

FEATURES OF CHANGES IN IMMUNOLOGICAL PARAMETERS AND DNA METHYLATION IN CHILDREN AGED 7-10 YEARS ENGAGED IN SWIMMING

S.V.Babich¹  V.A.Aleynik² 

1. Andijan State Pedagogical Institute, Andijan, Uzbekistan.

2. Andijan Branch of the Institute of Immunology and Human Genomics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Andijan State Medical Institute, Andijan, Uzbekistan.

Abstract.

Relevance. The article deals with the features of adaptive processes for changing immunological parameters and epigenetic DNA methylation in children aged 7-10 years who are engaged in swimming. **The aim of the study:** to study the characteristics of changes in immunological parameters and epigenetic DNA methylation in children aged 7-10 years involved in swimming. **Material and methods.** The study involved 30 children aged 7-10 years, who were divided into 3 groups. Group 1 included 10 children aged 7-10 years who were not involved in any kind of sport - control. Group 2 included 10 children aged 7-10 years who had been swimming for 1 year. Group 3 included 10 children aged 7-10 years who had been swimming for 3 years. Cytokines, DNA methyltransferase 1 and 5-methyl-2'-deoxycytidine content were determined by ELISA using standard kits. Statistical data processing was performed using Microsoft Office Excel 2010 by the variation statistics method with calculation of arithmetic means and their errors ($M \pm m$). The statistical significance of differences between independent samples with normal distribution was assessed using Student's t-test. Differences were considered significant at $p < 0.05$. **Research results.** In children of 7-10 years old engaged in swimming, with an increase in the duration of the usual training process, compared with children who are not engaged in any kind of sports, there was a significant increase in blood after 1 year, and after 3 years of training, a significant decrease in the indicators taken into account, more pronounced in the study of IL-6, TGF- β 1 and less pronounced in the study of TNF- α , IL-10. During the peak of training load, similar, but more pronounced changes in these indicators were detected compared to the indicators of the usual training process. When studying the activity of DNA methyl transferase 1 and the content of 5-methyl-2'-deoxycytidine with an increase in the duration of swimming, an unreliable decrease in these indicators was observed after 1 year and a significant decrease after 3 years of training compared with children who do not engage in any sports. During the peak training load, there was also a significant decrease in these indicators after 1 year and more pronounced after 3 years of training, relative to the results of children who do not engage in any kind of sports. **Conclusion.** With an increase in physical activity in duration and intensity, the level of cytokines, the activity of DNA methyltransferase 1 and the content of 5-methyl-2'-deoxycytidine decrease, which indicates a decrease in adaptation processes.

Key words: physical exercise, cytokines, DNA methylation, DNA methyltransferase 1, 5-methyl-2'-deoxycytidine.

Актуальность проблемы. Исследования in vivo показали, что мышечные клетки способны высвобождать белки и пептиды, оказывающие модулирующее воздействие на функциональную активность клеток других тканей. Включаясь в механизмы межклеточной коммуникации, эти молекулы играют различную роль в регуляции селекции и дифференцировки клеток. В связи, с чем скелетные мышцы рассматриваются как эндокринный орган, способный продуцировать специфические белки - миокины. По аналогии с адипокинами (белками, секретируемыми адипоцитами жировой ткани) [3,8].

Показано, что ключевым фактором экспрессии и продукции миокинов является физиче-

ская нагрузка, и уровень экспрессии миокинов в значительной степени зависит от количества мышечной массы, вовлеченной в работу [3, 8, 5].

Миокины представляют собой молекулы ранее известных цитокинов (IL-6, IL-8, IL-15, CXCL1 и LIF), а также других белков (миостатин, COX и eNOS) и липидов (PGE2). Показано, что длительные циклические нагрузки стимулируют экспрессию ИЛ -6, ИЛ -8, ИЛ -15, PGE2.

Было показано увеличение провоспалительных цитокинов ИЛ -1, ИЛ-6, фактора некроза опухолей (ФНО- α), а также ИЛ-10, после объемной мышечной работы. После физического упражнения отмечается повышение уровня ИЛ -1 в мышечной ткани. Тяжелая физическая активность приводит к быстрому кратковременному повышению продукции цитокинов как провоспалительных (ИЛ-2, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α), так и противовоспалительных (ИЛ-1 α , ИЛ-10). ИЛ-6 является наиболее изученным цитокином, связанным с физическими упражнениями [1, 2].

