

Zembron-Lacny

mgr Anna Tylutka

**Aktywny styl życia jako efektywna metoda profilaktyki
zaburzeń funkcji układu immunologicznego u osób starszych**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: dr hab. Agnieszka Zembron-Lacny, prof. UZ

Klinika/ Zakład

Katedra Fizjologii Stosowanej i Klinicznej Collegium Medicum
Uniwersytetu Zielonogórskiego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2022 r.

Słowa kluczowe: profil ryzyka immunologicznego, pomyślne starzenie się, aktywność fizyczna, limfocyty T, otyłość

Key words: immune risk profile, successful aging, physical activity, lymphocytes T, obesity

Podziękowania

Dziękuję Pani Profesor Agnieszce Zembroń-Łacny za cierpliwość, opiekę naukową, poświęcony czas, a także pomoc w prowadzeniu badań oraz przygotowaniu pracy doktorskiej.

Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe

Podstawą złożonego wniosku o nadanie stopnia doktora w dyscyplinie nauki medyczne jest monotematyczny cykl publikacji naukowych, obejmujący dwie prace o łącznej wartości 4,191 Impact Factor i liczbie 140 punktów wg listy MEiN, pod wspólnym tytułem: „Aktywny styl życia jako efektywna metoda profilaktyki zaburzeń funkcji układu immunologicznego u osób starszych”, przygotowany w oparciu o przegląd literatury oraz badania przeprowadzone w ramach środków dla młodych naukowców z subwencji MNiSW na podtrzymanie i rozwój potencjału badawczego:

Publikacja 1; Tylutka A, Zembron-Lacny A. Immunological aging and clinical consequences. *Postepy Hig Med Dosw* 2020; 74: 260-271. doi: 10.5604/01.3001.0014.3054.

Publikacja 2; Tylutka A, Morawin B, Gramacki A, Zembron-Lacny A. Lifestyle exercise attenuates immunosenescence; flow cytometry analysis. *BMC Geriatr* 2021; 21: 200. doi: 10.1186/s12877-021-02128-7.

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów	6
Streszczenie.....	8
Abstract.....	10
I. Wstęp uzasadniający połączenie wskazanych publikacji w jeden cykl	12
II. Założenia i cel pracy	15
III. Badania eksperymentalne z grupą kontrolną	17
1. Materiał i metody	17
1.1. Charakterystyka badanej grupy.....	17
1.2. Analiza składu ciała	18
1.3. Ocena sprawności funkcjonalnej i poziomu wydolności fizycznej	19
1.4. Analizy laboratoryjne	19
1.5. Analiza statystyczna.....	21
2. Wyniki badań	21
2.1. Analiza składu ciała	21
2.2. Ocena sprawności funkcjonalnej i poziomu wydolności fizycznej	22
2.3. Analiza immunofenotypowa limfocytów T	23
2.4. Status IgG CMV a zmiany w subpopulacjach komórek immunologicznych	24
2.5. Analiza morfologii krwi obwodowej.....	25
2.6. Analiza biochemiczna	26
IV. Podsumowanie i wnioski	28
V. Piśmiennictwo.....	29
VI. Kopie opublikowanych prac	32
VII. Opinia Komisji Bioetycznej	57
VIII. Oświadczenia współautorów prac	59

Wykaz stosowanych skrótów

- ANOVA - analiza wariancji (ang. *analysis of variance*)
- BIA - impedancja bioelektryczna (ang. *bioelectrical impedance analysis*)
- BMI - wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*)
- CD - markery różnicowania powierzchniowego (ang. *cluster of differentiation*)
- CMV - wirus cytomegalii (ang. *cytomegalovirus*)
- CRP - białko C reaktywne (ang. *C-reactive protein*)
- FM - tłuszczowa masa ciała (ang. *fat mass*)
- FFM - beztłuszczowa masa ciała (ang. *free fat mass*)
- GRA - granulocyty (ang. *granulocytes*)
- Hb - hemoglobina (ang. *haemoglobin*)
- HCT – hematokryt (ang. *haematocrit*)
- HDL - lipoproteiny o wysokiej gęstości (ang. *high density lipoprotein*)
- INF γ - interferon gamma (ang. *interferon gamma*)
- IRP - profil odpornościowego ryzyka (ang. *immune risk profile*)
- LDL - lipoproteiny o niskiej gęstości (ang. *low density lipoprotein*)
- LYM - limfocyty (ang. *lymphocytes*)
- NK - komórki „naturalni zabójcy” (ang. *natural killer*)
- MCH - średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej (ang. *mean corpuscular volume*)
- MCHC - średnie stężenie hemoglobiny w krwince (ang. *mean hemoglobin concentration*)
- MCV - średnia objętość krwinki czerwonej (ang. *mean corpuscular volume*)
- MHC - główny układ zgodności tkankowej (ang. *major histocompatibility complex*)
- NO – tlenek azotu (ang. *nitric oxide*)
- Non-HDL - cholesterol nie HDL (ang. *non cholesterol HDL*)
- ONOO - nadtlenoazotyn (ang. *peroxynitrite*)
- PLT – liczba krwinek czerwonych (ang. *red blood cell*)
- SARS-CoV2 - (ang. *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*)
- TC - total cholesterol (ang. *total cholesterol*)
- TCR – receptory limfocytów T (ang. *T cells receptor*)
- TEC – komórki nabłonka grasicy (ang. *thymic epithelial cells*)
- TG - trójglicerydy (ang. *triglycerides*)
- TNF α - czynnik martwicy nowotworów (ang. *tumour necrosis factor*)
- UTW - Uniwersytet Trzeciego Wieku (ang. *University of Third Age*)
- WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organization*)
- VO₂max – maksymalny pobór tlenu (ang. *maximal oxygen consumption*)

