

## ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО ПРОФИЛЯ КРЫС, ПОДВЕРГШИХСЯ ХРОНИЧЕСКОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ермолаева Е.Н.<sup>1</sup>, Сашенков С.Л.<sup>1</sup>, Сурина-Марышева Е.Ф.<sup>2</sup>, Петухова В.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России», Челябинск;

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (НИУ)», Челябинск, e-mail: ermen33@mail.ru

Эксперимент выполнялся на 125 лабораторных животных. Физическую активность животных моделировали разной степени мощности в зависимости от режима тренировки. Крысы плавали каждый день по 30 минут три недели, такая физическая нагрузка соответствовала умеренной мощности. При физической активности субмаксимальной мощности крысы плавали с дополнительным грузом, составляющим 2% от массы тела, с 8-го по 21-й день. Экспериментальные группы крыс в контрольные точки исследования (9, 15 и 21-й день) подвергались сверхсильному по мощности воздействию (плавали с подвешенным грузом, вес которого 20% от массы тела) в течение четырех минут. Оценивая фагоцитоз, выявили, что при нагрузках умеренной мощности интенсивность фагоцитоза уменьшается, тогда как его активность увеличивается. Рост числа лейкоцитов компенсирует индивидуальное уменьшение способности нейтрофилов к образованию свободных радикалов кислорода, и как результат виден в увеличении светосуммы и максимальной светимости хемилюминесценции нейтрофилов, как базальной, так и люминол-зависимой. Выявлены положительные корреляционные связи между общим числом нейтрофильных лейкоцитов и показателями светосуммы базального свечения хемилюминесценции крови. При физической активности субмаксимальной мощности возникшие взаимосвязи отрицательны, что может быть связано с недостаточной продукцией активных форм кислорода. А функционирование иммунной системы может регулироваться интенсивностью физической нагрузки. В крови животных, подвергшихся нагрузкам субмаксимальной мощности, отмечается повышение продукции про- и противовоспалительных цитокинов (интерлейкинов 4 и 6), указывающее на напряженность иммунитета.

Ключевые слова: физическая нагрузка, фагоцитоз, хемотаксис, хемилюминесценция, интерлейкин 6, интерлейкин 4.

## INDICES OF THE IMMUNE PROFILE OF RATS AFFECTED BY CHRONIC PHYSICAL LOAD IN THE EXPERIMENT

Ermolaeva E.N.<sup>1</sup>, Sashenkov S.L.<sup>1</sup>, Surina-Marysheva E.F.<sup>2</sup>, Petukhova V.I.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "South Ural State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Chelyabinsk;

<sup>2</sup> Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "South Ural State University (National Research University)", Chelyabinsk, e-mail: ermen33@mail.ru

The experiment was performed on 125 laboratory animals. The physical activity of the animals was simulated to varying degrees of power depending on the training mode. The rats swam 30 minutes a day for three weeks, and the exercise was moderate. With sub-maximum power activity, rats swam with an additional load of 2% of their body weight from 8 to 21 days. Experimental groups of rats at test points (9, 15 and 21 days) were exposed to ultra-high power (floating with a suspended weight of 20% of body weight) for four minutes. In assessing phagocytosis, it was found that in moderate-power loads, phagocytosis intensity decreases, while its activity increases. The increase in the number of leukocytes compensates for the individual decrease in the neutrophil's ability to produce free oxygen radicals, and as a result is seen in the increased luminosity and maximum luminous luminosity of neutrophils, both basal and luminol. Positive correlations between the total number of neutrophil leukocytes and the luminous luminous values of the basal luminosity of chemiluminescence of blood have been found. For submaximum physical activity, the relationships are negative, which may be due to insufficient production of active oxygen species. And the functioning of the immune system can be regulated by the intensity of physical activity. The production of pro-and anti-inflammatory cytokines (interleukin 4 and 6) is increasing in the blood of animals exposed to sub-maximum capacity loads, indicating the tension of immunity.

Keywords: physical activity, phagocytosis, chemotaxis, chemiluminescence, interleukin 6, interleukin 4.

