

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ ОСНОВНЫХ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ ЦИТОКИНОВ У ВЫСОКОКВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ, СПЕЦИАЛИЗИРУЮЩИХСЯ ПО ВИДУ СПОРТА «ПЛАВАНИЕ»

## MOLECULAR-GENETIC STUDY OF PECULIARITIES OF FUNCTIONING OF BASIC IMMUNOREGULATORY CYTOKINES IN HIGHLY QUALIFIED ATHLETES BY THE SPORT «SWIMMING»

**E. Galimova**  
**G. Galikeeva**  
**A. Galimov**  
**R. Gubaidullina**  
**G. Khasbatullina**

*Summary.* In this work, we studied serum concentrations and mitogen-induced production of pro- and anti-inflammatory cytokines and C-reactive protein by cells of whole blood ex vivo in highly qualified athletes specializing in the sport of "swimming". We also analyzed the associations of polymorphic markers of the genes of the interleukin-1 cluster IL-1 $\beta$  (rs1143634) and (VNTR-polymorphism 86 bp) with the mean values of the quantitative indicators of IL-1 $\beta$  and IL1RA in carriers of various genotypes. It was found that the serum concentration of pro-inflammatory cytokines (IL1RA and IL6) in athletes — swimmers is significantly lower in comparison with the control group. Mitogen induction of proinflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL1RA in athletes showed positive dynamics, the mitogenic stimulation index was 6.43 and 2.78, respectively, which indicates a positive reactivity of the immune system. Correlations were revealed for the cytokines IL4 / IL10 ( $r = 0.74$ ), IL6 / IL10 ( $r = 0.54$ ), IL6 /  $\alpha$ -TNF ( $r = 0.69$ ). Analysis of associations of polymorphic markers of genes of the interleukin-1 family (IL-1 $\beta$  (rs1143634) and (VNTR-polymorphism 86 bp)) with the mean values of the quantitative indicators of IL-1 $\beta$  and IL1RA in the blood serum in carriers of different genotypes revealed an association of increased concentration of IL-1 $\beta$  with allele \* E2 of the IL-1 $\beta$  gene ( $p = 0.05$ ) and the association of low IL-1 $\beta$  values with the IL1RA \* I allele ( $p = 0.04$ ), as well as association of the genotype IL1RA \* II / \* II with a high level of IL-1 $\beta$  ( $p = 0.04$ ).

*Keywords:* cytokines, mitogen induction, stress response, gene polymorphism, exercise, immunity.

**Галимова Эльвира Мансуровна**

К.б.н., доцент, ФГБОУ ВО «Башкирский  
государственный педагогический университет  
им. М. Акмуллы» (Уфа)  
vemgen@gmail.com

**Галикеева Гузель Фанилевна**

К.б.н., доцент, ФГБОУ ВО «Башкирский  
государственный педагогический университет  
им. М. Акмуллы» (Уфа)  
galikeevagf@yandex.ru

**Галимов Азат Мусавирович**

Старший преподаватель, ФГБОУ ВО «Уфимский  
государственный нефтяной технический  
университет» (Уфа)  
Azat13Galimov@gmail.com

**Губайдуллина Рината Ильшатовна**

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный  
педагогический университет им. М. Акмуллы» (Уфа)  
regi.mi@yandex.ru

**Хасбатуллина Гульназ Венеровна**

ФГБОУ ВО «Башкирский государственный  
педагогический университет им. М. Акмуллы» (Уфа)  
khasbatullina@yandex.ru

*Аннотация.* В работе проведено изучение сывороточных концентраций и митоген-индуцированной продукции клетками цельной крови ex vivo про- и противовоспалительных цитокинов и С-реактивного белка у высококвалифицированных спортсменов, специализирующихся по виду спорта «плавание». Также проведен анализ ассоциаций полиморфных маркеров генов кластера интерлейкин-1 IL-1 $\beta$  (rs1143634) и (VNTR- полиморфизм 86 bp) со средними значениями количественных показателей IL-1 $\beta$  и IL1RA у носителей различных генотипов. Установлено, что сывороточная концентрация провоспалительных цитокинов (IL1RA и IL6) у спортсменов — пловцов достоверно ниже в сравнении с группой контроля. Митоген-индукция провоспалительных цитокинов IL-1 $\beta$  и IL1RA у спортсменов показала положительную динамику, индекс митогенной стимуляции составил 6,43 и 2,78 соответственно, что говорит о положительной реактивности иммунной системы. Выявлены корреляционные связи для цитокинов IL4/IL10 ( $r=0,74$ ), IL6/IL10 ( $r=0,54$ ), IL6/ $\alpha$ -TNF ( $r=0.69$ ).