Физические упражнения могут приводить к эпигенетическим изменениям путем метилирования ДНК и модификации гистонов в скелетных мышцах. Эпигенетические изменения, вызванные физическими упражнениями, могут быть временными, например, после одного сеанса высокоинтенсивных аэробных упражнений или стабильными [8]. Кроме того, скелетные мышцы могут изменять свой эпигенетический отпечаток даже при краткосрочных стимулах, позволяя в будущем адаптироваться к тем же стимулам; это можно назвать мышечной эпипамью [4]. Сложные взаимодействия между множественными эпигенетическими модификациями и их регулированием метаболическими изменениями и сигнальными событиями во время упражнений, имеющие значение для улучшенного понимания острой и хронической адаптации к упражнениям, являются вопросами для дальнейшего изучения [4, 6].

Поскольку физические упражнения, по-видимому, вызывают различные реакции на протяжении всей жизни, а также учитывая распространенное мнение, что физические упражнения могут повернуть «эпигенетические часы» вспять, возраст всегда следует рассматривать как сопутствующую переменную в дальнейших исследованиях [7].

Цель исследования: изучить особенности изменения иммунологических показателей и эпигенетического метилирования ДНК у детей 7-10 лет, занимающихся плаванием.

Материал и методы. В работе были обследованы 30 детей 7-10 лет, которые были разделены на 3 группы. В 1 группу вошли 10 детей 7-10 лет, не занимающихся ни каким видом спорта - контроль. Во 2 группу вошли 10 детей 7-10 лет, занимающихся плаванием в течение 1 года. В 3 группу вошли 10 детей 7-10 лет, занимающихся плаванием в течение 3 лет. У детей 2 и 3 группы дважды - в обычный тренировочный этап и пиковый период подготовки к соревнованиям - в крови методом ИФА определяли показатели: провоспалительных - интерлейкин-1 β (ИЛ -1), интерлейкин -6 (IL-6), фактор некроза опухолей - α (ФНО- α), и противовоспалительных - интерлейкин -10 (ИЛ-10) с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» Россия, а также трансформирующего фактора роста- β 1 (TGF- β 1) с использованием тест-систем «DRG» Германия. У детей, не занимающихся спортом, определяли те же цитокины, только 1 раз.

Метилирование происходит в позиции C5 молекулы 2'-дезоксцитидина с образованием метилированного основания 5-метил-2'-дезоксцитидина. Поэтому изменения уровня метилирования ДНК могут быть определены количественно по концентрации 5-метил-2'-дезоксцитидина. В связи с чем изменения уровня метилирования ДНК в супернатанте отмытых лизированных лизирующим буфером лейкоцитов, выделенных в фекол-верографине, определяли по концентрации 5-метил-2'- дезоксцитидина, используя метод ИФА (стандартный набор BCM Diagnostics, США). Активность ДНК-метилтрансферазы 1 определяли также в супернатанте отмытых лизированных лимфоцитов, выделенных в фекол-верографине, с использованием ИФА набора для определения (cytosine-5)-methyltransferase 1 (DNMT1) (стандартный набор Human, Германия). У всех детей и их родителей было получено письменное согласие на участие в исследовании. Статистическая обработка данных была выполнена с использованием Microsoft Office Excel 2010 методом вариационной статистики с вычислением средних арифметических и их ошибок ($M \pm m$). Статистическая значимость различий независимых выборок с нормальным распределением оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента. Различия

считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В результате проведенных исследований было установлено, что у детей 7-10 лет, не занимающихся спортом, показатель ИЛ-6 в крови, составлял $4,7 \pm 0,4$ пг/мл. У детей 2 группы, занимавшихся в течение 1 года плаванием, величина этого показателя в обычный тренировочный период была равна $6,9 \pm 0,6$ пг/мл, что находилось достоверно выше подобных результатов детей, не занимающихся спортом. Результат детей, занимающихся плаванием 3 года, составлял в тренировочный период $5,1 \pm 0,4$ пг/мл и находился достоверно ниже, чем аналогичные значения ИЛ-6 у детей, занимающихся плаванием в течение 1 года. В пиковый период подготовки к соревнованиям у детей 2 группы, занимавшихся в течение 1 года плаванием, величина ИЛ-6 находилась на уровне $9,8 \pm 0,8$ пг/мл, что было достоверно больше аналогичного показателя детей, не занимающихся спортом, и также достоверно выше результатов этих же детей в обычный тренировочный период. Величина показателя детей 3 группы, занимавшихся плаванием в течение 3 лет, на пике физической подготовки к соревнованиям, составила $7,2 \pm 0,6$ пг/мл, и также была достоверно ниже аналогичных значений ИЛ-6 у детей 2 группы и достоверно выше показателя детей 1 группы (Табл.).

В проведенных исследованиях у детей, не занимавшихся спортом, было установлено, что показатель ИЛ-1 β в крови, составлял $2,8 \pm 0,2$ пг/мл. Во 2 группе детей, занимавшихся в течение 1 года плаванием, величина данного показателя в обычный тренировочный период, равнялся $4,1 \pm 0,3$ пг/мл, и была достоверно выше аналогичных значений детей, не занимающихся спортом. У детей, занимавшихся 3 года плаванием, показатель ИЛ-1 β в обычный тренировочный период составлял $3,2 \pm 0,2$ пг/мл и был достоверно меньше, подобного результата детей, занимавшихся в течение 1 года плаванием. Вместе с тем, у детей 2 группы на этапе пиковой подготовки к соревнованиям уровень ИЛ-1 β составил $4,6 \pm 0,4$ пг/мл, это значение было достоверно выше подобных результатов детей, не занимающихся спортом и несущественно больше показателей этих детей в период обычного тренировочного процесса. Помимо этого, величина показателя детей 3 группы, занимавшихся плаванием в течение 3 лет, в период пиковой подготовки к соревнованиям находился на уровне $3,5 \pm 0,3$ пг/мл и был достоверно меньше, по сравнению с результатом ИЛ-1 β детей 2 группы (Табл.).

Таблица-1

Изменение показателей ИЛ-6, ИЛ-1 β , ФНО- α , ИЛ-10, TGF- β 1 в крови у детей 7-10 лет, а также ДНК метил-трансферазы 1 и показателя 5-метил-2'-дезоксцитидина в лизированных лейкоцитах обследованных групп

Исследуемые показатели	Этапы тренировок	Дети, не занимающиеся спортом	Дети, занимавшиеся плаванием 1 год	Дети, занимавшиеся плаванием 3 года
ИЛ-6 пг/мл	обычный режим	$4,7 \pm 0,4$	$6,9 \pm 0,6^*$	$5,1 \pm 0,4$ о
	пик		$9,8 \pm 0,8^{*+}$	$7,2 \pm 0,6$ о +
ИЛ-1 β пг/мл	обычный режим	$2,8 \pm 0,2$	$4,1 \pm 0,3^*$	$3,2 \pm 0,2$ о
	пик		$4,6 \pm 0,4^*$	$3,5 \pm 0,3$ о
ФНО пг/мл	обычный режим	$7,1 \pm 0,6$	$9,4 \pm 0,8^*$	$7,5 \pm 0,6$
	пик		$9,9 \pm 0,9^*$	$7,9 \pm 0,7$
ИЛ-10 пг/мл	обычный режим	$0,5 \pm 0,04$	$0,7 \pm 0,06^*$	$0,6 \pm 0,05$
	пик		$0,8 \pm 0,07^*$	$0,7 \pm 0,06$
TGF- β 1 нг/мл	обычный режим	$0,9 \pm 0,08$	$1,3 \pm 0,11^*$	$1,0 \pm 0,08$ о
	пик		$1,4 \pm 0,12^*$	$1,1 \pm 0,09$
ДНК-метил-трансфераза 1 нМ/мл	обычный режим	$25,3 \pm 2,1$	$22,3 \pm 1,8$	$17,8 \pm 1,5^*$
	пик		$19,2 \pm 1,5^*$	$16,3 \pm 1,3^*$
5-метил-2'-дез-оксцитидинанг/мл	обычный режим	$69 \pm 6,5$	$54 \pm 4,9$	$48 \pm 4,2^*$
	пик		$45 \pm 4,1^*$	$37 \pm 3,4^*$

Примечание: * - достоверно отличающиеся величины к показателям детей, не занимающихся спортом.

