده شدند. عکس‌های دیجیتالی از مقاطع با استفاده از دوربین متصل بر روی میکروسکوپ گرفته شد و در رایانه ذخیره گردید (۱۶). کلیه مراحل اجرای پژوهش، مطابق با دستورالعمل مؤسسه سلامت و تغذیه در مورد مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی و کمیته اخلاق دانشکده علوم ورزشی دانشگاه مازندران انجام شد. از آمار توصیفی برای دسته‌بندی داده‌های خام و توصیف داده‌ها و از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف برای بررسی طبیعی بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. همچنین، آزمون پارامتریک تحلیل واریانس یک‌طرفه برای مقایسه بین گروهی و آزمون تعقیبی توکی نیز برای مقایسه‌های دو به دو - در صورت معنادار بودن اثر کلی - به کار رفت. سطح معنی‌داری برای کلیه آزمون‌های آماری  $\alpha \leq 0.05$  در نظر گرفته شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS24 و ترسیم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Excel 2010 انجام گرفت.

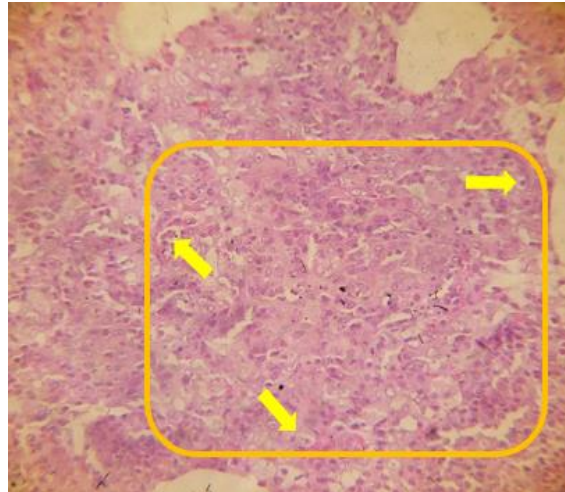
## یافته‌ها

با توجه به تصاویر حاصل از بافت ریه موش‌های گروه تزریق NNK که در شکل ۱ و ۲ ارائه شده است نحوه تاثیرگذاری و جذب NNK به روشنی مشخص است.



شکل ۲. نمونه بافت ریه موش‌های گروه کنترل (راست) و NNK (چپ). وزن و حجم ریه در معرض تزریق زیرجلدی NNK به طور معنی‌داری بیشتر از ریه گروه کنترل بود.

1. Propidium Iodide



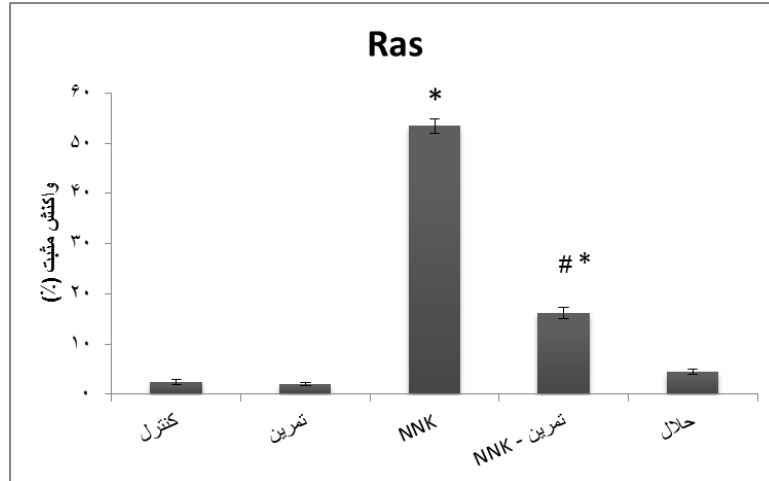
شکل ۳. در گروه NNK با افزایش نفوذ سلول‌های التهابی شامل لنفو سیت‌ها، ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های پلازما در بافت هم‌بند اطراف مجاری تنفسی، عروق و حتی افزایش شدید آنها در بافت بینابینی سبب شده است تا تغییرات ناشی از آمفیزم در این نواحی دیده شود و حجم فضای آلوئولی کاهش یابد. ضمناً، کانون کوچکی از منطقه به‌ظاهر تومورال نیز رؤیت شد. در ناحیه‌ای از بافت ریه تجمع سلول‌های آتیپیک به همراه سلول‌های التهابی دیده شد (فلش‌ها سلول‌های آتیپیک هستند) و می‌توان گفت کانون کوچکی از منطقه تومورال رؤیت شد.