Анализ ассоциаций полиморфных маркеров генов семейства интерлейкин-1 (IL-1 $\beta$  (rs1143634) и (VNTR- полиморфизм 86 bp)) со средними значениями количественных показателей IL-1 $\beta$  и IL1RA в сыворотке крови у носителей различных генотипов выявил ассоциацию повышенной концентрации IL-1 $\beta$  с аллелем \*E2 гена IL-1 $\beta$  ( $p=0,05$ ) и ассоциацию низких



Спорт высших достижений сопровождается сверхинтенсивными физическими и эмоциональными нагрузками, как во время тренировочного процесса, так и в соревновательный период. Исследования последних десятилетий показали, что у спортсменов высокоинтенсивные тренировки влияют на показатели иммунитета [2, 6]. К одним из важных иммунорегуляторных веществ относят цитокины, эти биологически активные молекулы способны регулировать межклеточные и межсистемные взаимодействия, влиять на дифференциацию и апоптоз клеток, стимулировать либо же подавлять рост клеток, а также влиять на работу жизненно важных систем организма (иммунной, эндокринной, нервной) в нормальных условиях и в ответ на патологические воздействия [1, 3, 14]. Считается, что сверхинтенсивная физическая активность может повышать продукцию цитокинов иммункомпетентными клетками как провоспалительного (IL1, IL2, IL5, IL6, IL8,  $\alpha$ -TNF), так и противовоспалительного ряда (IL4, IL10) [7, 10, 13]. Имеются данные, что у спортсменов в результате острого и хронического перенапряжения повышается сывороточная концентрация цитокинов, так увеличение уровня IL6 сопровождается появлением усталости, а повышение концентрации TNF- $\alpha$  может спровоцировать появлению микротравм мышечных волокон [9, 11, 15].

Количественное определение уровня концентраций цитокинов в сыворотке крови отражают лишь состояние иммунной системы на данный момент, тогда как в ситуациях, сопряженных с дефицитом или дисбалансом регуляторных факторов, необходимо оценить способность клеток крови к секреции цитокинов. При этом спонтанная продукция цитокинов свидетельствует о том, насколько клетки крови уже активированы *in vivo*, митоген-индуцированная — позволяет оценить потенциальную способность клеток-продуцентов к секреции цитокинов. Учитывая результаты исследований, свидетельствующих о повышении уровня цитокинов при интенсивных физических упражнениях и недостаточную изученность спонтанной и митоген-индуцированной продукции цитокинов перед нами была поставлена **цель** — провести анализ спонтанной продукции цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL1RA, IL4, IL10, IL6,  $\alpha$ -TNF), белка острой фазы (CRP) и митоген-индуцированной продукции цитокинов клетками крови *ex vivo* (IL-1 $\beta$ , IL1RA, IL4) у спортсменов, специализирующихся по виду спорта «плавание». А также провести анализ

значений IL-1 $\beta$  с аллелем IL1RA\*1 ( $p=0,04$ ), а также ассоциацию гомозиготного генотипа IL1RA\*II/\*II с высоким уровнем IL-1 $\beta$  ( $p=0,04$ ).

**Ключевые слова:** цитокины, митоген-индукция, стресс-реакция, полиморфизм гена, физическая нагрузка, иммунитет.

ассоциаций полиморфных маркеров генов кластера интерлейкина-1 (IL-1 $\beta$  (*rs1143634*) и IL1RA (*VNTR86 bp*)) со средними значениями количественных показателей IL-1 $\beta$ , IL1RA в сыворотке крови у носителей различных генотипов.