щихся спортом.

о - достоверно отличающиеся величины к показателям детей, занимающихся плаванием в течение 1 года.

+ - достоверно отличающиеся величины к показателям детей в обычном тренировочном режиме.

При исследовании ФНО- α было установлено, что этот показатель у детей, не занимавшихся спортом, составлял $7,1 \pm 0,6$ пг/мл. У детей 2 группы, в течение 1 года занимавшихся плаванием, в период обычного тренировочного процесса величина показателя находилась на уровне $9,4 \pm 0,8$ пг/мл, что было достоверно больше результатов детей, не занимающихся спортом. В группе детей, занимавшихся 3 года плаванием, в обычном тренировочном режиме результат ФНО- α составлял $7,5 \pm 0,6$ пг/мл и был не достоверно меньше, схожих результатов ФНО- α детей, занимавшихся в течение 1 года плаванием. В тоже время у детей 2 группы, занимавшихся в течение 1 года плаванием, на этапе пика подготовки к соревнованиям размер ФНО- α был равен $9,9 \pm 0,9$ пг/мл, что было достоверно выше аналогичных результатов детей, не занимающихся спортом и несущественно больше подобных показателей этих же детей в период обычных тренировок. Вместе с тем, величина ФНО- α детей 3 группы, занимавшихся плаванием в течение 3 лет, на пике тренировочного процесса, равнялась $7,9 \pm 0,7$ пг/мл и находилась недостоверно ниже подобных значений ФНО- α детей занимавшихся плаванием 1 год (Табл.).

Показатели ИЛ-10 имели изменения аналогичные ФНО- α , у детей, в течение 1 года занимавшихся плаванием, величина этого показателя, составляла $0,7 \pm 0,06$ пг/мл, что было достоверно больше подобных результатов ($0,5 \pm 0,04$ пг/мл) детей, не занимающихся спортом. В группе детей, занимавшихся 3 года плаванием, показатель ИЛ-10 равнялся $0,6 \pm 0,05$ пг/мл, что было недостоверно меньше, подобных результатов этого показателя детей, занимавшихся плаванием в течение 1 года. При этом у детей, занимавшихся в течение 1 года плаванием, в период интенсивных тренировок величина ИЛ-10 находилась на уровне $0,8 \pm 0,07$ пг/мл, и достоверно выше подобных значений детей, не занимающихся спортом, и незначительно выше аналогичных результатов детей 1 группы. В тоже время, размер ИЛ-10 детей 2 группы, занимавшихся плаванием в течении 3 лет, был равен $0,7 \pm 0,06$ пг/мл и находился не достоверно ниже схожих результатов ИЛ-10 детей 1 года занимавшихся плаванием (Табл.).

По результатам изучения TGF- $\beta 1$ было выявлено, что данный показатель у детей, не занимавшихся спортом, составлял $0,9 \pm 0,08$ нг/мл. У детей 2 группы, в течение 1 года занимавшихся плаванием, данный показатель в период обычного тренировочного процесса равнялся $1,3 \pm 0,11$ нг/мл, и был достоверно выше аналогичных данных детей, не занимающихся спортом. В 3 группе детей, занимавшихся 3 года плаванием, в период обычных тренировок результат TGF- $\beta 1$ был равен $1,0 \pm 0,08$ нг/мл, что было достоверно ниже, подобных значений TGF- $\beta 1$ детей, занимавшихся в течение 1 года плаванием. При этом у детей, занимавшихся в течение 1 года плаванием, на пике тренировочного процесса показатель TGF- $\beta 1$ составлял $1,4 \pm 0,12$ нг/мл, и был достоверно больше результатов детей, не занимающихся спортом, и не существенно больше показателей этих же детей в обычном тренировочном процессе. Кроме того, показатель TGF- $\beta 1$ детей 3 группы, занимавшихся плаванием в течение 4 лет, на пике подготовки к соревнованиям был равен $1,1 \pm 0,09$ нг/мл, что находилось не достоверно ниже подобных значений TGF- $\beta 1$ детей, занимавшихся плаванием 1 год (Табл.).