**پاسخ ایمنو‌هیستوشیمی Raf-1 و Ras سلول‌های اپی‌تلیال ریه: نتایج پژوهش در زمینه تأثیر تمرین استقامتی شنا با شدت زیربیشینه و تزریق NNK بر پاسخ ایمنو‌هیستوشیمی Raf-1 و Ras سلول‌های اپی‌تلیال ریه موش‌های صحرائی، به صورت میانگین و انحراف استاندارد در جدول ۲ و ۳، ارائه شده است. علاوه بر این، تصاویر ایمنو‌هیستوشیمی تهیه شده از فعالیت این دو نیز برای مشاهده دقیق اختلاف بین گروه‌ها ارائه شده است. با توجه به نمودارهای ۱ و ۲، درصد واکنش مثبت Raf-1 و Ras در گروه تمرین تغییر معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نداشت (به ترتیب  $p=0/999$  و  $p=0/889$ ). بنابراین، برنامه تمرینی تجویز شده در این پژوهش، سطوح پایه فعالیت این دو پروتئین را در ریه موش‌های صحرائی حفظ کرده است. اما درصد واکنش مثبت Raf-1 و Ras در گروه NNK و تمرین - NNK افزایش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل نشان داد ( $p=0/001$ ). همچنین، درصد واکنش مثبت Raf-1 و Ras در گروه تمرین - NNK مقایسه با گروه NNK به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ( $p=0/001$ ).**

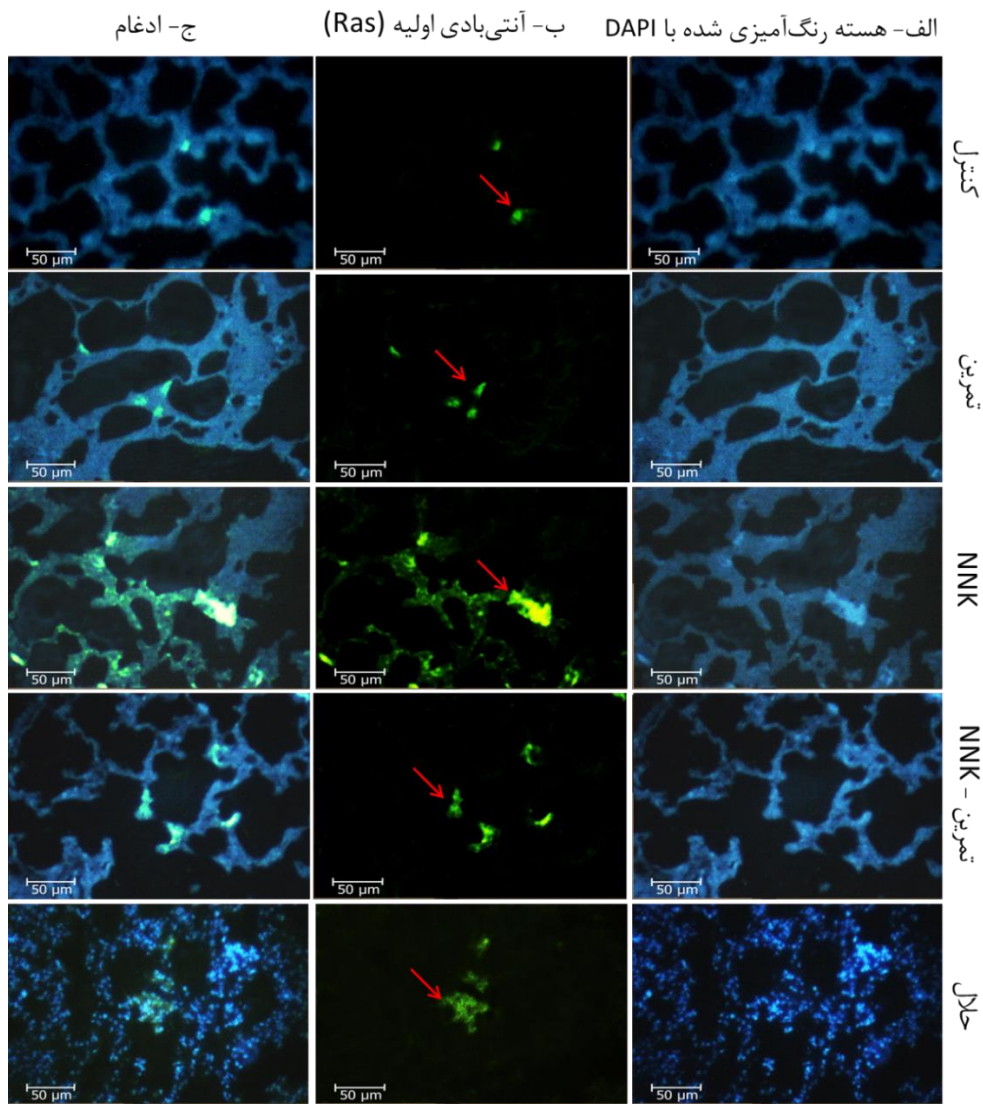
جدول ۲. میانگین و انحراف استاندارد درصد واکنش مثبت Ras