## Материалы и методы

Обследовано 56 человек, средний возраст которых составил 23 года. Исследования проводились среди высококвалифицированных спортсменов — пловцов (28 человек) в период интенсивных нагрузок тренировочного микроцикла. Группа контроля состояла из 28 условно-здоровых индивидов, активно не занимающихся спортом. Чтобы исключить лиц с острым или хроническим воспалительным процессом при котором могут быть изменены показатели цитокинов, нами был определен общеклинический анализ крови на скорость оседания эритроцитов (СОЭ) по методу Панченкова.

Забор венозной крови проводили утром натощак, с информированного согласия. Спортсмены на момент исследования были практически здоровы. Для оценки спонтанной и митоген-индуцированной продукции цитокинов клетками крови *ex vivo* использовался набор «ЦИТОКИН — СТИМУЛ — БЕСТ» фирмы ЗАО «ВЕКТОР-БЕСТ» (Новосибирск, Россия), представляющий собой комплект, основными компонентами которого являются стерильная среда и комплексный митоген — смесь лиофилизированных поликлональных активаторов. Цитокиновый профиль (IL-1 $\beta$ , ILRA, IL4, IL10, IL6,  $\alpha$ -TNF) и белок острой фазы (CRP) оценивали иммуноферментным методом (ИФА).

Для более точной оценки резервных возможностей продукции цитокинов мононуклеарными клетками рассчитывался индекс митогенной стимуляции, который высчитывался как соотношение индуцированного синтеза к спонтанной продукции.

Из периферической крови у обследованных лиц была выделена ДНК с помощью метода фенольно-хлороформной экстракции [12]. Амплификацию изученных локусов проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) на амплификаторе «Терцик». Разделение продуктов амплификации проводили электрофоретическим методом в полиакриламидном геле.

Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета программ SPSS17.0 для Windows. Проверку нормальности распределения количественных признаков проводили с помощью критерия Колмогорова–Смирнова; равенство выборочных средних проверяли по параметрическому t-критерию Стьюдента. Корреляционный анализ количественных величин проводили с вычислением коэффициента корреляции Пирсона.

### Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования был проведен общеклинический анализ крови на скорость оседания эритроцитов (СОЭ) по методу Панченкова, с целью исключения индивидов с острым или хроническим воспалительным процессом. Этот неспецифический лабораторный показатель крови имеет очень важное диагностическое значение, так как он может служить косвенным признаком текущего воспалительного или иного патологического процесса. Повышенная СОЭ наблюдается при большинстве воспалительных и инфекционных заболеваний.

В группе спортсменов значения СОЭ составили  $0,25 \pm 0,25$  мм/ч и в группе контроля  $1,25 \pm 0,25$  мм/ч, данные референсные значения находились в пределах физиологической нормы [4]. Полученные данные свидетельствовали об отсутствии активного воспалительного процесса на момент забора биологического материала.

Вторым этапом исследования явилось проведение сравнительного анализа спонтанной (для IL-1 $\beta$ , IL1RA, IL4, IL10, IL6,  $\alpha$ -TNF, CRP) и митоген-индуцированной продукции цитокинов (для IL-1 $\beta$ , IL1RA, IL4) между группой спортсменов-пловцов и группой контроля (таблица 1).

Сывороточная-спонтанная продукция провоспалительного цитокина интерлейкин -1 (IL-1 $\beta$ ) у спортсменов не показала статистически достоверных различий, тогда как митоген-индуцированная продукция превышала значения контрольной группы в 4,1 раз и индекс митогенной стимуляции у спортсменов составил 6,43 против 0,33 в группе контроля.

При анализе концентрации рецепторного антагониста интерлейкина-1 (IL1Ra) выявлено достоверное повышение спонтанной продукции в группе контроля ( $p=0,013$ ), митоген-стимуляция показала интересные данные, у спортсменов индекс митогенной стимуляции составил 2,78, а в группе контроля митоген-стимуляция наоборот вызвала подавление выработки IL1Ra

и индекс митогенной стимуляции составил 0,52, таким образом потенциальную способность к секреции цитокинов у спортсменов можно оценить как высокую. Повышение индуцированной продукции IL-1 $\beta$  и IL1Ra у спортсменов-пловцов по сравнению с группой контроля свидетельствует об активации циркулирующих клеток крови и выраженном усилении их способности секретировать провоспалительные цитокины.

