

## ИММУНИТЕТ И СТРЕСС

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2007

УДК 612.017.1:612.766.1].08

О. Т. Кудяева, О. П. Колесникова, И. Н. Оськина, В. А. Козлов

## ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ ФИЗИЧЕСКОЙ ТРЕНИРОВКИ НА ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ IN VITRO И IN VIVO У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

ГУ НИИ клинической иммунологии СО РАМН, Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск

Исследовали влияние физической нагрузки на состояние иммунной системы мышей гибридов (СВАхС57ВL/6)F<sub>1</sub>. Показано, что регулярные тренировки в использованном режиме (плавание без груза при температуре воды 33—35°С в течение 2 ч 5 дней в неделю на протяжении 4 мес) не вызывают истощения экспериментальных животных, но оказывают значимое влияние на функциональные характеристики иммунной системы: снижают спонтанную и митогениндуцированную пролиферацию клеток селезенки, подавляют клеточный и гуморальный иммунный ответ на Т-зависимый антиген, при этом реакция зависит от пола экспериментальных животных. Обнаружено, что регулярные физические нагрузки приводят к поликлональной активации В-лимфоцитов у животных обоего пола, что выражается в возрастании концентрации IgG в периферической крови и его увеличенной спонтанной продукции клетками костного мозга и селезенки in vitro. Сделано предположение, что активация В-лимфоцитов может быть обусловлена продукцией стимулирующих факторов мышечной ткани.

The long physical training influence upon F<sub>1</sub> (СВАхС57ВL/6) mice immune system state has been studied. It has been shown that the regular trainings as swimming without loading when the temperature of water is 33-35 degrees above zero and the fixed regime is such as 2 hours for 5 days in a week during 4 months do not provoke the emaciation of experimental animals but they take the significant effect on functional characteristics of immune system. For example the trainings decrease the spontaneous and mitogen-induced proliferation of spleen and suppress cell and humoral immune response to T-dependent antigen. Thus the reaction depends on experimental animal sex. It has been also found that the regular trainings promote B-lymphocyte polyclonal activation in animals of both sexes. IgG concentration increase in peripheral blood and the increasing spontaneous IgG production with marrow and spleen cells in vitro are expressed too. It is supposed that B-lymphocyte activation may be stipulated by production of muscle tissue stimulating factors.

Физические нагрузки оказывают выраженное влияние на все функциональные системы организма. Иммунная система реагирует на изменение физической активности с первых минут резким перераспределением клеток в организме (так называемый лейкоцитоз физических упражнений) [10]. Дальнейшие реакции зависят от интенсивности, длительности, вида нагрузок и представляют собой широкий спектр самых разнообразных проявлений — от стимуляции защитных реакций до резкого угнетения иммунитета. Данные о влиянии физических нагрузок на иммунологические показатели весьма противоречивы и не позволяют получить ясное представление об ответной реакции иммунной системы на изменение физической активности [4, 9, 13, 16].

В настоящей работе исследовано влияние регулярных физических тренировок на состояние иммунной системы экспериментальных животных.

**Материалы и методы.** В опытах использовали мышей-гибридов (СВАхС57ВL/6)F<sub>1</sub> (СВF<sub>1</sub>) — самцов и самок в возрасте 2 мес, полученных из питомника "Рассвет" (Томск). Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

В качестве модели физических тренировок умеренной интенсивности было выбрано плавание без груза в ванне размерами 60 × 30 × 20 см при температуре воды 33—35°С в течение 2 ч 5 дней в неделю на протяжении 4 мес. Время плавания увеличивали постепенно в течение 2 нед начиная с 15-минутных процедур. Оценку иммунологических показателей проводили на следующий день после окончания тренировок. Контрольной группой служили животные такого же генотипа, пола и возраста, что и подопытные мыши, и содержались в стандартных условиях вивария.

У мышей определяли массу тела и правого надпочечника; массу лимфоидных органов или количество клеток в них; количество клеток костного мозга и лейкоцитов в периферической крови. Выделение органов и клеток выполняли по стандартным методикам [1].

Уровень клеточных и гуморальных иммунных реакций in vivo оценивали по ответу на Т-зависимый антиген — эритроциты барана (ЭБ). Первичный и вторичный гуморальный иммунный ответ тестировали на пике ответа, свойственном данному генотипу, по количеству антителообразующих клеток (IgM-АОК и IgG-АОК) в селезенке методом локального гемолиза после внутривенного введения 2 · 10<sup>8</sup> ЭБ [8, 18]. Клеточный иммун-

Масса тела, надпочечников, масса или количество клеток лимфоидных органов мышей СВF<sub>1</sub> при физических нагрузках