انحراف استاندارد	میانگین	تعداد	شاخص آماری گروه
۰/۷۶۴	۲/۳۷۰	۱۰	کنترل
۰/۷۱۸	۲/۰۳۰	۱۰	تمرین
۴/۵۰۱	۵۳/۴۰۰	۱۰	NNK
۳/۷۴۳	۱۶/۲۰۰	۱۰	تمرین - NNK
۱/۷۴۸	۴/۴۲۵	۱۰	حلال





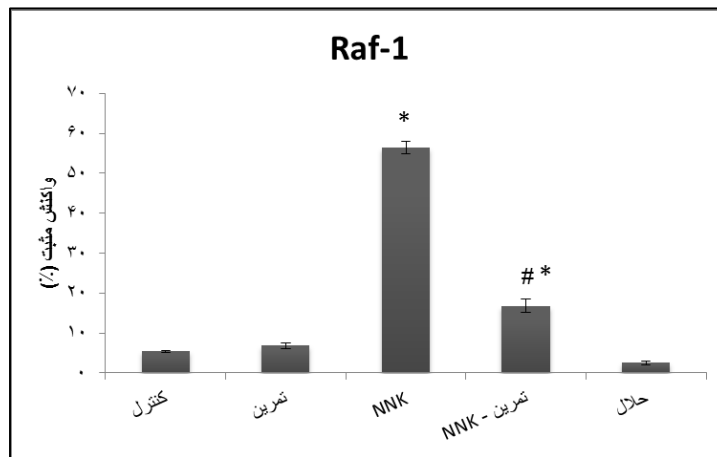
نمودار ۲. میانگین درصد واکنش مثبت Ras سلول‌های اپی‌تلیال ریه در گروه‌های مختلف. علامت \* نشانه معناداری نسبت به گروه کنترل (p=۰/۰۰۱) و علامت # نشانه معناداری نسبت به گروه NNK (p=۰/۰۰۱)