Из результатов исследования активности ДНК-метил-трансферазы 1 в составе лизатов лейкоцитов было обнаружено, что данный показатель у детей, не занимавшихся спортом, составлял $25,3 \pm 2$ нМ/мл. У детей 2 группы, занимавшихся плаванием в течение 1 года, в период обычного тренировочного процесса этот показатель, равнялся $22,3 \pm 1,8$ нМ/мл, что было недостоверно ниже подобных результатов детей, не занимающихся спортом. У детей 3 группы, занимавшихся 3 года плаванием, в период обычных тренировок результат активности ДНК-метил-трансферазы 1 составлял $17,8 \pm 1,5$ нМ/мл, и был достоверно ниже, аналогичных результатов у детей, занимавшихся в течение 1 года плаванием. В тоже время у детей, занимавшихся плаванием в течение 1 года, на пике тренировочного процесса величина активности ДНК-ме-

тил-трансферазы 1 была равна $19,2 \pm 1,5$ нМ/мл, и была достоверно выше показателя детей, не занимающихся спортом, и не достоверно меньше подобных результатов детей этой группы в период обычных тренировок. Помимо этого, величина активности ДНК-метил-трансферазы 1 детей, занимавшихся плаванием в течение 3 лет, на пике подготовки к соревнованиям составляла $16,3 \pm 1,3$ Мг/мл, и была достоверно ниже аналогичных показателей активности ДНК-метил-трансферазы 1 детей, занимавшихся плаванием в течение 1 года (Табл.).

При исследовании содержания 5-метил-2'-дез-оксицитидина, образующегося при метилировании ДНК, в составе лизатов лейкоцитов было обнаружено, что этот показатель у детей, не занимавшихся спортом, составлял $69 \pm 6,5$ нг/мл. У детей 2 группы, занимавшихся плаванием в течение 1 года, этот показатель, по время обычных тренировок, находился на уровне $54 \pm 4,9$ нг/мл, что было не достоверно ниже аналогичных результатов детей, не занимающихся спортом. У детей, занимавшихся 3 года плаванием, показатель содержания 5-метил-2'-дез-оксицитидина, в период обычных тренировок, составлял $48 \pm 4,2$ нг/мл, и находился достоверно ниже, аналогичных результатов данного показателя детей, занимавшихся в течение 1 года плаванием. В тоже время у детей, занимавшихся в течение 1 года плаванием, на пике тренировок величина содержания 5-метил-2'-дез-оксицитидина равнялась $45 \pm 4,1$ нг/мл, и была достоверно выше подобных результатов детей, не занимающихся спортом, и не достоверно меньше аналогичных значений детей этой группы, во время обычных тренировок. Кроме того, величина содержания 5-метил-2'-дез-оксицитидина детей 3 группы, занимавшихся плаванием в течение 3 лет, на пике тренировочного процесса, составляла $37 \pm 3,4$ нг/мл, и была достоверно ниже подобных показателей содержания 5-метил-2'-дез-оксицитидина детей, занимавшихся плаванием в течение 1 года (Табл.).

Из полученных данных можно заключить, что у детей 7-10 лет, занимающихся плаванием, в период обычного тренировочного процесса, отмечалось в крови достоверное нарастание ИЛ-6 после 1 года тренировок, а после 3 лет тренировок достоверное уменьшение этого показателя по сравнению с аналогичными результатами детей, не занимающихся каким-либо спортом. В период пиковой тренировочной нагрузки выявлялось также достоверное увеличение ИЛ-6 после 1 года и после 3 лет тренировок, также имелось достоверное снижение данного показателя относительно подобных результатов детей, не занимающихся, каким-либо спортом. При этом величина показателей в период пиковой тренировочной нагрузки, как после 1 года, так и после 3 лет, была достоверно выше значений в период обычного тренировочного процесса. Данные изменения, возможно, связаны с повышением у детей адаптации к тренировочным физическим нагрузкам.