Влияние физической активности на организм многогранно, изменяется функционирование практически всех систем организма, в том числе и состояние иммунной

системы. Изменения касаются как врожденного, так и адаптивного звеньев иммунитета. Во время интенсивных тренировок количество лейкоцитов возрастает, а также изменяются конституция подклассов лейкоцитов, их основные функции. При физической нагрузке происходит ремоделирование субпопуляций естественных киллеров, происходит снижение клеток с иммунорегуляторными функциями. Среди моноцитов, на долю которых приходится около 2-10% лейкоцитов крови, выделяют три подтипа. Они отличаются наличием или отсутствием клеточных маркеров CD14+, CD14++, CD16+, CD16++. Во время физической нагрузки количество неклассических моноцитов CD14+CD16+ возрастает, что приводит к преобладанию в крови семейства клеток короткоживущих, так как имеют короткие теломеры, и синтезирующих преимущественно провоспалительные цитокины. Аналогично изменяется и фенотип макрофагов. Макрофаги классифицируются на M1, так называемые провоспалительные клетки, и M2, обладающие иммунорегуляторной активностью. При интенсивной физической нагрузке было зарегистрировано преобладание клеток с провоспалительным фенотипом. Оценивая лимфоцитарные реакции на Т-клеточные митогены во время физических нагрузок и в ранний восстановительный период, выявили снижение реакции на фитогемагглютинин и конканавалин А. Эти лектины являются стимуляторами образования интерлейкина-2, который является фактором роста для клеток лимфомиелоидного ряда. Пролиферация лимфоцитов на В-клеточные митогены (митоген лаконоса) возрастает или не изменяется после интенсивной тренировки. Количество В-лимфоцитов не изменяется при физических нагрузках, регистрируется лишь снижение синтеза антител. Выявленные изменения отражают дисбаланс в субпопуляции лимфоцитов за счет уменьшения количества Т-клеток [1]. В нейтрофилах, моноцитах, макрофагах изменяется экспрессия рецепторов и даже трансдукция внутриклеточного сигнала. Функционально эти процессы приводят к уменьшению распознавания патогенных факторов, нарушению активации клеток, снижению фагоцитоза и нарушению хемотаксиса.

Физически активный образ жизни может оказывать положительный эффект на иммунный статус организма, причем в зависимости от интенсивности, длительности и силы тренировки этот эффект различен. При умеренной физической нагрузке (длительной, небольшой интенсивности) иммунное состояние спортсмена улучшается, уменьшается риск развития инфекционных и воспалительных заболеваний. Во время соревновательного периода или интенсивного тренировочного процесса повышается восприимчивость к аллергологическим, иммунологическим заболеваниям, инфекционным процессам [2]. У спортсменов во время интенсивных тренировок и после соревнований в крови регистрируется временное снижение количества иммунных клеток и уровня защитных иммуноглобулинов IgA в слюне, что приводит к риску развития респираторных

заболеваний. Это событие обозначено в виде гипотезы «открытого окна», которая получила распространение в 80-90-х годах прошлого столетия [3]. Сформулированное высказывание о том, что повышенная восприимчивость к респираторным заболеваниям в период тренировочного процесса является небольшой ценой, которую платят за долгосрочные выгоды для здоровья от регулярных высокоинтенсивных тренировок, находит все большее подтверждение [4]. В последних исследованиях показано, что действие интенсивных нагрузок на иммунную систему приводит к активации всех звеньев иммунитета, что приводит к развитию более совершенной противовоспалительной реакции, снижающей риск развития и тяжесть течения заболеваний сердечно-сосудистой системы, гипертонической болезни, ишемической болезни сердца и т.д. Laine M.K. и соавторы (2016) обследовали более 2000 элитных спортсменов и зарегистрировали более низкие цифры артериального давления относительно нетренированных лиц. Это указывает на высокий уровень «метаболического здоровья» в дальнейшей жизни и защищает от гипертонии в более позднем возрасте [5]. Возникает вопрос, как разные по длительности, силе, направленности физические нагрузки влияют на показатели иммунной системы и какой функциональный эффект они оказывают на организм спортсмена.