Показатель	Самцы		Самки	
	контроль	плавание	контроль	плавание
Масса тела, г	29,4 (26,8—32,7)	28,3 (25,3—30,6)	23,2 (21,4—25,3)	22,9 (20,2—26,8)
Масса тимуса, мг	26,8 (18—34)	25,3 (15—38)	49,5 (40—61)	42,3* (31—63)
Масса лимфатического узла, мг	3,7 (1,5—6)	4,8 (2,5—11)	3,8 (3—4,5)	3,2 (2—5)
Масса надпочечника, мг	3,4 (2—6)	4,6* (4—7)	5,4 (3—7,5)	6,3 (4—9)
Количество клеток периферической крови, · 10 <sup>6</sup> клеток/мл	4,2 (1,6—7,4)	5,7 (3—8,6)	7,8 (4—14,8)	9,2 (4,2—16,7)
Количество клеток селезенки, · 10 <sup>6</sup>	89,1* (57—133,5)	111,2* (69—167)	203,6 (131—238)	297,4 (209—356)
Количество клеток костного мозга, · 10 <sup>6</sup> /бедро	7,0 (2,7—11,1)	7,7 (3,2—15)	6,2 (2,6—9,8)	5,9 (3,5—7,7)

Примечание. Представлены средние значения показателей (M), в скобках — пределы колебаний. В каждой группе n = 11. Крестик — подсчет клеток проводили после 3 отмывок. Звездочка — p < 0,05.

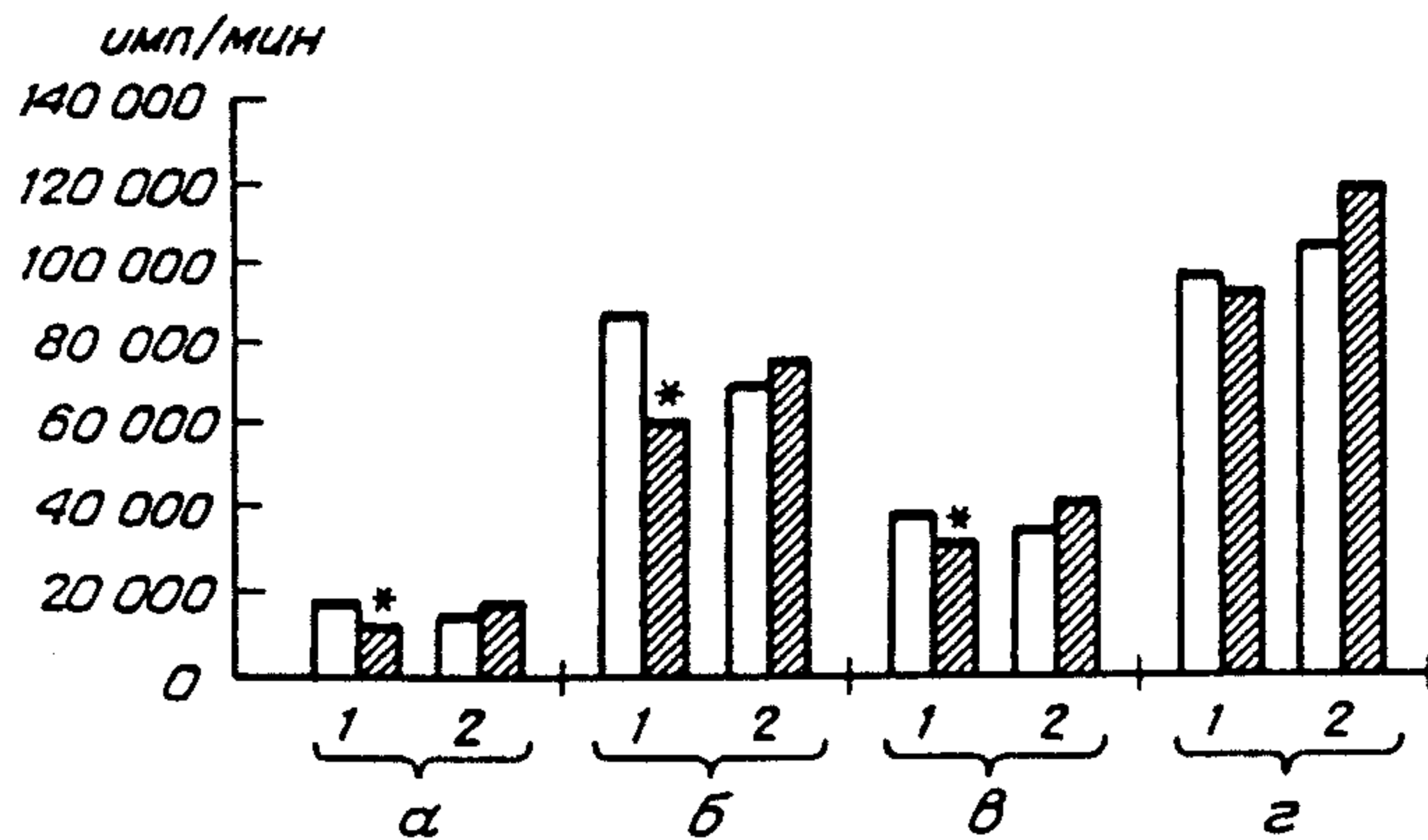


Рис. 1. Пролиферативная активность клеток селезенки.