Сравнительный анализ продукции IL6 показал, что у спортсменов-пловцов по сравнению с контрольной группой снижена его сывороточная концентрация (в 2,3 раза,  $p=0,014$ ), референсные значения IL6 находились в пределах  $142,73 \pm 69,7025$ , в группе контроля  $334,298 \pm 32,5$ . Высокий уровень интерлейкина-6 у неактивных людей, по мнению некоторых авторов, является показателем хронического воспаления [1, 5].

Анализ спонтанной продукции C-реактивного белка (CRP) не выявил достоверно значимых изменений в исследуемых выборках.

При проведении корреляционного анализа изучаемых показателей у спортсменов-пловцов были установлены прямые взаимосвязи между спонтанной продукцией противовоспалительных цитокинов IL4 и IL10 ( $r=0,74$ ;  $p=0,04$ ). Спонтанная секреция противовоспалительного цитокина IL10 прямо коррелировала со спонтанной продукцией провоспалительного цитокина IL6 ( $r=0,54$ ;  $p=0,01$ ). Такую корреляцию можно объяснить тем, что IL10 способен ингибировать иммунный ответ по TNF-пути, подавляя выработку провоспалительных цитокинов [5].

Кроме того, спонтанная секреция IL6 и  $\alpha$ -TNF также была тесно взаимосвязана между собой ( $r=0,69$ ;  $p=0,002$ ). Согласно литературным данным эти цитокины проявляют синергичные взаимоусиливающие эффекты [5]. Слабые однонаправленные взаимосвязи отмечены между IL-1 $\beta$  и IL1RA ( $r=0,46$ ,  $p=0,05$ ), что объясняется ролью рецепторного антагониста IL1, способного ингибировать выработку IL-1 $\beta$  посредством связывания с клеточным рецептором интерлейкина-1 первого типа. Также была выявлена взаимосвязь митоген-индуцированной продукции IL1Ra/ IL4 ( $r=0,73$ ;  $p=0,03$ ). Рецепторный антагонист интерлейкина-1 связываясь с клеточным рецептором, влияет на его конформационные изменения, приводящие к трансдукции сигнала внутрь клетки, таким образом, подавляя активность провоспалительного интерлейкина-1. Вероятно, что IL1Ra в тандеме с IL4 выполняют противовоспалительную функцию.

На следующем этапе мы провели анализ ассоциаций полиморфных маркеров генов семейства интерлей-

кин-1 (*IL-1β* (*rs1143634*) и (*VNTR*- полиморфизм *86 bp*)) со средними значениями количественных показателей *IL-1β* и *IL1RA* в сыворотке крови у носителей различных генотипов. В группе контроля была обнаружена ассоциация повышенной концентрации *IL-1β* с «мутантным» по литературным данным аллелем \**E2* гена *IL-1β* ( $p=0,05$ ), усиливающим экспрессию гена и как следствие продукцию этого цитокина [8] и ассоциация низких значений *IL-1β* с аллелем *IL1RA\*1* ( $p=0,04$ ).

Также в группе контроля было обнаружено, что гомозиготный генотип *IL1RA\*II\*II* (аллель \*II — является высокопродуктирующим [8] и коррелирует с высоким уровнем *IL-1β* ( $p=0,04$ )). Полученные данные можно объяснить механизмом связывания рецепторного антагониста интерлейкина-1 с рецептором I типа на мембра-

не клеток, так как сродство *IL1RA* с рецептором меньше поэтому для связывания необходим его избыток в 100 или более раз [8]. Также нами выявлена и обратная достоверно значимая корреляция между низкопродуктирующим аллелем *IL1RA\*1* с низкими концентрациями *IL-1β* в сыворотке крови ( $p=0,005$ ).

