

К.П. Базарин¹, А.А. Савченко², Л.И. Александрова³**ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ У КВАЛИФИЦИРОВАННЫХ СПОРТСМЕНОВ**¹ ФГАОУ ВПО Сибирский федеральный университет, г. Красноярск² НИИ медицинских проблем Севера СО РАМН, г. Красноярск³ ФГБОУ ВПО Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева, г. Красноярск

Проведено сравнительное исследование функциональной активности нейтрофилов крови, выраженной через расчетный индекс активации, у спортсменов-ориентировщиков в окончании соревновательного периода и контрольной группы, состоящей из практически здоровых лиц, не испытывающих значительных физических нагрузок. Установлено достоверное снижение индекса активации нейтрофилов в группе спортсменов более чем в 2 раза по отношению к контрольной группе.

Ключевые слова: спорт, иммунная система, нейтрофилы, спонтанная хемилюминесценция, индуцированная хемилюминесценция

CHANGES IN NEUTROPHILIC GRANULOCYTES FUNCTIONAL ACTIVITY IN TRAINED ATHLETESK.P. Bazarin¹, S.A. Savchenko², L.I. Alexandrova³¹ Siberian Federal University, Krasnoyarsk² Research Institute of Medical Problems of the North of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Science, Krasnoyarsk³ Krasnoyarsk State Pedagogical University named after V.P. Astafiev, Krasnoyarsk

This article presents results of comparative research of the functional activity of neutrophilic granulocytes, expressed through a calculated index of activation, in sportsmen going in for orienteering at the end of competitive period and the control group, consisting mostly of healthy people, who do not expose to high physical load. We detected a reliable decrease of the activation index of neutrophils of sportsmen in more than 2 times in comparison to the control group.

Key words: sport, immune system, neutrophil, spontaneous chemiluminescence, induced chemiluminescence

ВВЕДЕНИЕ

В зарубежных источниках представлен ряд исследований влияния высоких физических нагрузок на состояние иммунной системы спортсменов, преимущественно позволяющих говорить о том, что следствием их является иммуносупрессия [1–3, 6, 7, 12]. В работе Horn et al. [5] приводятся результаты 10-летнего исследования, показывающего значимое снижение количества лейкоцитов крови и нейтрофилов в частности, у спортсменов в видах спорта, связанных с проявлением выносливости. В исследовании Levada-Pires et al. [8] изучались изменения уровня продукции АФК нейтрофилами у спортсменов, участников соревнований по полиатлону Ecomotion Pr6. Обнаружено снижение продукции АФК нейтрофилами в 2,2 раза после окончания соревнований по сравнению с состоянием покоя, показано увеличение интенсивности апоптоза лимфоцитов после соревнований. В исследовании Yaegaki et al. [15] показано значительное снижение уровня продукции АФК нейтрофилами в пробах крови, взятых у спортсменов-дзюдоистов после окончания тренировочных сборов, по сравнению с исходным состоянием. Имеется незначительное количество работ российских авторов, посвященных исследованию реакции иммунной системы на высокий уровень физических нагрузок [11]. В целом, данная тема является актуальной и недостаточно исследованной.

Нейтрофилы являются первой линией защиты организма от внешних патогенов, таких как бактерии, и составляют 40–60 % от всей популяции лейкоцитов. Нарушение активации нейтрофилов является патогенетическим звеном ряда заболеваний. Функциональное состояние фагоцитирующих клеток можно охарактеризовать через уровень «респираторного взрыва», при котором наблюдается резкое увеличение потребления кислорода за счет преобразования его в активные формы. Способность нейтрофильных гранулоцитов образовывать нужное количество активных форм кислорода (АФК) и уровень ответа на индуктор «респираторного взрыва» может характеризовать активность защитных сил организма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследовании приняли участие 19 спортсменов, членов сборной команды Сибирского федерального университета по спортивному ориентированию, имеющих общий тренировочный и соревновательный режим. Данный вид спорта характеризуется преимущественно циклической нагрузкой аэробного характера. Квалификация: мастеров спорта – 9, кандидатов в мастера спорта – 7, имеющих 1-й разряд – 3. Женский пол – 11, мужской – 8. Средний возраст составил 22,21 лет, стандартное отклонение – 3,58. Исследование одобрено локальным этическим комитетом, обследуемые спортсмены давали добро-

вольное информированное согласие на участие в эксперименте.

Образцы венозной крови забирались из локтевой вены натощак, в состоянии покоя, как минимум через 12 часов после окончания физической нагрузки. В качестве антикоагулянта использовался гепарин. Пробы были взяты в течение 3-х дней после окончания соревновательного периода, когда спортсмены находились в состоянии максимальной усталости.