По оси ординат — число импульсов в 1 мин. а — спонтанная активность; б — LPS-индуцированная; в — PWM-индуцированная; г — ConA-индуцированная (для каждой группы  $n = 8$ ). 1 — самцы, 2 — самки. Здесь и на рис. 2–5: белые столбцы — контроль; заштрихованные — мыши-пловцы.

ный ответ — реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) оценивали по величине отека после введения разрешающей дозы  $5 \cdot 10^8$  ЭБ под апоневроз стопы задней лапы животным, предварительно сенсибилизированным в дозе  $2,5 \cdot 10^7$  ЭБ внутривенно [19].

Культивирование клеток селезенки и костного мозга ( $10^5$  клеток на лунку) проводили в круглодонных 96-луночных планшетах для культивирования в объеме 160 мкл при  $37^\circ\text{C}$  в атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$  в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин,  $4 \cdot 10^{-2}$  мМ 2-меркаптоэтанола, 10 мМ HEPES, 50 мкг/мл гентамицина.

Пролиферативный ответ спленоцитов на T- и B-клеточные митогены (ConA, PWM, LPS *E. coli* 055:B5) ("Sigma") оценивали по включению  $^3\text{H}$ -тимидина, который вносили за 18 ч до конца культивирования в дозе 37 кБк на лунку. Оптимальные дозы ConA, PWM и LPS *E. coli*, определенные в предварительных опытах, составили соответственно 2, 1 и 15 мкг/мл. Подсчет радиоактивности проводили в жидкостном сцинтилляционном счетчике SL-30 ("Intertech", Франция). Результаты выражали в импульсах в 1 мин.

Спонтанную и LPS-стимулированную продукцию IgG клетками селезенки и костного мозга определяли в супернатантах клеточных культур после культивирования в течение 7 дней. Оптимальная доза LPS *E. coli*, определенная в предварительных опытах, составила 30 мкг/мл. Результаты выражали в микрограммах на 1 мл.

Концентрацию IgG в периферической крови и супернатантах культур определяли твердофазным вариантом метода иммуноферментного анализа в 96-луночных плоскодонных планшетах (E. I. A. "Linbro") с помощью конъюгата, меченного пероксидазой хрена; в качестве субстрата использовали о-фенилендиамин [3]. Интенсивность реакции оценивали на многоканальном спектрофотометре "Multiskan" при  $\lambda = 492$  нм. Калибровочную кривую строили по препарату IgG (10–100 нг/мл) ("Sigma"). Результаты выражали в миллиграммах на 1 мл для периферической крови и в микрограммах на 1 мл для супернатантов клеточных культур.

Содержание кортикостерона в сыворотке мышей определяли методом конкурентного белкового связывания [5].

Содержание гемоглобина в крови определяли гемихромным методом с помощью тест-системы "Гемоглобин-Ново" ("Вектор-Бест", пос. Кольцово).

Для анализа полученных результатов использовали непараметрический критерий U Вилкоксона—Манна—Уитни. Определяли среднее ( $M$ ), минимальное и максимальное значения. Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Регулярные продолжительные физические тренировки умеренной интенсивности не вызвали резких изменений массы и количества клеток лимфоидных органов. Наблюдались лейкоцитоз в периферической крови и возрастание количества клеток в селезенке; эти изменения проявлялись у животных обоего пола, однако не достигали уровня достоверности. Отмечено небольшое снижение массы тимуса, достоверное у самок (см. таблицу).