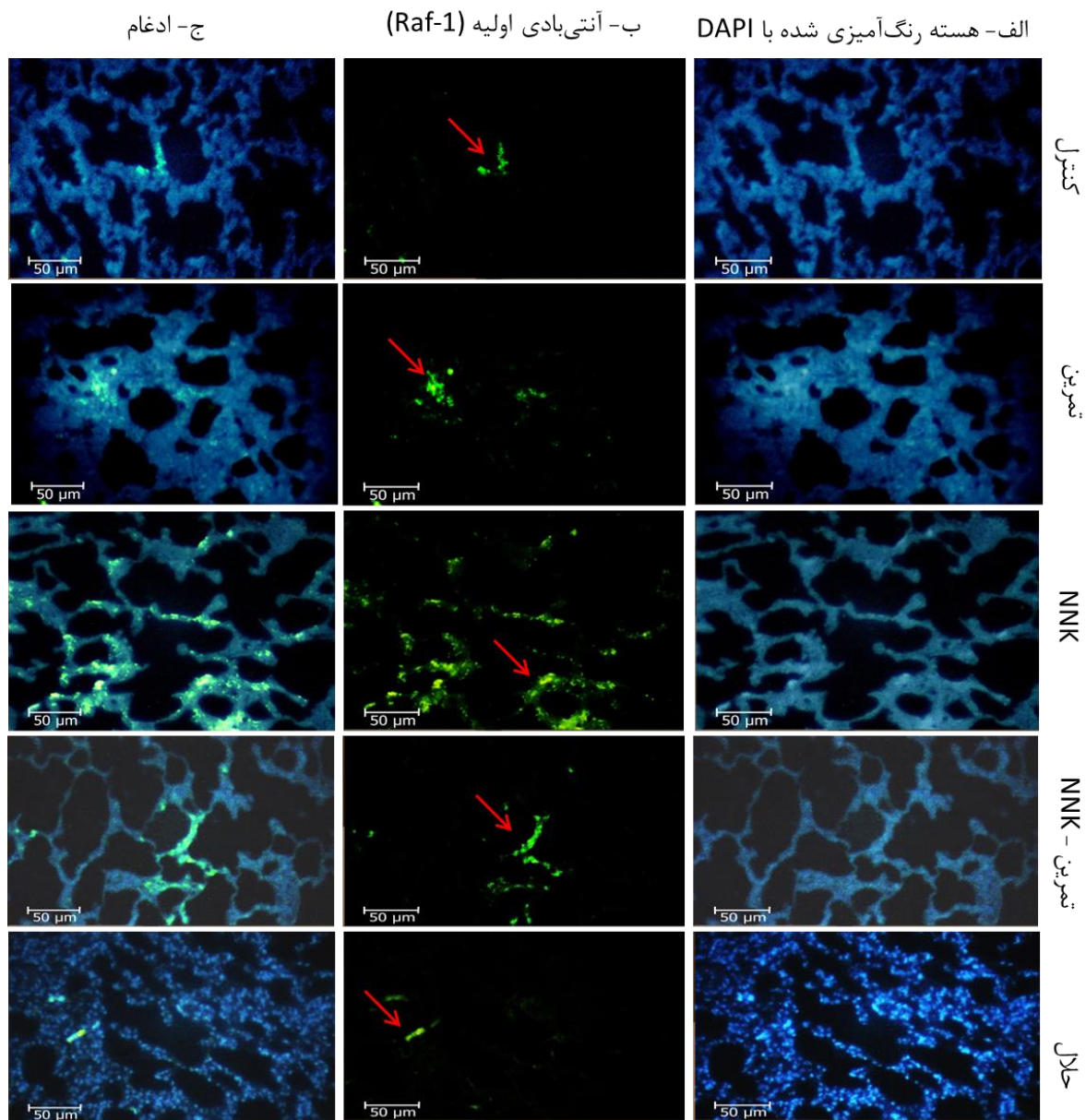
شکل ۴. رنگ‌آمیزی ایمونوفلورسانس Ras سلول‌های اپی‌تلیال ریه موش‌های صحرائی در گروه‌های پنج‌گانه. نوار مقیاس ۵۰ میکرومتر و بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر. نقاطی که با فلش مشخص شده است محل و میزان بیان پروتئین Ras در سلول‌های اپی‌تلیال بافت ریه را نشان می‌دهد.