Таким образом, комплексная оценка основных иммунорегуляторных цитокинов у спортсменов, специализирующихся по виду спорта «плавание», позволила выявить значительное напряжение процессов иммуногенеза в период интенсивных тренировок. Хотя результаты митогенной стимуляции демонстрируют высокий уровень компенсаторных возможностей гуморальной иммунной системы у профессиональных спортсменов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Мельников В.И. Уровень про- и противовоспалительных цитокинов у спортсменов водных видов спорта в период интенсивных физических нагрузок // Фундаментальные исследования. 2011. № 10. С. 122–125.
2. Назаров П., Шевченко Е., Осадчая О., Левон М. Иммуный статус спортсменов при физической нагрузке // Наука в олимпийском спорте. 2014. № 1. С. 37–43.
3. Раджабканиев Р.М., Ригер Н.А., Никитюк Д.Б., Галстян А.Г., Петров А.Н., Евсюкова А.О., Ханферьян Р.А. Сопоставление уровня иммунорегуляторных цитокинов и некоторых антропометрических показателей высококвалифицированных спортсменов // Медицинская иммунология. 2018. № 20. С. 122–125.
4. Ронин В.С., Старобинец Г.М. Руководство к практическим занятиям по методам клинических лабораторных исследований // Учеб. пособие. 4-е изд. М.: Медицина. 1989. С. 318.
5. Симбирцев А.С. Цитокины — новая система регуляции защитных реакций организма // Цитокины и воспаление. 2002. Т. 1. № 1. С. 9–16.
6. Cabral-Santos C., Gerosa-Neto J., Inoue D.S., Panissa V.L.G., Gobbo L.A., Zagatto A.M., Campos E.Z., Lira F.S. Similar anti-inflammatory acute responses from moderate-intensity continuous and high-intensity intermittent exercise // J. Sports Science and Medicine. 2015. Vol. 14. P. 849–856.
7. Chaar V., Romana M., Tripette J., Broquere C., Huisse M.G., Hue O., Chaar V., Effect of strenuous physical exercise on circulating cell-derived microparticles // Clinical Hemorheology and Microcirculation. — 2011. — Vol. 47(1). — P. 15–25.
8. Chen W.-C., Wu H.-C., Chen H.-Y., et al. Interleukin-1β gene and receptor antagonist gene polymorphisms in patients with calcium oxalate stones // Urol Res. 2001. Vol. 29. P. 321–324.
9. Denguezli-Bouzgarrou M., Ben Jabrallah M., Gaid S., Slama F., Ben Saad H., Tabka Z. Effects of brief maximal exercise on interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha // J. Biology of Sport. 2006. Vol. 23(1). P. 1–13.
10. Glund S., Deshmukh A., Long Y.C. Interleukin-6 directly increases glucose metabolism in resting human skeletal muscle // Diabetes. 2007. Vol. 56, no. 6, pp. 1630–1637.
11. Margeli A., Skenderi K., Tsironi M., Hantzi E., Matalas A.-L., Vrettou C., Kanavakis E., Chrousos G., Dramatic I.P. Elevations of Interleukin-6 and acute-phase reactants in athletes participating in the ultradistance foot race spartathlon: Severe systemic inflammation and lipid and lipoprotein changes in protracted exercise // J. Clinical Endocrinology and Metabolism. 2005. Vol. 90(7). P. 3914–3918. DOI:10.1210/jc.2004–2346.
12. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // Methods in Molecular Biology. 1984. Vol.2. P. 31–34.
13. Raimo Joro, Arja Uusitalo, Keith C DeRuisseau, Mustafa Atalay Changes in cytokines, leptin, and IGF-1 levels in overtrained athletes during a prolonged recovery phase: A case-control study // J. of Sports Sciences. 2016 Dec. Vol. 35(23). P. 1–8. DOI:10.1080/02640414.2016.1266379.
14. Robson P. Elucidating the unexplained underperformance syndrome in endurance athletes: the interleukin-6 hypothesis // J. Sports Medicine. 2003. Vol. 33(10). P. 771–781.
15. Steensberg A., van Hall G., Osada T., Sacchetti M., Saltin B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6 // J. Physiology. 2000. Vol. 529(1). P. 237–242.

© Галимова Эльвира Мансуровна (vemgen@gmail.com), Галикеева Гузель Фанилевна (galikeevagf@yandex.ru),  
Галимов Азат Мусавинович (Azat13Galimov@gmail.com), Губайдуллина Рината Ильшатовна (regi.mi@yandex.ru),  
Хасбатуллина Гульназ Венеровна (khasbatullina@yandex.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»