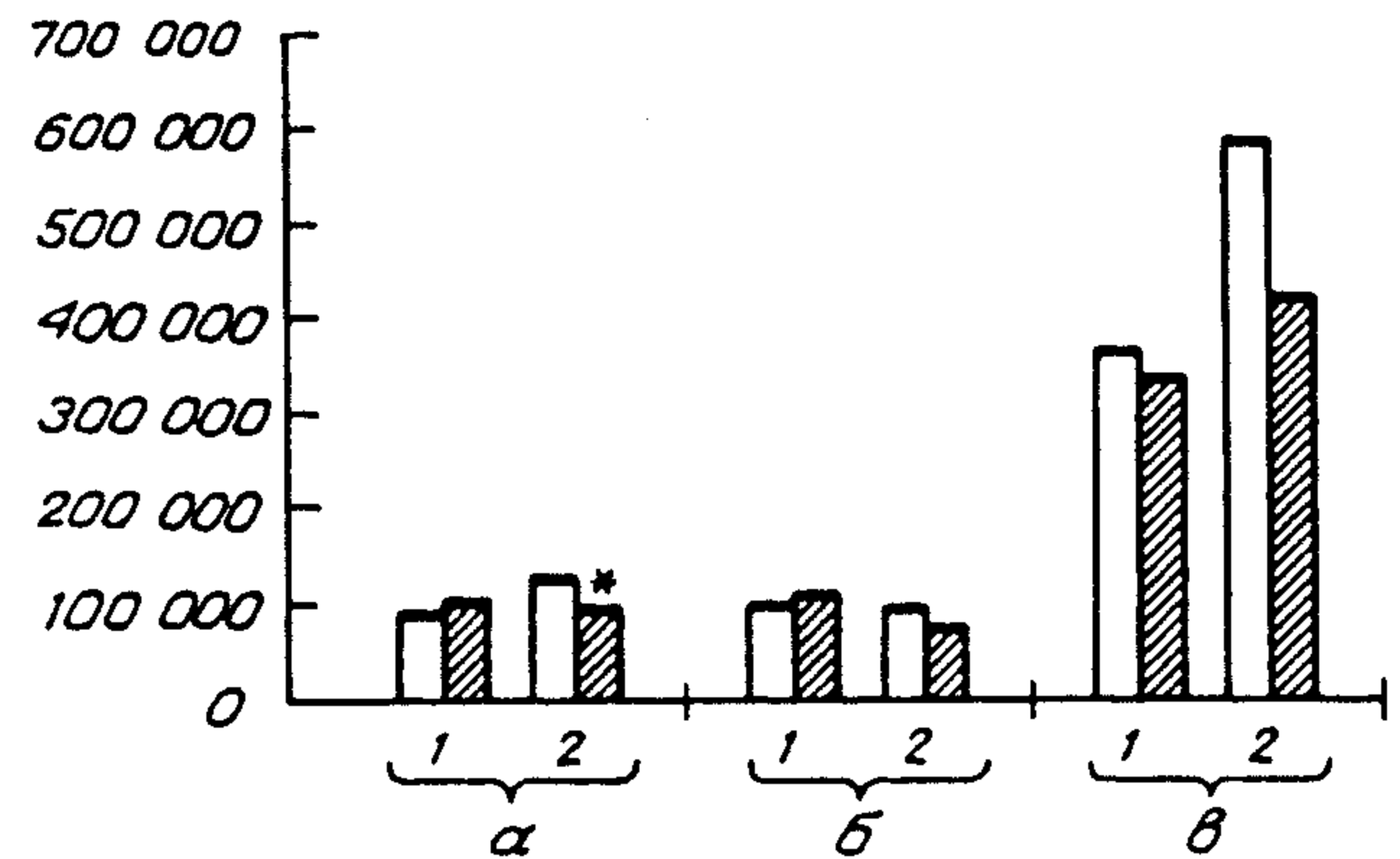


Рис. 2. Величина гуморального иммунного ответа на ЭБ.

По оси ординат — количество АОК в селезенке. а — первичный IgM-ответ (в группе самцов в контроле  $n = 14$ , в опыте  $n = 12$ ; в группе самок в контроле  $n = 13$ , в опыте  $n = 14$ ); б — первичный IgG-ответ (в группе самцов в контроле  $n = 17$ , в опыте  $n = 12$ ; в группе самок в контроле  $n = 20$ , в опыте  $n = 15$ ); в — вторичный IgG-ответ (в группе самцов в контроле  $n = 14$ , в опыте  $n = 13$ ; в группе самок в контроле  $n = 13$ , в опыте  $n = 14$ ). 1 — самцы, 2 — самки.

Плавание является стрессорным воздействием для экспериментальных животных, особенно в первые дни тренировок. Условия проведения эксперимента мы подбирали с намерением максимально снять этот фактор: время плавания увеличивали постепенно; продолжительность экспериментов составляла 4 мес, так что животные могли привыкнуть к процедуре; тренировки были умеренной интенсивности (мыши способны плавать при использованной в опытах температуре воды довольно долго — более 6 ч). Тем не менее регулярные тренировки вызвали увеличение массы надпочечников, достигавшее уровня достоверности у самцов, хотя определение содержания кортикоостерона в плазме крови не выявило его достоверного повышения (53,8 и 67,7 нг/мл соответственно в контрольной и опытной группах). Этот факт, а также некоторое снижение массы тимуса, достоверное у самок, свидетельствуют о напряжении адаптивных реакций, вызванном физическими нагрузками.

Поскольку физические нагрузки, предъявляя повышенные требования к снабжению органов и тканей, в первую очередь мышечной, кислородом, не могут не затрагивать кроветворную систему, представлялось необходимым проконтролировать состояние гемопоэза при физических тренировках. У мышей-пловцов и контрольных животных оценивали концентрацию гемоглобина в периферической крови. Обнаруженное достоверное увеличение содержания гемоглобина на 14,1% у самцов ( $p < 0,05$ ) и на 16,4% у самок ( $p < 0,05$ ) отражает адекватность реакции организма животных, подвергавшихся регулярным тренировкам, и отсутствие истощения кроветворной системы при выбранном режиме физической нагрузки.