جدول ۳. میانگین و انحراف استاندارد درصد واکنش مثبت Raf-1

انحراف استاندارد	میانگین	تعداد	شاخص آماری / گروه
۰/۸۱۹	۵/۴۱۰	۱۰	کنترل
۲/۱۶۵	۶/۸۲۰	۱۰	تمرین
۴/۹۲۴	۵۶/۴۵۰	۱۰	NNK
۵/۱۸۶	۱۶/۸۰۰	۱۰	تمرین - NNK
۱/۶۱۵	۲/۵۰۰	۱۰	حلال



نمودار ۳. میانگین درصد واکنش مثبت Raf-1 سلول‌های اپی‌تلیال ریه در گروه‌های مختلف. علامت \* نشانه معناداری نسبت به گروه کنترل ( $p=0/001$ ) و علامت # نشانه معناداری نسبت به گروه NNK ( $p=0/001$ )



شکل ۵. رنگ آمیزی ایمونوفلورسانس Raf-1 سلول‌های اپی تلیال ریه موش‌های صحرایی در گروه‌های پنج‌گانه. نوار مقیاس ۵۰ میکرومتر و بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر. نقاطی که با فلش مشخص شده است محل و میزان بیان پروتئین Raf-1 در سلول‌های اپی تلیال بافت ریه را نشان می‌دهد.

### بحث

پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر تزریق NNK بر فعالیت ایمونوهیستوشیمی Raf-1 و Ras سلول‌های اپی تلیال ریه موش‌های صحرایی طراحی شده بود که در نهایت، یافته‌ها نشان داد دوازده هفته تزریق زیرجلدی NNK، به افزایش پاسخ ایمونوهیستوشیمی Raf-1 و Ras منجر شد. علت این افزایش احتمالاً افزایش بیان زیرواحدهای گیرنده‌های استیل کولینی نیکوتینی<sup>۱</sup> (nAChRs) و گیرنده‌های بتا آدرنرژیکی است. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که سلول‌های سرطانی ریه زیرواحدهای nAChRs را بیان می‌کنند (۵). اثر میتوزنی نیکوتین

1. Nicotinic Acetylcholine Receptors

به وسیلهٔ زیرواحد  $\alpha 7$ -nAChR میانجی‌گری می‌شود و جذب **Raf-1** در افزایش دهنده‌های تکثیر در سرطان سلول‌های غیرکوچک ریه<sup>۱</sup> (NSCLC) و تومورهای ریوی انسان افزایش می‌دهد (۱۷). nAChRs کانال‌های یونی وابسته به لیگاند هستند که هم در سلول‌های سرطانی و هم در سلول‌های سالم ریه بیان می‌شوند و می‌توانند اثر تکثیری، رگ‌زایی و متاستازی نیکوتین و مشتقات آن را میانجی‌گری کنند. سازوکارهای مولکولی پایه شامل افزایش سطح کلسیم داخل‌سلولی و فعال‌سازی مسیرهای انتقال سیگنال سرطان است. علاوه بر این، استیل‌کولین به منزلهٔ یک عامل رشد اوتوکراین یا پاراکراین در سرطان ریه عمل می‌کند (۱۸).