Цель исследования: в условиях эксперимента смоделировать хронические физические нагрузки разной силы и интенсивности, выявить различия в показателях работы иммунной системы лабораторных животных.

**Материалы и методы исследования.** Опыт был проведен на 125 белых лабораторных крысах: половозрелых самках и самцах, разного пола в соотношении 50:50, массой 200-250 грамм. Содержание лабораторных животных, проведение исследовательской части работы и вывод животных из эксперимента осуществляли в соответствии с нормами Европейской конвенции по защите лабораторных животных (1986). В эксперименте участвовали 3 группы крыс: две опытные и одна контрольная. Моделировали физическую нагрузку (ФН) разной степени мощности: умеренную и субмаксимальную. Эксперимент длился 21 день. Для моделирования физических нагрузок умеренной мощности крысы ежедневно плавали в бассейне глубиной 1 метр при температуре воды 22-24 °С по 30 минут. При физической активности субмаксимальной мощности нагрузка постепенно возрастала: первые 7 дней крысы плавали без груза, а с 8-го по 21-й день животные плавали в баке с дополнительным грузом, вес которого составлял 2% от массы тела. Экспериментальные группы крыс в контрольные точки исследования (9, 15 и 21-й день) подвергались сверхсильному по мощности воздействию: плавали с подвешенным грузом, вес которого составлял 20% от массы тела, воздействие дозированное - четыре минуты. Внутрисердечной

пункцией забирали кровь после максимальной нагрузки в конце эксперимента [6]. Контрольную группу составляли интактные крысы.

Под световым микроскопом считали общее количество лейкоцитов, в мазке крови подсчитывали лейкоцитарную формулу. Хемотаксис лейкоцитов проводили под агарозным гелем по методу R.D. Nelson et al. (1975) в модификации Л.Я. Эберта и соавторов [7, с. 87]. Фагоцитоз лейкоцитов оценивали, учитывая активность и интенсивность процесса, по методу И.С. Фрейдлин [8, с. 143]. Интенсивность свободнорадикального окисления крови регистрировали методом хемилюминесценции (с инициацией процесса люминолом) [9, с. 28]. Для определения содержания интерлейкинов 6 и 4 использовали наборы фирмы Platinum ELISA (Австрия) для иммуноферментного метода исследования. Статистическая обработка результатов исследования оценивалась общепринятыми методами вариационной статистики, достоверность различий между группами рассчитывали по непараметрическому критерию Манна - Уитни (U).

### **Результаты исследования и их обсуждение**

На 21-й день эксперимента у крыс, выполнявших тренировки умеренной и субмаксимальной мощности, было зарегистрировано статистически значимое повышение числа лейкоцитов (при ФН умеренной мощности на 25,99%, при ФН субмаксимальной мощности – на 38,78% относительно контроля). Изменения лейкоформулы однотипны: увеличение количества сегментоядерных нейтрофилов на 100,14–110,75% относительно контроля (контроль -  $1,90 \pm 0,09 \times 10^9/\text{л}$ ) и снижение лимфоцитов на 69,79–73,24% (контроль -  $6,96 \pm 0,20 \times 10^9/\text{л}$ ). Интенсивность мышечного напряжения во время тренировки обуславливает степень и выраженность миогенного лейкоцитоза. Этот процесс связан не только с перераспределением клеток в сосудистом русле – изменением численности циркулирующего и маргинального пулов; выходом клеток из кровяных депо; но и усилением гемопоэза за счет влияния ростковых факторов, цитокинов на костный мозг, а также снижения доли неэффективного лейкопоэза. Кроме этого, одной из главных причин миогенного лейкоцитоза являются постоянные микротравмы мышечной ткани во время физической нагрузки. При оценивании функциональных показателей лейкоцитов при ФН субмаксимальной мощности было выявлено, что миграционная активность лейкоцитов, активность и интенсивность фагоцитоза статистически значимо выше показателей контрольной группы. При физических нагрузках умеренной мощности статистически значимо изменяются показатели фагоцитоза: активность возрастает, а интенсивность фагоцитоза падает. При этом активность фагоцитоза статистически значимо возрастает при ФН умеренной мощности относительно ФН субмаксимальной мощности (табл. 1).