Регулярные тренировки изменяли функциональную активность лимфоидных клеток, определяемую в опытах *in vitro*, при этом спонтанная и митогениндуцированная пролиферация у самцов снижалась, в то время как у самок наблюдалась незначительная стимуляция реакции (рис. 1).

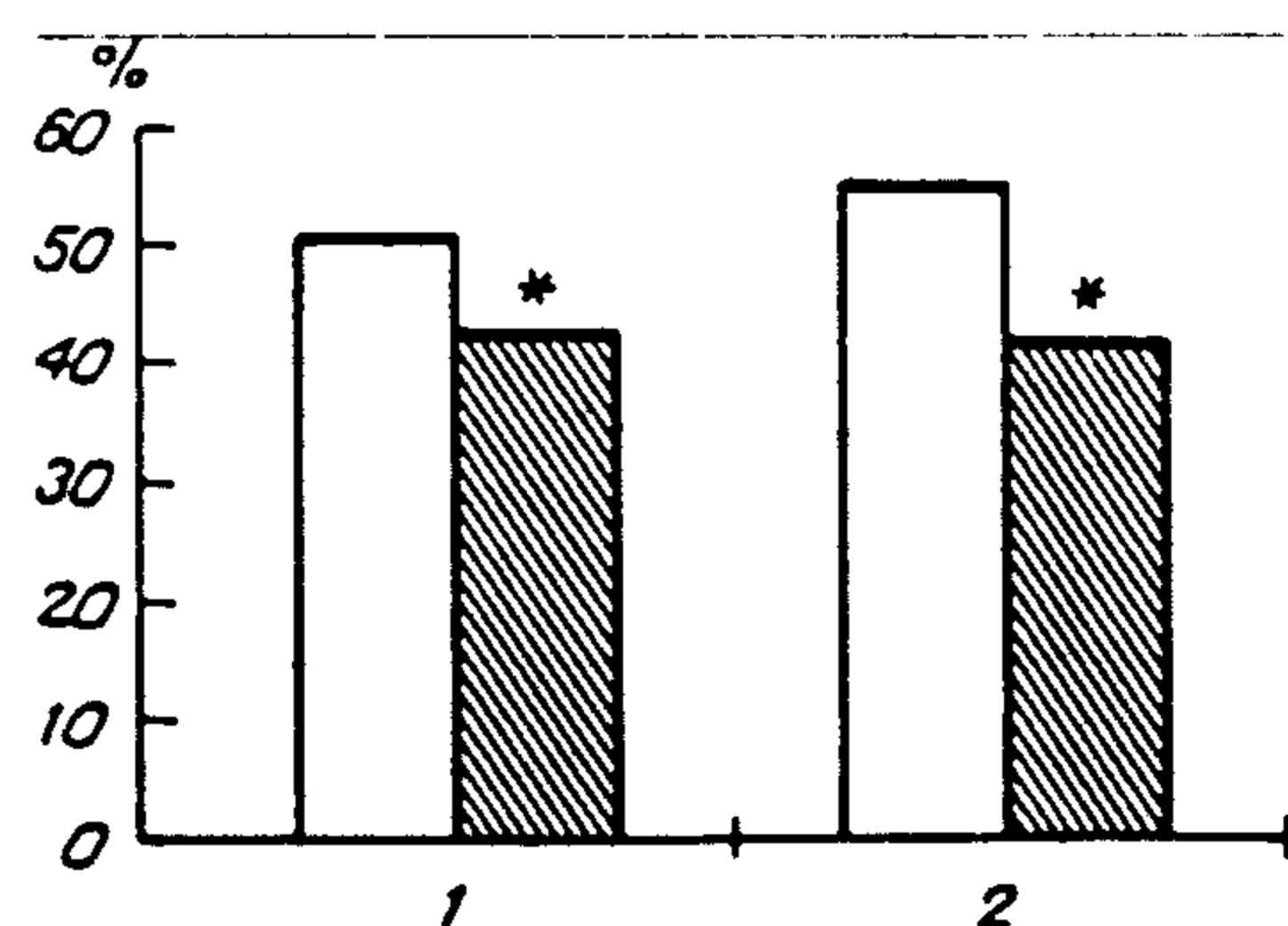


Рис. 3. Интенсивность реакции ГЗТ (в %) при ответе на ЭБ.

1 — самцы (в контроле  $n = 18$ , в опыте  $n = 13$ ); 2 — самки (в контроле  $n = 18$ , в опыте  $n = 15$ ).