همچنین، در تحقیق حاضر، تمرین شنای استقامتی تغییری در پاسخ ایمنونوهیستوشیمی **Ras** و **Raf-1** سلول‌های اپی‌تلیال ریهٔ موش‌های صحرایی ایجاد نکرد. این یافته نیز در توافق با یافته‌های ژی و همکاران (۲۰۰۷) است (۱۰). با مرور یافته‌های پژوهش‌های مختلف دربارهٔ پاسخ شاخص‌های تکثیر سلولی به فعالیت یا تمرینات ورزشی، این نتیجه حاصل می‌شود که احتمالاً تغییرات این شاخص‌ها در واکنش به فعالیت ورزشی در یک حالت وابسته به شدت و مدت رخ می‌دهد. احتمالاً، بر همین اساس است که در پژوهش ژی و همکاران (۲۰۰۷) سطوح پروتئین **Ras** در واکنش به یک جلسه فعالیت ۶۰ دقیقه‌ای روی دوچرخهٔ کارسنج افزایش یافت (۱۰)، در حالی که در پژوهش ما ۶۰ دقیقه تمرین شنای زیربیشینه تأثیری بر فعالیت **Ras** نداشت. اما یافتهٔ بسیار مهم و درخور توجه پژوهش حاضر، کاهش معنی‌دار پاسخ ایمنونوهیستوشیمی **Ras** و **Raf-1** در گروه تمرین - **NNK** در مقایسه با گروه **NNK** بود. این در حالی است که در گروه تمرین، درصد واکنش **Ras** و **Raf-1** بدون تغییر بود. نشان داده شده است که تمرین هوازی بیان زیرواحدهای nAChR را، که در ساختار دیافراگم در طی نارسایی قلبی ناشی از تنگی آئورت افزایش یافته، تعدیل می‌کند (۱۸). بنابراین، ممکن است در پژوهش حاضر نیز تمرین شنای زیربیشینه با افزایش سطوح nAChR مقابله کرده و متعاقباً، باعث کاهش فعالیت پروتئین‌های آبخار پایین دست مسیر سیگنالی تکثیر سلولی، از جمله **Ras** و **Raf-1** در گروه تمرین - **NNK** در مقایسه با گروه **NNK** شده باشد. از سوی دیگر اتصال **NNK** به  $\beta$ -AR در سلول‌های اپی‌تلیال ریه باعث فعال‌شدن **PKA** می‌شود. گیرندهٔ فاکتور رشد اپیدرمال<sup>۲</sup> (**EGFR**) و مسیر **Raf-1/Ras/MEK/ERK** در ادامهٔ آبخار سیگنالی  $\beta$ -AR فعال می‌شوند تا تکثیر سلولی را افزایش دهند (۱۹).  $\beta$ -ARs اعضای خانواده گیرنده‌های جفت‌شده با **G** پروتئین هستند. **NNK** به لحاظ ساختاری شبیه به آگونیست کلاسیک  $\beta$ -AR است و می‌تواند به  $\beta$ -AR مستقر روی سلول‌های اپی‌تلیال ریوی متصل شود. این اتصال، مسیرهای سیگنالی تکثیر و بقای سلولی به وسیلهٔ فعال‌سازی  $\beta$ -AR را تحریک می‌کند، که نشان می‌دهد  $\beta$ -AR نقش مهمی در سرطان ریهٔ ناشی از **NNK** ایفا می‌کند (۲۰). جاست و همکاران (۱۹۸۹) با بررسی چگالی  $\beta$ -ARs در ورزشکاران مختلف گزارش کردند که مؤلفه‌های گردش خونی آدرنرژیک قوی‌تر فعالیت سمپاتیکی در حالت استراحت در شناگران و دوندگان مسافت‌های طولانی به کاهش چگالی گیرندهٔ بتا و کاهش حساسیت گیرنده‌های جزء نورآدرنرژیک منجر می‌شود. همچنین، تمرینات استقامتی شنا و دوهای

طولانی مدت، به کاهش فعالیت سمپاتیکی و کاهش چگالی گیرنده بتا و افزایش حساسیت گیرنده آلفا منتهی می‌شوند (۲۱). بر این اساس، علاوه بر کاهش بیان زیرواحد‌های nAChR، کاهش چشمگیر درصد واکنش Ras و Raf-1 را می‌توان به کاهش چگالی گیرنده‌های بتاآدرنژیکی در دسترس برای اتصال NNK نیز نسبت داد.

### نتیجه‌گیری

تمرین شنای زیربیشینه به مدت دوازده هفته می‌تواند تکثیر سلولی NNK را کاهش دهد، اما هنوز هم سطوح شاخص‌های تکثیر سلولی بالاتر از سطوح پایه است. بنابراین، هرچند به خوبی ثابت شده است که تمرین ورزشی عامل مهمی در درمان سرطان است، برای رسیدن به نتیجه قطعی درباره تأثیر تمرینات ورزشی در پیش‌گیری از سرطان ناشی از مصرف سیگار، انجام پژوهش‌های بیشتر با پروتکل‌های تمرینی طولانی‌تر پیشنهاد می‌شود.