6MWT - 6-minutowy test marszowy (ang. *6-minute walking test*)

Streszczenie

Starzenie się układu odpornościowego, określane terminem immunosenescencji (ang. *immunosenescence*) jest procesem postępującym i nieodwracalnym obejmującym obniżenie liczby dziewiczych limfocytów T i limfocytów B, aktywności cytotoksycznej komórek NK (ang. *natural killer cells*) oraz zaburzenia równowagi pro- i przeciwzapalnej poprzez zmiany wytwarzania takich cząsteczek, jak cytokiny IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TNF α , INF γ i in. Z wiekiem dochodzi do nasilenia autoimmunizacji i uogólnionego stanu zapalnego z jednoczesnym deficytem immunologicznym, co skutkuje większą podatnością na choroby infekcyjne, obniżeniem reaktywności na szczepienia profilaktyczne, zachorowalnością na choroby autoimmunologiczne, zwiększonym ryzykiem infekcyjnych powikłań urazów, zaostrzeniem objawów chorób przewlekłych oraz niedostateczną reakcją na obecność komórek nowotworowych. Od lat na podstawie analizy częstości zakażeń wirusowych i bakteryjnych, wskaźników immunologicznych i zapalenia podejmowane są próby opracowania profilu odpornościowego ryzyka (ang. *immune risk profile*, IRP) oraz efektywnych metod profilaktyki zaburzeń funkcji układu immunologicznego i przedłużenia sprawności funkcjonalnej osób starszych.

Celem pracy było dokonanie przeglądu literatury na temat immunosenescencji oraz oceny profilu odpornościowego ryzyka na podstawie analizy cytometrycznej populacji limfocytów T w relacji do poziomu aktywności fizycznej.

Rekrutacja objęła 99 osób w wieku od 60 do 90 lat. Na podstawie wywiadu medycznego i kryteriów wykluczenia, badania zrealizowano z udziałem 54 osób w wieku $71,4 \pm 5,8$ lat (kobiety $n=47$, mężczyźni $n=7$). Uczestników podzielono na dwie grupy, aktywna i nieaktywna fizycznie, na podstawie wyniku testu marszowego (ang. *6-minute walk test*, 6MWT) i badań wydolności fizycznej (ang. *Astrand-Ryhming submaximal cycle test*). Do grupy aktywnej fizycznie włączono 34 osoby w wieku $70,2 \pm 5,8$ lat, których prędkość chodu wynosiła od 1,3 do 1,8 m/s i maksymalny poziom pobierania tlenu (ang. *maximal oxygen consumption*, VO₂max) wynosił >35 mL/kg/min. Do grupy nieaktywnej fizycznie włączono 20 osób w wieku $73,5 \pm 5,4$ lat, którzy osiągnęli prędkość chodu $<1,3$ m/s i wartość VO₂max ≤ 35 mL/kg/min. Analizę subpopulacji limfocytów T dokonano za pomocą 8 parametrowego cytometru przepływowego i przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluorochromami oraz immunofenotypowano określając odsetek limfocytów T dziewiczych i limfocytów T pamięci. Następnie przeprowadzono ocenę profilu ryzyka odpornościowego (ang. *immune risk profile*, IRP) na podstawie stosunku liczby limfocytów T CD4⁺ do limfocytów T CD8⁺ oraz miano przeciwciał IgG CMV (ang. *cytomegalovirus*, CMV). Przyjęto przedziały referencyjne stosunku CD4/CD8 między ≥ 1 a $\leq 2,5$ jako wartość

prawidłową, podczas gdy wartości <1 lub $>2,5$ (odwrócony stosunek CD4/CD8 lub podwyższony stosunek CD4/CD8) uznano za fenotyp ryzyka immunologicznego. Ocenę zawartości tłuszczowej (ang. *fat mass*, FM) i beztłuszczowej masy ciała (ang. *free fat mass*, FFM) wykonano za pomocą analizatora składu ciała w oparciu o metodę impedancji bioelektrycznej (ang. *bioelectrical impedance analysis*, BIA).