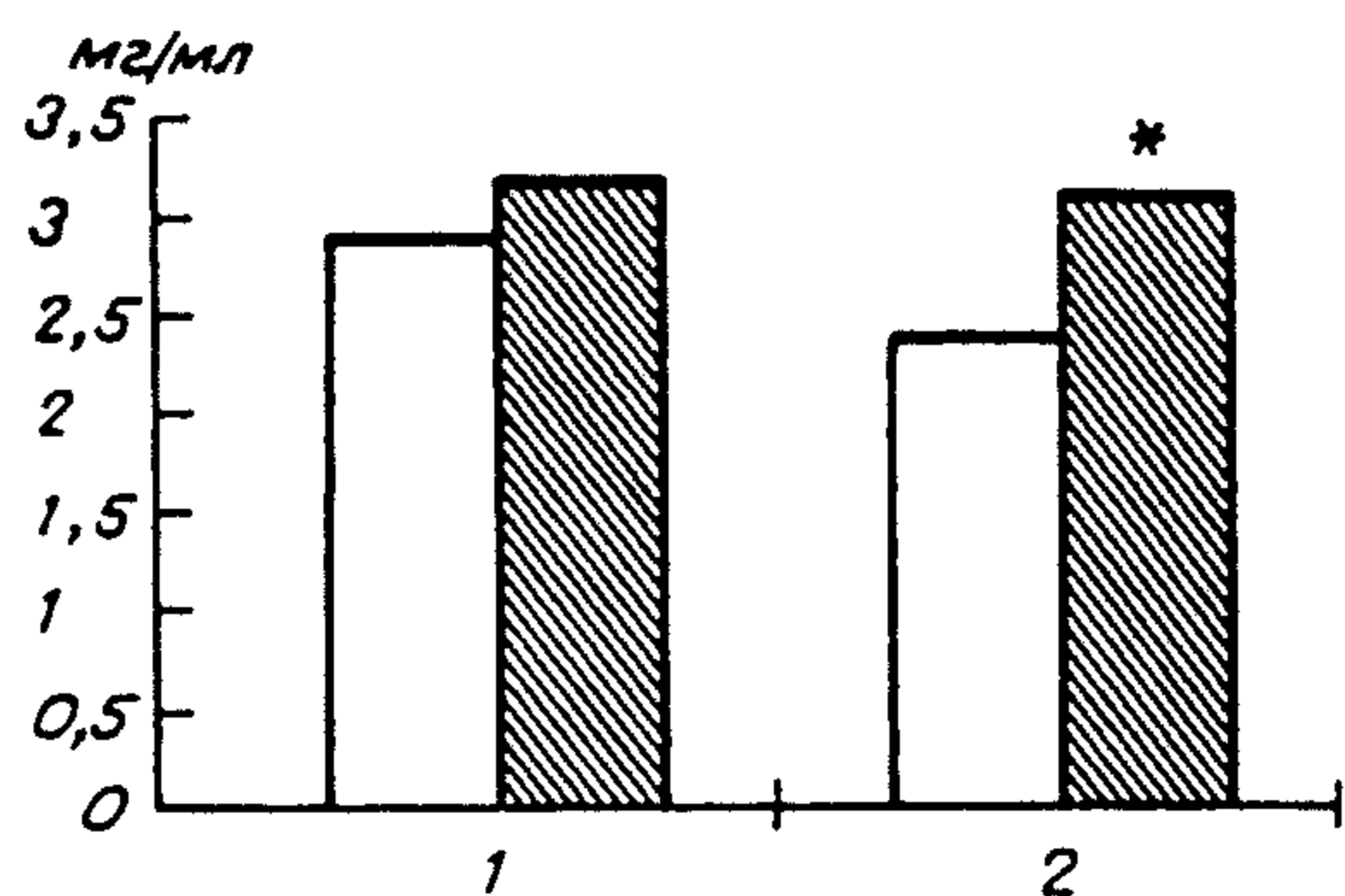


Рис. 4. Уровень IgG в периферической крови (в мг/мл).  
1 — самцы (в контроле  $n = 13$ , в опыте  $n = 15$ ); 2 — самки (в контроле  $n = 15$ , в опыте  $n = 15$ ).

Для оценки интегрального эффекта физических нагрузок на иммунную систему мы изучали влияние плавания на иммунный ответ *in vivo* (рис. 2 и 3). Как следует из представленных данных, регулярные физические нагрузки в указанном режиме подавляли реакцию клеточного типа — ГЗТ, а также первичный гуморальный IgM-ответ (последнее наблюдалось только у самок), не влияя достоверно на число IgG-АОК в селезенке как при первичном, так и при вторичном ответе.

Измерение концентрации IgG, который составляет большую часть иммуноглобулинов в периферической крови, выявило повышение его содержания в сыворотке мышей-пловцов (рис. 4), при этом значение данного параметра начинало возрастать только после довольно длительного периода тренировок (через 2 мес). В связи с этим была изучена продукция IgG клетками селезенки, а также костного мозга, который вносит значимый вклад в общий пул иммуноглобулинов организма.