Полученный результат доказывает факт более значимой активации иммунного ответа на сильное повреждение при субмаксимальных нагрузках.

Таблица 1

Влияние физической нагрузки различной интенсивности на хемотаксис, фагоцитоз и продукцию цитокинов (21 сутки)

Группы сравнения Показатель	Контроль	ФН субмаксимальной мощности	ФН умеренной мощности
Индекс хемотаксиса, у.е.	1,11±0,06	1,43±0,08*	1,27±0,07
Активность фагоцитоза, %	22,64±0,88	25,98±0,74*	34,61±1,23*^
Интенсивность фагоцитоза, у.е./кл	2,41±0,09	2,78±0,07*	2,08±0,12*
ИЛ - 4, пг/мл	1,22±0,16	1,98±0,33*	1,36±0,22
ИЛ - 6, пг/мл	12,87±1,49	25,67±2,28*	18,77±3,54
Примечание: * - различия по критерию Манна - Уитни ( $p \leq 0,05$ ) с контрольной группой животных; ^ - различия между ФН умеренной и субмаксимальной мощности; n=9.			

Мышечные сокращения и повышенный энергетический обмен приводят к выработке различных цитокинов, опосредуя иммунорегулирующий потенциал физической активности. В эксперименте зарегистрировано статистически значимое повышение цитокинов (ИЛ-4 на 62,29% относительно контроля, ИЛ-6 - на 99,46%) только при ФН субмаксимальной мощности. Уровни ИЛ-6 увеличиваются во время и после тренировки, и это увеличение пропорционально интенсивности и продолжительности физической нагрузки. ИЛ-6 оказывает гормоноподобное действие на мышцы, стимулируя выработку иммунорегуляторных медиаторов (ИЛ-10, антагониста рецептора ИЛ-1) и понижая регуляцию туморнекротического фактора моноцитами и макрофагами. ИЛ-6 запускает механизмы метаболической регуляции, что приводит к стойкой долгосрочной адаптации к физическим нагрузкам. Было показано, что у возрастных спортсменов повышается уровень ИЛ-4, что способствует поляризации макрофагов в иммунорегуляторную форму M2. Возрастание ИЛ-4 в крови можно оценить как фактор, способствующий устранению повреждений при интенсивной физической нагрузке.

Нейтрофилы обладают способностью кислородного киллинга, который реализуется через активацию НАДФН – оксидазной системы, приводя к образованию большого количества активных метаболитов кислорода, так называемому респираторному взрыву. Показатели базального свечения, индуцированной хемилюминесценции и функциональный

резерв нейтрофилов относительно контроля светосумма (СС) и максимальная светимость (МС) статистически значимо снижались при всех видах нагрузки относительно контроля. Интенсивность свободнорадикального окисления по всем изучаемым параметрам статистически значимо уменьшалась при ФН субмаксимальной мощности относительно ФН умеренной мощности (табл. 2).

Таблица 2

Интенсивность свободнорадикального окисления нейтрофилов при хронических физических нагрузках (21 сутки)

Группы сравнения		Контроль	ФН субмаксимальной мощности	ФН умеренной мощности
Показатель				
Базальная хемилюминесценция нейтрофилов	СС, у.е./мин.	0,35 ± 0,02	0,13 ± 0,02*	0,21 ± 0,01*^
	МС, у.е.	0,13 ± 0,02	0,05 ± 0,01*	0,07 ± 0,01*^
Люминол-зависимая хемилюминесценция нейтрофилов	СС, у.е./мин.	1,31 ± 0,11	0,19 ± 0,03*	0,32 ± 0,07*^
	МС, у.е.	0,41 ± 0,07	0,06 ± 0,007*	0,14 ± 0,04*^
Функциональный резерв нейтрофилов, %		203,2 ± 63,8	28,57 ± 7,93*	38,91 ± 15,5*
Примечание: * - различия по критерию Манна - Уитни ( $p \leq 0,05$ ) с контрольной группой; ^ - разница между ФН умеренной и субмаксимальной мощности; n=9.				