Odsetek limfocytów T dziewiczych o fenotypie CD4⁺CD45RA⁺ i stosunek CD4CD45RA/CD4CD45RO był istotnie wyższy u aktywnych fizycznie (prędkość chodu $1,5 \pm 0,1$ m/s) w porównaniu do nieaktywnych osób (prędkość chodu $1,0 \pm 0,1$ m/s). Analiza IRP wyrażona stosunkiem liczby limfocytów T pomocniczych CD4⁺ do cytotoksycznych CD8⁺, pokazała wartości w przedziale referencyjnym między ≥ 1 a $\leq 2,5$ u około 60% aktywnych fizycznie seniorów, podczas gdy odwrócony stosunek CD4/CD8 (wartości <1) obserwowano głównie w grupie nieaktywnych fizycznie. Osoby aktywne fizycznie charakteryzowały się obniżoną zawartością FM w porównaniu do osób nieaktywnych. Między FM a liczbą limfocytów T wykazano istotne zależności wyrażone współczynnikiem korelacji Spearmana (FM/CD4⁺ $r_s=0,491$, $p<0,05$ i FM/CD4⁺CD45RO⁺ $r_s=0,636$, $p<0,01$) w grupie nieaktywnych fizycznie seniorów. Ze względu na wysoki odsetek osób seropozytywnych w badanej grupie (93%), nie potwierdzono związku zakażenia CMV ze zmianami stosunku CD4/CD8.

Na podstawie przeglądu literatury i przeprowadzonych badań można stwierdzić, że utrzymanie aktywnego stylu życia (ang. *lifestyle exercise*) wzmacnia układ odpornościowy poprzez zwiększenie odsetka populacji limfocytów T dziewiczych, a ocena obserwowanych wraz z wiekiem zmian liczby limfocytów T pomocniczych CD4⁺ do cytotoksycznych CD8⁺ może być istotna w prognozowaniu zaburzeń metabolicznych lub nasilenia objawów chorób współistniejących.

Exercise lifestyle as an effective prevention of the immune system disturbance in the elderly

Abstract

Immunosenescence is defined as the changes in the immune system associated with age. It is a progressive and irreversible process involving a decrease in the number of naïve T and B cells, NK cells cytotoxic and activity, and disruption of pro and anti-inflammatory balance by altering the production of IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , INF γ and others. With age there is an increase in autoimmunity and generalized inflammation with a simultaneous immunodeficiency, which results in greater susceptibility to infectious diseases, a decrease in reactivity to prophylactic vaccinations, the incidence of autoimmune diseases, and increased risk of infectious injury complications, exacerbation of symptoms of chronic diseases and an insufficient response to the presence of cells cancer. For years, based on the analysis of the frequency of viral and bacterial infections, immunological indicators and inflammation, attempts have been made to develop the immune risk profile (IRP) and effective methods of preventing disorders of the immune system and prolonging the functional capacity of the elderly.

The aim of the study was to review the literature on immunosenescence and assess the immune risk profile based on cytometric analysis of the T-cell population in relation to the level of physical activity.

99 individuals aged 60 to 90 were recruited for this study. Based on the medical interview and the exclusion criteria, the study was conducted with the participation of 54 elderly aged 71.4 ± 5.8 years (women $n = 47$, men $n = 7$). The participants were divided into two groups, active and physically inactive, based on the results of the 6-minute walk test (6MWT) and Astrand-Ryhmig submaximal cycle test. The physically active group included 34 individuals, aged 70.2 ± 5.8 years, whose walking gait speed ranged from 1.3 to 1.8 m/s and the maximum level of oxygen consumption ($VO_2\text{max}$) was >35 mL/kg/min. The physically inactive group included 20 participants aged 73.5 ± 5.4 years, who achieved gait speed <1.3 m/s and $VO_2\text{max}$ value ≤ 35 mL/kg/min. Analysis of the T cell subpopulation was performed with an 8-parameter flow cytometer and fluorochrome labeled monoclonal antibodies and immunophenotyped to determine the percentage of naïve and memory T lymphocytes. An assessment of the immune risk profile (IRP) was performed based on the ratio of $CD4^+$ T cells to $CD8^+$ T cells and the level of IgG CMV antibody. Reference ranges of a CD4/CD8 ratio of ≥ 1 to ≤ 2.5 were taken as normal, while values <1 or > 2.5 (inverted CD4/CD8 ratio or higher CD4/CD8 ratio) were considered an immune risk phenotype. Fat

mass (FM) and free-fat mass (FFM) were assessed with a body composition analyzer based on the bioelectric impedance method.

The percentage of naïve T lymphocytes phenotype: CD4⁺CD45RA⁺ and the CD4CD45RA / CD4CD45RO ratio was significantly higher in physically active elderly participants (gait speed 1.5 ± 0.1 m/s) compared to inactive individuals (gait speed 1.0 ± 0.1 m/s). IRP analysis, expressed as the ratio of CD4⁺ to CD8⁺ T lymphocytes, showed values in the reference range of ≥ 1 and ≤ 2.5 in 60% of physically active seniors, while an inverted CD4/CD8 ratio (values < 1) was observed mainly in the group of physically inactive. Physically active elderly participants were characterized by a lower FM content compared to inactive group. Significant relationships were found between FM and the number of T lymphocytes, expressed by the Spearman correlation coefficient (FM/CD4⁺ $r_s = 0.491$, $p < 0.05$ and FM/CD4⁺CD45RO⁺ $r_s = 0.636$, $p < 0.01$) in the group of physically inactive seniors. Due to the fact that 93% of elderly were seropositive CMV the relationship between CMV infection and changes in the CD4/CD8 ratio has not been established.