Из представленных на рис. 5 данных видно, что у мышей-пловцов наблюдалось возрастание спонтанной продукции IgG

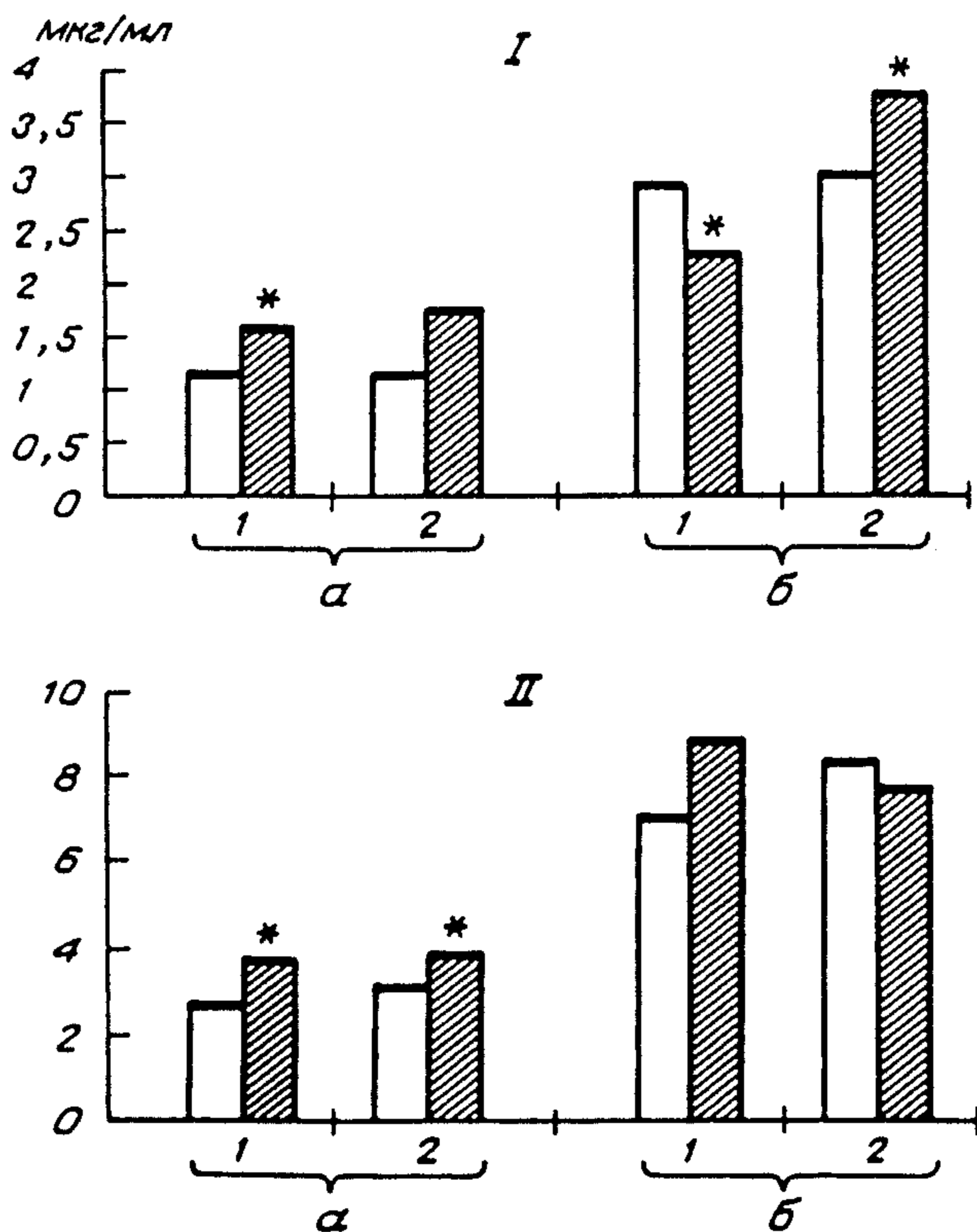


Рис. 5. Продукция IgG (в мкг/мл) клетками костного мозга и селезенки в культуре *in vitro*.  
I — клетки костного мозга (для каждой группы  $n = 6$ ); II — клетки селезенки (для каждой группы  $n = 10$ ). 1 — самцы; 2 — самки.

клетками селезенки и костного мозга. LPS-стимулированный синтез IgG изменялся по-разному в зависимости от источника клеток — селезенка или костный мозг, а также половой принадлежности животных. Так, LPS-стимулированное образование иммуноглобулинов клетками костного мозга снижалось у самцов и возрастало у самок. Изменения уровня продукции IgG клетками селезенки были менее выраженными и имели противоположный характер.

Таким образом, регулярные физические тренировки умеренной интенсивности оказывают значимое влияние на функциональные характеристики иммунной системы: снижают пролиферативную активность лимфоидных клеток, подавляют клеточный и (в меньшей степени) гуморальный иммунный ответ. При этом во многих случаях реакция иммунной системы на физические тренировки имеет явную зависимость от пола экспериментальных животных.

Изменения В-лимфоцитарного звена свидетельствуют о поликлональной активации В-клеток. На это указывают повышенные уровни IgG в периферической крови, усиление спонтанного синтеза IgG клетками костного мозга и селезенки в культуре. В поддержку предположения о поликлональной активации может свидетельствовать и снижение ответа В-клеток как *in vivo*, так и *in vitro*: известно, что поликлональная активация приводит к снижению ответа на последующие стимулы [7, 15, 17].