Более значимое снижение интенсивности свободнорадикальных процессов в нейтрофилах при хронических нагрузках субмаксимальной мощности связано с увеличением общего числа нейтрофильных лейкоцитов, которые функционально недостаточно активны. Зарегистрированный факт повышения общего количества лейкоцитов компенсирует снижение их способности к производству активных форм кислорода. Это подтверждается возникновением положительных корреляционных взаимосвязей между абсолютным количеством нейтрофилов и светосуммой базального свечения крови ( $0,64 \text{ } p \geq 0,05$ ). Данные связи отрицательны ( $0,77 \text{ } p \leq 0,05$ ) при субмаксимальной физической активности, что свидетельствует о снижении образования свободных радикалов, что может быть связано как с функциональным состоянием лейкоцитов, так и с формирующимся в организме «кислородным долгом».

Нейтрофилы - короткоживущие клетки, выполняющие следующие функции: фагоцитоз, производство активных форм кислорода, высвобождение липидных медиаторов и цитокинов, запускают апоптоз. Нейтрофилы стимулируют другие лейкоциты и вызывают каскад иммунных и воспалительных реакций. Гипоксические состояния, гормональная дисфункция и физические нагрузки изменяют метаболизм нейтрофилов. Нейтрофилы

метаболизируют глюкозу посредством гликолиза и пентозофосфатного пути. Митохондриальное окисление глюкозы очень низкое. Пентозофосфатный путь обеспечивает восстановленный НАДФН для активности НАДФН-оксидазы для получения супероксида из кислорода. Понижение продукции активных метаболитов кислорода и снижение кислородного киллинга в нейтрофилах, приводящее к снижению иммунной защиты у спортсменов, может быть связано с дефицитом кислорода [10]. Нейтрофилы опосредуют иммунный ответ организма во время и после выполнения физических упражнений посредством активации нейроэндокринных механизмов регуляции, синтез цитокинов, монокинов, лимфокинов, активных метаболитов кислорода. Их количество значительно повышается во время физических тренировок [11]. Одной из причин развития лейкоцитоза являются множественные микроповреждения скелетных мышц, суставов и сухожилий при физической нагрузке. Адаптация к данному виду повреждения объясняется классическим механизмом: «повреждение – воспаление – регенерация». В основе провоспалительной реакции лежит увеличение секреции базальных цитокинов, способствующих воспалению и изменению баланса между про- и противовоспалительными цитокинами, со снижением уровня последних и запуском процесса регенерации скелетной мышцы. Происходит восстановление очага повреждения: смена клеток противовоспалительного фенотипа в зоне регенерирующей мышцы; снижение апоптоза мышечных клеток; повышение производства интерлейкинов, монокинов, лимфокинов, факторов роста для миоцитов и миобластов, эндотелиоцитов; формирование и рост новых капилляров, ремоделирование сосудов [12]. Изменения системы иммунитета, которые возникают во время тренировок, соревнований или восстановительного процесса, многообразны и не могут быть оценены только как положительно или отрицательно влияющие на организм. Среди них: усиленная регенерация клеток при мышечной травме, гиперергическая реакция на введение вакцин и сывороток, возрастание аллергических реакций, инициация аутоиммунных процессов с их иммунорегуляторной коррекцией.

### **Выводы**

1. Показатели иммунной системы при умеренных физических нагрузках улучшаются: интенсивность фагоцитоза уменьшается, при этом его активность становится выше. Повышение общего количества лейкоцитов компенсирует индивидуальное понижение функциональной способности нейтрофильных лейкоцитов к образованию активных метаболитов кислорода, что приводит к возрастанию светосуммы и максимальной светимости базальной и люминол-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов.