Based on a review of the literature and conducted research, it has been showed that maintaining and lifestyle exercise strengthens the immune system by increasing the percentage of naïve T lymphocytes, and the assessment of the changes in the number of CD4⁺ T helper lymphocytes to cytotoxic CD8⁺ lymphocytes observed with age may be important in forecasting the occurrence of metabolic disorders or the intensification of symptoms of comorbidities.

I. Wstęp uzasadniający połączenie wskazanych publikacji w jeden cykl

Publikacja 1; Tylutka A, Zembron-Lacny A. Immunological aging and clinical consequences. *Postepy Hig Med. Dosw* 2020; 74: 260-271. doi:10.5604/01.3001.0014.3054

Starzenie się (ang. *senescence*) jest złożonym procesem fizjologicznym obejmującym zmiany liczby, struktury i funkcji komórek oraz macierzy pozakomórkowej, i w efekcie prowadzi do pogorszenia sprawności czynnościowej tkanek i narządów. Jedną z teorii starzenia zakłada, że komórki przestają się dzielić z powodu tzw. starzenia replikacyjnego, które jest wynikiem skracania telomerów. Komórki mogą również ulegać starzeniu niereplikacyjnemu, na skutek zaburzeń mechanizmów epigenetycznych (acetylacji, metylacji, deacetylacji, ubikwitynacji), upośledzenia zdolności naprawy DNA, mutacji somatycznych, uszkodzeń wywołanych przez reaktywne formy tlenu i azotu oraz nagromadzenia zmienionych strukturalnie białek z powodu obniżenia aktywności proteasomów [Gala i wsp. 2010]. W latach 60-tych amerykański gerontolog Roy Walford wprowadził termin starzenie immunologiczne (ang. *immunosenescence*), opierając się na pewnego rodzaju paradoksie obserwowanym u starszych osób tj. nasileniu autoimmunizacji i uogólnionego stanu zapalnego z jednoczesnym deficytem immunologicznym. Późniejsze badania kliniczne potwierdziły słuszność koncepcji Walforda, że proces starzenia jest wynikiem zmian we właściwościach komórek immunologicznych i nieprawidłowo zachodzących procesów odpornościowych (tab. 1) [Drela 2014, Fuentes i wsp. 2017, Tylutka i Zembroń-Łacny 2020, Tylutka i wsp. PZWL 2021].

Tabela. 1. Zmiany we właściwościach komórek immunologicznych obserwowane u osób starszych [Drela 2014, Tylutka i Zembroń-Łacny 2020].

TYP KOMÓREK	OBSERWOWANE ZMIANY Z WIEKIEM
Limfocyty T	zmniejszanie populacji komórek dziewiczych CD45RA CCR7 ⁺ wzrost populacji limfocytów pamięci CD45RO CCR7 ⁻ ograniczenie różnorodności receptorów dla antygenów tzw. repertuar TCR (ang. <i>T cells receptor</i>) zwiększone uwalnianie cytokin prozapalnych
Limfocyty B	zmniejszenie liczby komórek dziewiczych wzrost subpopulacji komórek pamięci wzrost liczby limfocytów B-1 CD5 ⁺ wytwarzających autoprzeciwciała zaburzona interakcja między limfocytami T i B - zmniejszenie różnorodności przeciwciał zaburzona reearanzacja genów przeciwciał
Komórki NK	liczba komórek zwiększona lub bez zmian zahamowanie prezentacji antygenów i syntezy MHC typu II (ang. <i>major histocompatibility complex</i>) hamowanie syntezy cząsteczek kostymulujących zahamowanie chemotaksji i endocytozy, produkcji reaktywnych form tlenu

Najważniejszymi cechami immunosenescencji jest obniżenie liczby dziewiczych limfocytów T, limfocytów B i zmniejszenie różnorodności występujących na ich powierzchni receptorów. Skutkuje to słabszą odpowiedzią immunologiczną, obniżeniem miana produkowanych przeciwciał i wytwarzania interferonów przez plazmacytoidalne komórki dendrytyczne. Doprowadza to do osłabienia odporności na zakażenia wirusowe i bakteryjne oraz do zwiększonego wytwarzania mediatorów reakcji zapalnej i stałą obecnością stanu zapalnego u starszych osób (ang. *inflamm-aging*) [Murray i Chotirmall 2015, Panda i wsp. 2010]. Z wiekiem nie zaobserwowano zmian całkowitej liczby komórek należących do odporności nieswoistej, jak neutrofile, monocyty/makrofagi, ale wykazano zmniejszoną różnorodność w ich subpopulacjach i wrażliwość na apoptozę oraz spadek aktywności chemotaktycznej i fagocytarnej m.in. poprzez redukcję generacji tlenu azotu (NO[•]) i nadtlenoazotynu (ONOO⁻). Wykazano wzrost liczby komórek NK, ale osłabienie ich cytotoksycznej aktywności poprzez obniżone wytwarzanie proteaz serynowych, jak perforyny i granzymy. Skutkuje to obniżeniem zdolności naciekania przez neutrofile i makrofagi uszkodzonej tkanki i wydłużeniem czasu gojenia, zwiększonym ryzykiem infekcyjnych powikłań urazów, zaostrzeniem objawów chorób przewlekłych oraz niedostateczną reakcją na obecność komórek nowotworowych [Drela 2014, Inoue i wsp. 2018, Tylutka i Zembroń-Łacny 2020].