Венозную кровь (2 мл) забирали в центрифужные пробирки, перемешивали с 80 ЕД гепарина и 1 мл полиглокина. Выделение нейтрофильных гранулоцитов осуществляли в двойном градиенте плотности фикоколл-урографина ($\rho = 1,077 \text{ г/см}^3$, для отделения мононуклеарных клеток, и $\rho = 1,119 \text{ г/см}^3$, для выделения нейтрофильных гранулоцитов). Слой нейтрофильных гранулоцитов аккуратно переносили в центрифужную пробирку и трижды отмывали в физиологическом растворе при 400 g в течение 10 мин. По окончании третьего центрифугирования супернатант удаляли, а оставшиеся клетки распределяли в 2 мл раствора Хенкса. Подсчет производили в камере Горяева. Оценка чистоты выделенных нейтрофильных гранулоцитов (для этого клетки окрашивали по Романовскому – Гимзе) показывала отсутствие лимфоцитов и эритроцитов. После подсчета клетки доводили раствором Хенкса до концентрации 2 млн/мл.

Реакционная смесь для хемилюминесцентной реакции состояла из 40 мкл донорской сыворотки АВ (IV), 100 мкл люминола в концентрации 10^{-5} M , 50 мкл индуктора (в случае определения индуцированной хемилюминесценции), 610 мкл раствора Хенкса без красителя и 250 мкл лейкоцитарной взвеси (2 млн/мл) для определения спонтанной хемилюминесценции или 685 мкл раствора Хенкса и 125 мкл взвеси лейкоцитов – для индуцированной.

Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции производилась в течение 90 минут на

36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3604» (СКТБ «Наука», г. Красноярск). Регистрация результатов и управление хемилюминесцентным анализатором осуществлялась через компьютер. Определялись следующие характеристики: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение (I_{max}) и площадь кривой (S).

В качестве индукторов дыхательного «взрыва» использовали опсонизированный зимозан («Sigma», США). Суспензию опсонизированного зимозана готовили следующим образом. Навеска зимозана тщательно перемешивалась с донорской сывороткой АВ (IV) Rh(-) в концентрации 2 мг зимозана на 1 мл сыворотки. Инкубировали 30 минут при 37 °С. После инкубации смесь центрифугировали 10 минут при 800 g, супернатант удаляли, а осевший зимозан ресуспендировали в 10 мл физиологического раствора и трижды отмывали по 10 минут при 800 g. Полученный опсонизированный зимозан разводили в растворе Хенкса без фенолового красного до концентрации 2 мг/мл.

Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, относительно спонтанной, оценивали соотношением $S_{\text{зим.}}/S_{\text{спонт.}}$, которое определяли как индекс активации.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (C25 и C75). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна – Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., 2004).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные результаты представлены в таблице 1. Данные свидетельствуют о состоянии гиперактивации нейтрофилов – время выхода на максимум интенсивности (T_{max}) при спонтанной хемилюминес-

Таблица 1
Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов у спортсменов в разные периоды тренировочного цикла (Me, C₂₅–C₇₅)

Показатели	Контроль n = 62		Спортсмены n = 19	
Спонтанная хемилюминесценция				
Tmax (сек.)	1351,5	798,0–1983,0	631,0	324,0–1082
	$p = 0,013$			
I _{max} (о.е.)	8580,0	4005,0–14250,0	5663,0	2777,0–6027
S (о.е.× сек. × 10 ⁵)	2,69	1,22–5,76	2,71	1,78–6,47
Зимозан-индуцированная хемилюминесценция				
Tmax (сек.)	1221,0	984,0–1526,0	1365,0	445,0–1954
I _{max} (о.е.)	16806,1	5943,0–26458,0	8787,0	3482,0–10274
S (о.е.× сек. × 10 ⁵)	5,06	1,70–8,64	4,62	2,89–12,60
Синд./ Спонт.	1,67	1,33–2,39	0,57	0,45–0,66
	$p = 0,002$			

ценции, существенно ниже, чем в контрольной группе. При этом уровень максимальной активности (I_{\max}), проявляемой нейтрофилами, ниже, чем в контроле. Особый интерес представляет реакция нейтрофилов на активацию зимозаном – мы наблюдаем значительное увеличение (T_{\max}) по сравнению со спонтанной активностью. Эти особенности отражаются в достоверных различиях индекса активации ($S_{\text{инд.}} / S_{\text{спонт.}}$): 1,67 в контрольной группе и 0,57 в группе спортсменов. Эти результаты согласуются с данными, полученными другими исследователями [1, 3, 8, 9, 13], и позволяют обоснованно говорить о том, что высокий уровень физических нагрузок, характерный для спорта высших достижений, оказывает существенное супрессивное влияние на состояние иммунной системы, в частности на функциональную активность нейтрофилов крови.

ВЫВОДЫ

Нами определено снижение индекса активации нейтрофилов в группе спортсменов более чем в 2 раза по отношению к контрольной группе. На основании представленных данных мы можем заключить, что резервы активации истощены, и нейтрофилы отвечают на стимуляцию снижением активности.

Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 12-04-31445.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boyum A., Ronsen O., Tennfjord V.A., Tollefsen S. et al. Chemiluminescence response of granulocytes from elite athletes during recovery from one or two intense bouts of exercise // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2002. – Vol. 88 (1–2). – P. 20–28.
2. Chinda D., Nakaji S., Umeda T., Shimoyama T. et al. A competitive marathon race decreases neutrophil functions in athletes // *Luminescence.* – 2003. – N 18 (6). – P. 324–329.
3. Chinda D., Umeda T., Shimoyama T., Kojima A. et al. The acute response of neutrophil function to a bout of judo training // *Luminescence.* – 2003. – N 18 (5). – P. 278–282.
4. Gani F., Passalacqua G., Senna G., Mosca F.M. Sport, immune system and respiratory infections. // *Eur. Ann. Allergy Clin. Immunol.* – 2003. – N 35 (2). – P. 41–46.
5. Horn P.L., Pyne D.B., Hopkins W.G., Barnes C.J. Lower white blood cell counts in elite athletes training for highly aerobic sports // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2010. – N 110 (5). – P. 925–32.
6. Kakani M.W., Peake J., Brenu E.W., Simmonds M. et al. The open window of susceptibility to infection after acute exercise in healthy young male elite athletes // *Exerc. Immunol. Rev.* – 2010. – N 16. – P. 119–137.
7. Levada-Pires A.C., Cury-Boaventura M.F., Gorjão R., Hirabara S.M. et al. Neutrophil death induced by a triathlon competition in elite athletes // *Med. Sci. Sports Exerc.* – 2008. – N 40 (8). – P. 1447–1454.
8. Levada-Pires A.C., Fonseca C.E., Hatanaka E., Alba-Loureiro T. et al. The effect of an adventure race on lymphocyte and neutrophil death // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2010. – N 109 (3). – P. 447–453.
9. Matsuzaka M., Sugawara N., Nakaji S. Measuring neutrophil functions might be a good predictive marker of overtraining in athletes // *Luminescence.* – 2008. – N 23 (5). – P. 281–286.
10. Mochida N., Umeda T., Yamamoto Y., Tanabe M. et al. The main neutrophil and neutrophil-related functions may compensate for each other following exercise—a finding from training in university judoists // *Luminescence.* – 2007. – N 22 (1). – P. 20–28.
11. Morozov V.I., Pryatkin S.A., Kalinski M.I., Rogozkin V.A. Effect of exercise to exhaustion on myeloperoxidase and lysozyme release from blood neutrophils // *Eur. J. Appl. Physiol.* – 2003. – N 89 (3–4). – P. 257–262.
12. Murakami S., Kurihara S., Koikawa N., Nakamura A. et al. Effects of oral supplementation with cystine and theanine on the immune function of athletes in endurance exercise: randomized, double-blind, placebo-controlled trial // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* – 2009. – N 73 (4). – P. 817–821.
13. Peake J.M. Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action // *Exerc. Immunol. Rev.* – 2002. – N 8. – P. 49–100.
14. Toumi H., F'guyer S., Best T.M. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch // *J. Anat.* – 2006. – N 208 (4). – P. 459–270.
15. Yaegaki M., Umeda T., Takahashi I. Measuring neutrophil functions might be a good predictive marker of overtraining in athletes // *Luminescence.* – 2008. – N 23 (5). – P. 281–286.

Сведения об авторах

Базарин Кирилл Петрович – кандидат медицинских наук, директор Интеграционного научно-технологического центра физической культуры и спорта СФУ (660079, г. Красноярск, пр. Свободный, 79; тел.: (391) 271-31-22; e-mail: kpbazarin@gmail.com)

Савченко Андрей Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии НИИ Медицинских проблем Севера СО РАМН (660000, Красноярск, Партизана Железняка, 3Г; e-mail: aasavchenko@mail.ru)

Александрова Людмила Ивановна – доцент кафедры теоретических основ физического воспитания ФГБОУ ВПО Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева (660049, г. Красноярск, ул. Ады Лебедевой, 89; e-mail: ifkst@mail.ru)

Information about the authors

Bazarin Kirill Petrovich – candidate of medical sciences, Director of Integration scientific Technological Center of Physical Training and Sport (660079, Krasnoyarsk, Svobodniy str., 79; Tel.: (391) 271-31-22; e-mail: kpbazarin@gmail.com)

Savchenko Andrey Anatolyevich – M.D., professor, the head of the laboratory of molecular-cellular physiology and pathology of Scientific Institute of Medical Problems of the North SB RAMS (660000, Krasnoyarsk, Partizan Zheleznyak Str., 3G; e-mail: aasavchenko@mail.ru)

Alexandrova Lyudmila Ivanovna – доцент кафедры теоретических основ физического воспитания ФГБОУ ВПО Красноярский государственный педагогический университет им. В.П. Астафьева (660049, г. Красноярск, ул. Ады Лебедевой, 89; e-mail: ifkst@mail.ru)