2. Физические нагрузки субмаксимальной мощности приводят к активации иммунных показателей. Хемотаксис, показатели фагоцитоза (активность и интенсивность)

статистически значимо увеличиваются относительно контроля; интенсивность свободнорадикального окисления нейтрофилов снижается, что подтверждается статистически значимым снижением показателей хемилюминесценции цельной крови и функционального резерва нейтрофилов относительно контрольных значений; статистически значимо увеличивается синтез цитокинов (ИЛ-6 и ИЛ-4). Полученные данные свидетельствуют о напряженности иммунитета при хронических субмаксимальных физических нагрузках.

### Список литературы

1. Krivokhizhina L.V., Ermolaeva E.N., Kantjukov S.A., Smirnov D.M., Surina-Marysheva E.F. Influence of ceruloplasmin on free radical oxidation at chronic physical activity of submaximal level // *Gaz. Med. Ital. – Arch. Sci. Med.* 2018. Vol. 177, № 3, S1, P. 71-77. DOI: 10.23736/S0393-3660.18.03782-8.
2. Liang A., Drazick A., Gao H., Li Y. Skeletal muscle secretion of IL-6 is muscle type specific: ex vivo evidence // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. Vol. 505, № 1. P. 146-150. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.09.042.
3. Cantó E., Roca E., Perea L., Rodrigo-Troyano A., Suarez-Cuartin G., Giner J., Soria J.M., Nescolarde L. Salivary immunity and lower respiratory tract infections in non-elite marathon runners // *PLoS One.* 2018. Vol. 13, № 11. P. e0206059. DOI: 10.1371/journal.pone.0206059.
4. Clifford T., Wood M.J., Stocks P., Howatson G., Stevenson E., Hilkens M. T-regulatory cells exhibit a biphasic response to prolonged endurance exercise in humans // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2017. Vol. 117, № 8. P. 1727-1737. DOI: 10.1007/s00421-017-3667-0.
5. Laine M.K., Eriksson J.G., Kujala U.M., Kaprio J., Loo B-M., Sundvall J., Bäckmand H.M., Peltonen M., Jula A., Sarna S. Former male elite athletes have better metabolic health in late life than their controls // *Scand. J. Med. Sci. Sports.* 2016. Vol. 26, № 3. P. 284-290. DOI: 10.1111/sms.12442.
6. Ермолаева Е.Н., Кантюков С.А., Яковлева В.П. Реакция нейтрофилов на хроническую физическую нагрузку различной интенсивности // *Российский иммунологический журнал.* 2018. Т. 12, № 3. С. 286-289. DOI: 10.31857/S102872210002396-0.
7. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: Изд-во ЧелГМА, 2000, 167 с.
8. Фрейдлин И.С. Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека. Л., 1986. 272 с.



9. Фархутдинов Р.Р., Лиховских В.А. Хемилюминесцентные методы исследования свободно-радикального окисления в биологии и медицине. Уфа: Изд-во БГМИ, 1995. 90 с.
10. Breitenbach M., Rinnerthaler M., Weber M., Breitenbach-Koller H., Karl T., Cullen P., Basu S., Haskova D. The defense and signaling role of NADPH oxidases in eukaryotic cells: Review // Wien. Med. Wochenschr. 2018. Vol. 168, № 11-12. P. 286-299. DOI: 10.1007/s10354-018-0640-4.
11. Liu D., Wang R., Grant A.R., Zhang J., Gordon P.M., Wei Y., Chen P. Immune adaptation to chronic intense exercise training: new microarray evidence // BMC Genomics. 2017. Vol. 18, № 1. P. 29. DOI: 10.1186/s12864-016-3388-5.
12. Karpuzoglu E., Schmiedt CW., Pardo J., Hansen M., Guo TL., Holladay SD., Gogal RM Jr. Serine protease inhibition attenuates rIL-12-induced GZMA activity and proinflammatory events by modulating the Th2 profile from estrogen-treated mice // Endocrinology. 2014. Vol. 155, № 8. P. 2909-2923. DOI: 10.1210/en.2014-1045.