Układ odpornościowy osób starszych ma zmniejszoną zdolność do nabytych odpowiedzi immunologicznych oraz predyspozycję prozapalną i autoimmunologiczną. W konsekwencji osoby starsze mają osłabioną funkcję odpornościową, co skutkuje większą podatnością na infekcje, obniżoną odpowiedzią na szczepienie i reaktywacją utajonych infekcji wirusowych. Podczas procesu starzenia się największe zmiany obserwuje się w adaptacyjnym układzie immunologicznym zwłaszcza w limfocytach T [Shirakawa i wsp. 2021]. Widoczne wraz z wiekiem dysproporcje w populacji limfocytów T są konsekwencją zmniejszenia objętości grasicy o około 3% rocznie do wieku średniego, a następnie o <1% rocznie przez resztę życia [Santoro i wsp. 2021]. Zmniejszona proliferacja i różnicowanie tymocytów wynikają z obniżenia produkcji komórek nabłonka grasicy (ang. *thymic epithelial cells*, TEC), czynników grasiczo-hormonalnych, jak tymozyny czy tymopoetyny. Utrata wspomnianych komórek zastępowana jest z czasem tkanką tłuszczową [Palmer i wsp. 2013, Tylutka i Zembron-Lacny i wsp. 2020]. W miarę postępowania procesu inwolucji grasicy zmniejsza się liczba limfocytów T dziewiczych - komórek zdolnych do rozpoznania i zapamiętania informacji o nowym antygenie, a rośnie liczba krążących komórek T pamięci. W efekcie następuje spowolnienie odpowiedzi komórkowej skierowanej przeciwko nowym antygenom, a także znaczne ograniczenie odpowiedzi humoralnej i komórkowej, co może tłumaczyć wysoką śmiertelność osób starszych w wyniku zarażenia wirusem SARS-CoV2 (ang. *severe acute respiratory syndrom coronaviruses 2*) [Hu i wsp. 2020].

Następstwem dokładnego poznania zależności między starzeniem się organizmu a właściwościami komórek immunologicznych jest wprowadzanie prewencji gerontologicznej obejmującej modyfikację diety (poprzez zwiększenie spożycia składników o wysokim indeksie przeciwzapalnym lub wysokim potencjale antyoksydacyjnym), codziennej aktywności fizycznej wykonywanej w środowisku o niskiej zawartości immunotoksyn (PM10, NO₂, SO₂, CO i in.) oraz upowszechnienie szczepień przeciw *Influenza virus*, *Streptococcus pneumoniae* i *SARS-CoV-2* uwzględniających immunosenescencję i zapewniających pełną odporność przeciw grypie, zapaleniu płuc i COVID-19 [Corley i wsp. 2019, Lee i wsp. 2019, Simoni i wsp. 2015, Tylutka i Zembron-Lacny 2020, Wawrzyniak-Gramacka i wsp. 2021].

II. Założenia i cel pracy

Od wielu lat na podstawie analizy wskaźników immunologicznych lub zapalenia oraz częstości zakażeń przede wszystkim wirusem cytomegalii (cytomegalovirus CMV), podejmowane są próby opracowania profilu odpornościowego ryzyka (IRP) określającego potencjalne tempo starzenia się układu immunologicznego, a tym samym całego organizmu. Pierwsze obserwacje w latach 90-tych przeprowadzili Szwedzi (projekt OCTO/NONA, populacja Jönköping), którzy wykazali, że IRP wyrażony stosunkiem liczby limfocytów T pomocniczych CD4⁺ do limfocytów T cytotoksycznych CD8⁺ we krwi obwodowej <1 był związany z wyższą śmiertelnością uczestników projektu w ciągu kolejnych lat obserwacji [Wikby i wsp. 2002, Wikby i wsp. 2005, Wikby i wsp. 2006]. Badania były kontynuowane przez Holendrów (projekt 85-Plus, populacja Leiden) i Belgów (projekt BELFRAIL, populacja Flandrii), których obserwacje jedynie częściowo były porównywalne (tab. 2). Pawelec [2019] wyjaśnił, że może to wynikać z różnic środowiskowych oraz stylu życia badanej populacji obejmującej jakość diety i aktywność fizyczną [Pawelec 2019, Tylutka i Zembron-Lacny 2020].