При исследовании ИЛ-1 β у детей 7-10 лет, занимающихся плаванием, в обычном и пиковом тренировочных режимах, после 1 и 3 лет тренировок наблюдалась подобная направленность изменений, как у ИЛ-6, но менее выраженная. Еще менее выраженная аналогичная направленность изменений наблюдалась при исследовании ФНО- α и ИЛ-10. При изучении TGF- β 1 выявлена аналогичная направленность изменений, но более выраженная в сравнении с ИЛ-1 β , ФНО- α и ИЛ-10.

Помимо этого, при изучении в составе лизатов лейкоцитов эпигенетического глобального метилирования ДНК, по изменению активности ДНК метил-трансферазы 1 и показателя 5-метил-2'-дез-оксицитидина, у детей 7-10 лет, занимающихся плаванием, в обычном и пиковом тренировочном режиме, наблюдалось недостоверное снижение этих показателей после 1 года и достоверное уменьшение после 3 лет тренировок по сравнению с аналогичными результатами детей, не занимающихся каким-либо спортом. Тем временем, в период пиковой тренировочной нагрузки выявлялось достоверное снижение активности ДНК метил-трансферазы 1 и показателя 5-метил-2'-дез-оксицитидина после 1 года и более выраженное после 3 лет относительно подобных результатов детей, не занимающихся каким-либо спортом. В тоже время величина этих показателей на пике тренировок, как после 1 года, так и после 3 лет тренировок находилась достоверно ниже подобных результатов детей в обычном тренировочном режиме. Эти изменения, вероятно, вызваны повышением у детей адаптированности к тренировочным физическим нагрузкам.

Закключение. У детей 7-10 лет, занимающихся плаванием, с увеличением продолжительности обычного тренировочного процесса, в сравнении с детьми, не занимающимися спортом, отмечалось в крови достоверное нарастание после 1 года, а после 3 лет тренировок достоверное уменьшение учитываемых показателей, более выраженное при исследовании ИЛ-6, TGF- β 1 и менее выраженное при исследовании ФНО- α , ИЛ-10. В период пиковой тренировочной нагрузки выявлялись аналогичные, но более выраженные изменения этих показателей по сравнению с показателями обычного тренировочного процесса. В тоже время при исследовании активности ДНК метил-трансферазы 1 и содержания 5-метил-2'-дез-оксидцитидина с увеличением продолжительности занятия плаванием наблюдалось недостоверное снижение этих показателей после 1 года и достоверное уменьшение после 3 лет тренировок по сравнению с детьми, не занимающимися каким-либо спортом. Тем временем, в период пиковой тренировочной нагрузки, выявлялось также достоверное снижение этих показателей после 1 года и более выраженное после 3 лет тренировок, относительно результатов детей, не занимающихся спортом.

List of references

- [1] Antunes, B. M., Campos, E. Z., Dos Santos, R. V. T., Rosa-Neto, J. C., Franchini, E., Bishop, N. C., & Lira, F. S. Anti-inflammatory response to acute exercise is related with intensity and physical fitness. *Journal of cellular biochemistry*, 2019; 120(4): 5333-5342.
- [2] Chaar, V. Romana, M., Tripette, J., Broquere, C., Huisse, M. G., Hue, O., ... & Connes, P. Effect of strenuous physical exercise on circulating cell-derived microparticles. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 2011; 47(1): 15-25.
- [3] Maeda K., Okubo K., Shimomura I. et al. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (adipose most abundant gene transcript 1). *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 2012; 425(3): 556–559,
- [4] McGee S. L., Hargreaves M. Epigenetics and exercise. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2019; 30(9): 636-645.
- [5] Pedersen B.K. Muscle as a secretory organ. *Compr. Physiol*, 2013; 3: 1337- 1362.
- [6] Plaza-Diaz J. et al. Impact of physical activity and exercise on the epigenome in skeletal muscle and effects on systemic metabolism. *Biomedicines*, 2022;10(1): 126.
- [7] Schenk A., Proschinger S., Zimmer P. Epigenetics in exercise science and sports medicine. *Medical Epigenetics*: Academic Press, 2021:491-509.
- [8] Widmann M., Nieß A. M., Munz B. Physical exercise and epigenetic modifications in skeletal muscle //Sports medicine. – 2019. – Т. 49. – №. 4. – С. 509-523.