В литературе нет однозначных и четких данных о влиянии физических нагрузок на содержание иммуноглобулинов в периферической крови. В основном показано снижение концентрации IgA в секреторных жидкостях организма у спортсменов [9, 13]. Регулярные физические тренировки, как правило, приводят к гипертрофии мышечной ткани, которая является продуцентом некоторых цитокинов, в том числе ИЛ-6 и ИЛ-15 [11]. Действие ИЛ-6 как фактора, стимулирующего развитие В-лимфоцитов, хорошо известно (первоначальное название этого цитокина "B cell stimulating factor", BCSF-2, говорит само за себя). ИЛ-15 является необходимым фактором развития популяции НКТ-клеток, продуцирующих ИЛ-4 [14]. Возможно, эта цепочка событий и является тем механизмом, который вызывает поликлональную активацию В-лимфоцитов, что в свою очередь может приводить к снижению гуморального иммунного ответа.

Регулярные тренировки стимулируют кроветворение, что сопровождается увеличением количества клеток селезенки, у грызунов и во взрослом состоянии участвующей в эритропоэзе [6]. Возможно, активация процессов эритропоэза в селезенке наряду с поликлональной активацией В-клеток является фактором, подавляющим развитие гуморального иммунного ответа [2].

Еще одним механизмом ингибирующего влияния физических нагрузок на иммунные реакции может быть изменение гормонального баланса в организме при возросшем уровне физической активности. В частности, при физических нагрузках показано увеличение уровня тестостерона, который оказывает ингибирующее влияние на многие реакции иммунной системы [12].

**Выводы**

1. Регулярные физические нагрузки подавляют спонтанную и митогениндуцированную пролиферацию клеток селезенки.
2. Регулярные физические нагрузки снижают иммунный ответ на Т-зависимый антиген в опытах *in vivo*.
3. Регулярные физические нагрузки приводят к поликлональной активации В-лимфоцитов, что выражается в возрастании концентрации IgG в периферической крови и его увеличенной спонтанной продукции клетками костного мозга и селезенки *in vitro*.
4. Реакция иммунной системы на регулярные физические нагрузки умеренной интенсивности зависит от пола экспериментальных животных.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Гальдберг Е. Д., Дыгай А. М., Шахов В. П. Методы культуры тканей в гематологии. — Томск, 1992.
2. Козлов В. А., Журавкин И. Н., Цырлова И. Г. Стволовая кроветворная клетка и иммунный ответ. — Новосибирск, 1982.
3. Кэйти Д., Райкундалия Ч. Получение поликлональных антител и контроль их качества // Антитела. Методы. — М., 1991. — Кн. 1. — С. 33—115.
4. Першин Б. Б., Кузьмин С. Н. Стресс, вторичные иммунодефициты и заболеваемость. — М., 1994.
5. Тинников А. А., Бажан Н. М. // Лаб. дело. — 1984. — № 12. — С. 709—713.

6. Фриденштейн А. Я., Лурия Е. А. Клеточные основы кровяного микроокружения. — М., 1980.
7. Chirmule N., Saxinger C., Pahwa S. // FEMS Microbiol. Immunol. — 1989. — Vol. 1. — P. 271—278.
8. Cunningham A. J., Szenberg A. // Immunology. — 1968. — Vol. 14. — P. 599—600.
9. Gleeson M. // Exercise Immunol. Rev. — 2004. — Vol. 10. — P. 5—42.
10. Hoffman-Goetz L., Pedersen B. K. // Immunol. Today. — 1994. — Vol. 15. — P. 382—387.
11. Malm Ch. // Exercise Immunol. Rev. — 2002. — Vol. 8. — P. 116—167.
12. Muehlenbein M. P., Bribiescas R. G. // Am. J. Hum. Biol. — 2005. — Vol. 17. — P. 527—558.
13. Nieman D. C. Prolonged aerobic exercise, immune response, and risk of infection // Exercise and Immune Function / Ed. L. Hoffman-Goetz. — Boca Raton, 1996. — P. 143—161.
14. Ohteki T. // Curr. Mol. Med. — 2002. — Vol. 2. — P. 371—380.
15. Pahwa S., Pahwa R., Saxinger C. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 1985. — Vol. 82. — P. 8198—8202.
16. Pedersen B. K., Nieman D. C. // Immunol. Today. — 1998. — Vol. 19. — P. 204—206.
17. Schetters T. P., van Run-van Breda J. H., van de Wiel T. et al. // Parasite Immunol. — 1989. — Vol. 11. — P. 519—528.
18. Sterzl J., Riha I. // Nature. — 1965. — Vol. 208. — P. 858—859.
19. Yoshikai Y., Miake S., Matsumoto T. et al. // Immunology. — 1979. — Vol. 8. — P. 577—583.

Поступила 28.07.06