Tabela 2. Zmiany profilu odpornościowego ryzyka związanej ze śmiertelnością obserwowanych populacji w projektach OCTO/NONA, 85-Plus, BELFRAIL [Pawelec 2019, Tylutka i Zembron-Lacny 2020].

PROJEKT	WYNIKI
OCTO/NONA czynniki zwiększające umieralność w okresie 2, 4 i 6 lat (kobiety i mężczyźni)	stosunek limfocytów CD4 do CD8 < 1 obniżona proliferacja w odpowiedzi na mitogeny kumulacja komórek o fenotypie CD27 ⁻ CD28 ⁻ CD8 ⁺ T obecność przeciwciał przeciw CMV zwiększona liczba neutrofilii
85-Plus czynniki pozytywnie związane z 8-letnią przeżywalnością w wieku 89 lat (kobiety i mężczyźni)	kumulacja komórek o fenotypie CD28 ⁻ CD8 ⁺ T w odpowiedzi na antygeny CMV akumulacja komórek T CD4 o fenotypie podobnym do komórek T regulatorowych
BELFRAIL czynniki pozytywnie związane z 3-letnią przeżywalnością w wieku 85 lat (kobiety) czynniki negatywnie związane z 3-letnią przeżywalnością w wieku 85 lat (kobiety)	stosunek limfocytów CD4 do CD8 <1 obecność przeciwciał przeciw CMV stosunek limfocytów CD4 do CD8 >5 kumulacja dziewiczych limfocytów T CD4 brak przeciwciał przeciw CMV

Czynnikami, które silnie wpływają na IRP jest aktywność fizyczna i skład masy ciała, a dokładnie zawartość tkanki tłuszczowej (ang. *fat mass*, FM). Wykazano, że dramatyczny spadek aktywności fizycznej z jednoczesnym wzrostem FM u osób w

podeszłym wieku zwiększa udział procentowy limfocytów T CD3⁺CD4⁺ oraz obniża udział procentowy limfocytów CD3⁺CD8⁺ i cytotoksyczność komórek NK, co stwarza ryzyko chorób zakaźnych i nowotworów [O'Rourke i wsp. 2005, O'Shea i wsp. 2010]. Badania Lyncha i wsp. [2009] dotyczące zmian w subpopulacji limfocytów T między osobami otyłymi i metabolicznie chorymi a otyłymi i metabolicznie zdrowymi pokazały niski udział procentowy limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ i komórek NK u pacjentów otyłych i metabolicznie chorych.

Głównym założeniem prac składających się na rozprawę doktorską było dokonanie przeglądu literatury na temat starzenia się układu odpornościowego i metod przeciwdziałania immunosenescencji, a następnie ocena wpływu aktywnego stylu życia (ang. *lifestyle exercise*) na profil odpornościowego ryzyka wyrażonego stosunkiem liczby limfocytów T CD4⁺ do limfocytów T CD8⁺ oraz analiza odsetka limfocytów T dziewiczych i limfocytów T pamięci z uwzględnieniem seropozytywności wobec wirusa CMV i zawartości tkanki tłuszczowej.

III. Badania eksperymentalne z grupą kontrolną

Publikacja 2; Tylutka A, Morawin B, Gramacki A, Zembron-Lacny A. Lifestyle exercise attenuates immunosenescence; flow cytometry analysis. BMC Geriatr 2021; 21: 200. doi: 10.1186/s12877-021-02128-7.

Podstawową funkcją układu immunologicznego jest zapewnienie integralności organizmu w warunkach stałej ekspozycji na antygeny wewnątrz- i zewnątrzpochodne. Zakażenie wirusem CMV, zaburzenia metaboliczne i choroby degeneracyjne oraz czynniki środowiskowe, jak zanieczyszczenie środowiska, jakość diety i aktywność fizyczna mogą wpływać na profil odpornościowego ryzyka przyspieszając lub spowalniając starzenie układu immunologicznego, a w konsekwencji starzenie się całego organizmu. Jednymi z wielu proponowanych markerów natężenia immunosenescencji są: liczba dziewiczych limfocytów B, immunofenotyp limfocytów T i stosunek komórek CD4/CD8, stężenie białka C-reaktywnego i cytokin prozapalnych, zdolność prezentacji antygenów przez komórki dendrytyczne, liczba komórek NK z jednoczesnym określeniem ich aktywności cytotoksycznej, aktywność fagocytarna neutrofilii, długość telomerów w komórkach immunologicznych [Fülop i wsp. 2018, Lara i wsp. 2015, Tylutka i Zembron-Lacny 2020].