### منابع

1. Hecht S.S., Murphy S.E., Carmella S.G., Li S., Jensen J., Le C., Joseph A.M., Hatsukami D.K. (2005). Similar uptake of lung carcinogens by smokers of regular, light, and ultralight cigarettes. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*. 14(3):693-8.
2. Jin Z., Gao F., Flagg T., Deng X. (2004). Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone promotes functional cooperation of Bcl2 and c-Myc through phosphorylation in regulating cell survival and proliferation. *The Journal of Biological Chemistry*. 279(38):40209-19.
3. Panani A.D., Roussos C. (2006). Cytogenetic and molecular aspects of lung cancer. *Cancer Letters*. 239(1):1-9.
4. Witschi H. (2004). Carcinogenic activity of cigarette smoke gas phase and its modulation by beta-carotene and N-acetylcysteine. *Toxicological Sciences*. 84(1):81-7.
5. Xue J., Yang S., Seng S. (2014). Mechanisms of cancer induction by tobacco-specific NNK and NNN. *Cancers*. 6(2):1138-56.
6. Schaal C., Chellappan S.P. (2014). Nicotine-mediated cell proliferation and tumor progression in smoking-related cancers. *Molecular Cancer Research*. 12(1):14-23.
7. Akopyan G., Bonavida B. (2006). Understanding tobacco smoke carcinogen NNK and lung tumorigenesis (Review). *International Journal of Oncology*. 29(4):745-52.
8. McCubrey J.A., Steelman L.S., Chappell W.H., Abrams S.L., Wong E.W.T., Chang F., Lehmann B., Terrian D.M., Milella M., Tafuri A., Stivala F., Libra M., Basecke J., Evangelisti C., Martelli A.M., Franklin R.A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 1773(8):1263-84.
9. Widegren U., Wretman C., Lionikas A., Hedin G., Henriksson J. (2000). Influence of exercise intensity on ERK/MAP kinase signalling in human skeletal muscle. *Pflügers Archiv*. 441(2-3):317-22.
10. Xie L., Jiang Y., Ouyang P., Chen J., Doan H., Herndon B., Sylvester J.E., Zhang K., Molteni A., Reichle M., Zhang R., Haub M.D., Baybutt R.C., Wang W. (2007). Effects of dietary calorie restriction or exercise on the PI3K and Ras signaling pathways in the skin of mice. *Journal of Biological Chemistry*. 282(38):28025-35.
11. Su S.H., Jen C.J., Chen H. (2011). NO signaling in exercise training-induced anti-apoptotic effects in human neutrophils. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 405(1):58-63.
12. Urrego D., Tomczak A.P., Zahed F., Stühmer W., Pardo L.A. (2014). Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Royal Society*. 369(1638):194-203.
13. Ferioli M., Zauli G., Martelli A.M., Vitale M., McCubrey J.A., Ultimo S., Capitani S., Neri L.M. (2018). Impact of physical exercise in cancer survivors during and after antineoplastic treatments. *Oncotarget*. (17):14005-34.
14. Belinsky S.A., Foley J.F., White C.M., Anderson M.W., Maronpot R.R. (1990). 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*. 50(12):3772-80.
15. Mirdar Sh., Arab A., Hedayati M., Hajizade A. (2011). The effect of pregnant rat swimming on hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  levels of neonatal lung. *Tehran University Medical Sciences* 69(12):754-60. (Persian)
16. Khodaie B., Lotfinia A.A., Ahmadi M., Lotfinia M., Jafarian M., Karimzadeh F., Coulon Ph., Gorji A. (2015). Structural and functional effects of social isolation on the hippocampus of rats with traumatic brain injury. *Behavioural Brain Research*. 278:55-65.
17. Dasgupta P., Rastogi S., Pillai S., Ordonez-Ercan D., Morris M., Haura E., Chellappan S. (2006). Nicotine induces cell proliferation by  $\beta$ -arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways. *The Journal of Clinical Investigation*. 116(8):2208-17.
18. Improgio M.R., Tapper A.R., Gardner P.D. (2011). Nicotinic acetylcholine receptor-mediated mechanisms in lung cancer. *Biochemical Pharmacology*. 82(8):1015-21.

19. Wen, J., Fu, J.H., Zhang, W., Guo, M. (2011). Lung carcinoma signaling pathways activated by smoking. *Chinese Journal of Cancer*. 30(8):551-8.
20. Testa, J.R., Tschlis, P.N. (2005). AKT signaling in normal and malignant cells. *Oncogene*. 24(50):7391-3.
21. Jost, J., Weiss, M., Weicker, H. (1989). Comparison of sympatho-adrenergic regulation at rest and of the adrenoceptor system in swimmers, long-distance runners, weight lifters, wrestlers and untrained men. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*. 58(6):596-604.