Z wielu badań wynika, że utrzymywanie regularnej aktywności fizycznej przez osoby starsze jest jednym z ważniejszych czynników łagodzących wpływ wieku i umożliwiających pomyślne starzenie się (ang. *successful ageing*). Korzyści wynikające z aktywności fizycznej podejmowanej przez osoby starsze są znacznie mniej udokumentowane niż efekty zdrowotne ćwiczeń fizycznych czy programów treningowych realizowanych przez osoby młode [Tylutka i wsp. 2021]. Z badań przeprowadzonych do tej pory wynika, że regularna aktywność fizyczna wiąże się z obniżeniem stanu zapalnego oraz zwiększeniem zdolności antyoksydacyjnej i przeciwzapalnej organizmu [Gleeson i wsp. 2011, Zembron-Lacny i wsp. 2016, Zembron-Lacny i wsp. 2019], poprawą odpowiedzi chemotaktycznej neutrofilii [Bartlett i wsp. 2016], zwiększeniem proliferacji limfocytów T i cytotoksyczności komórek NK [Woods i wsp. 1999] oraz odpowiedzi poszczepiennej [Kohut i wsp. 2005]. Brak natomiast badań ujawniających konieczność utrzymywania aktywności fizycznej we wszystkich okresach rozwoju, aby osłabić objawy immunosenescencji i zapewnić pomyślne starzenie się.

1. Materiał i metody

1.1. Charakterystyka badanej grupy

Rekrutacja objęła 99 słuchaczy Uniwersytetu Trzeciego Wieku (UTW) w wieku od 60 do 90 lat. Na podstawie wywiadu lekarskiego z udziału w badaniach wykluczono osoby

z ostrymi i przewlekłymi chorobami zakaźnymi i onkologicznymi, chorobami sercowo-naczyniowymi oraz neurologicznymi, a także z wszczepionym stymulatorem serca. W trakcie trwania projektu z udziału wyłączono osoby hospitalizowane ($n=5$), z poważnym urazem kolana ($n=3$), z wysokim ciśnieniem tętniczym 180/110 mmHg ($n=26$) i przeziębieniem ($n=11$). Ostatecznie w badaniu wzięło udział 54 słuchaczy UTW w wieku $71,4 \pm 5,8$ lat (kobiety $n=47$, mężczyźni $n=7$), które zgodnie z definicją Gearda i wsp. [2020] reprezentowały pomyślne starzenie się. Uczestników badań podzielono na dwie grupy - aktywna i nieaktywna fizycznie (tab. 3) - na podstawie wyniku testu marszowego (ang. 6-minute walking test, 6MWT) i badań wydolności fizycznej (test Astranda-Ryhming) [Middleton i wsp. 2015, Astranda i Ryhming 1956]. Projekt uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej (uchwała KB nr 01/66/2017, nr 21/103/2018). Wszyscy uczestnicy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniach.

Tabela 3. Pomiary antropometryczne i poziom aktywności fizycznej ($x \pm SD$).

	Aktywni $n=34$	Nieaktywni $n=20$	Aktywni vs. Nieaktywni p level	η^2
Wiek [lata]	70,2 \pm 5,8	73,5 \pm 5,4	<0,05	0,008
Masa ciała [kg]	69,8 \pm 11,8	67,1 \pm 11,3	0,567	0,000
Wysokość ciała [cm]	160,3 \pm 6,0	159,7 \pm 7,2	0,573	0,040
BMI [kg/m²]	27,1 \pm 3,6	26,3 \pm 4,1	0,529	0,006
FM [kg]	24,1 \pm 5,8	22,0 \pm 5,9	0,268	0,004
FM%	34,3 \pm 4,7	32,7 \pm 6,2	0,348	0,006
FFM [kg]	45,7 \pm 7,7	45,1 \pm 8,7	0,622	0,012
Ciśnienie skurczowe [mmHg]	145,1 \pm 19,2	151,3 \pm 20,9	0,264	0,017
Ciśnienie rozkurczowe [mmHg]	81,2 \pm 11,6	79,2 \pm 12,9	0,602	0,004
6MWT [m]	527 \pm 52	388 \pm 59	<0,001	0,662
Prędkość chodu [m/s]	1,5 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	<0,001	0,662
VO₂max [mL/kg/min]	35,8 \pm 5,7	32,8 \pm 4,0	0,131	0,060

BMI wskaźnik masy ciała, FM tłuszczowa masa ciała, FFM beztłuszczowa masa ciała, 6MWT 6-minutowy test marszowy, VO₂max maksymalny pobór tlenu

1.2. Analiza składu ciała

Analizę składu ciała wykonano nieinwazyjną metodą impedancji bioelektrycznej (ang. *bioelectrical impedance analysis*, BIA) za pomocą analizatora Tanita Body Composition Analyser MC-980 (Japonia). Pomiarów dokonywano dwukrotnie w pozycji pionowej, na czczo w godzinach rannych między 7:00 a 9:00 przed pobraniem krwi. Powtarzalność pomiarów wyniosła 98%.

1.3. Ocena sprawności funkcjonalnej i poziomu wydolności fizycznej

Ocena funkcjonalnej sprawności została przeprowadzona za pomocą 6-minutowego testu marszowego (ang. *6-minute walk test*, 6MWT), który wykonano zgodnie z wytycznymi Europejskiego Towarzystwa Chorób Płuc (European Respiratory Society) i Amerykańskiego Towarzystwa Klatki Piersiowej (American Thoracic Society) [Holland i wsp. 2014]. Na podstawie całkowitej długości pokonanego dystansu obliczono prędkość chodu uczestników według wzoru:

prędkość chodu (ang. *gait speed*) (m/s) = całkowita pokonana odległość (m)/360 (s).

Pomiar maksymalnego poboru tlenu (ang. *maximal oxygen consumption*, VO₂max) przeprowadzono za pomocą 6-minutowego submaksymalnego testu wysiłkowego opracowanego przez Astranda i Ryhming [1956], jako pośrednia metoda wyznaczania wartości VO₂max u osób starszych. Test przeprowadzono z wykorzystaniem ergometru rowerowego eBike GE Healthere (Niemcy) i analizatora ciśnienia krwi firmy GE Healthere (Niemcy). Wartość VO₂max obliczono na podstawie częstości skurczów tętna i wielkości wykonywanej pracy na ergometrze rowerowym. Uczestnicy badania 15 minut przed rozpoczęciem testu nie podejmowali żadnej aktywności fizycznej.

Na podstawie wartości referencyjnych prędkości chodu w 6MWT zaproponowanych przez Middleton i wsp. [2015] oraz wartości referencyjnych VO₂max zaproponowanych przez Astranda i Ryhming [1956], uczestników badania podzielono na dwie grupy – aktywna i nieaktywna fizycznie. Do grupy aktywnej fizycznie włączono 34 osoby w wieku 70,2 ± 5,8 lat, których prędkość chodu wynosiła od 1,3 do 1,8 m/s i maksymalny poziom pobierania tlenu (ang. *maximal oxygen consumption*, VO₂max) wynosił >35 mL/kg/min. Do grupy nieaktywnej fizycznie włączono 20 osób w wieku 73,5 ± 5,4 lat, którzy osiągnęli prędkość chodu <1,3 m/s i wartość VO₂max była ≤35 mL/kg/min.

1.4. Analizy laboratoryjne

Badania wykonano w krwi pobranej z żyły łokciowej przy użyciu probówek S-Monovette EDTA-K₂ (Sartedt, Austria) - do analizy cytometrii przepływowej i morfologii oraz probówek S-Monovette - serum (Sartedt, Austria) - do oznaczeń biochemicznych i immunologicznych. Pełną krew pobraną na antykoagulant EDTA-K₂ przeznaczono do oznaczeń natychmiast po pobraniu. Surowicę otrzymywano przez 10-minutowe wirowanie z prędkością 3000 x g i przechowywano w temp. -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

Immunofenotypowanie limfocytów T wykonano za pomocą zestawu CyLyse firmy Sysmex Partec (Niemcy) oraz 8-parametrowego cytometru przepływowego CyFlow Space Sorter firmy Sysmex Partec (Niemcy). Pełną krew o objętości 100 μ L zmieszano z przeciwciałami monoklonalnymi wyznakowanymi fluorochromami (CD8 APC, CD4 FITC, CD45 RA Pacific Blue™ CD45RO PE) i inkubowano w temperaturze pokojowej, w ciemności, przez 15 minut. Następnie dodano 100 μ L odczynnika do utrwalenia leukocytów (ang. *leukocyte fixation reagent A*) i ponownie inkubowano przez 10 minut w tych samych warunkach. W ostatnim etapie przygotowania próbki, dodano 2,5 mL odczynnika lizującego erytrocyty (ang. *erythrocytes lysing reagent B*) i inkubowano przez 20 minut w warunkach jak opisano wyżej. Po zakończeniu inkubacji wykonano analizę cytometryczną. Limfocyty T pomocnicze i cytotoksyczne bramkowane przy użyciu antygenów powierzchniowych CD4⁺ i CD8⁺ wyrażonych jako procent zbramkowanych limfocytów T. Ocenę limfocytów T dziewiczych i limfocytów T pamięci wykonano za pomocą antygenów różnicowania powierzchniowego CD45RA⁺ i CD45RO⁺. Stosunek limfocytów T dziewiczych do limfocytów T pamięci w populacji CD4⁺ i CD8⁺ (CD4CD45RA/CD4CD45RO oraz CD8CD45RA/CD8CD45RO) wyliczono według wzoru zaproponowanego przez Hanga i wsp. [2019]. Profil odpornościowego ryzyka wyrażony stosunkiem liczby limfocytów T CD4⁺ do limfocytów T CD8⁺ porównano do wartości referencyjnych zaproponowanych przez McBride i Striker [2017] oraz Strindhall i wsp. [2013] Autorzy przyjęli CD4/CD8 między ≥ 1 a $\leq 2,5$ jako wartości prawidłowe, natomiast < 1 lub $> 2,5$ (tzw. odwrócony jak i podwyższony stosunek CD4/CD8) za fenotyp ryzyka immunologicznego [Strindhall i wsp. 2013].

Poziom przeciwciał IgG CMV określono przy użyciu testu immunoenzymatycznego firmy DRG International (USA). Seronegatywność wobec CMV (IgG CMV⁻) zgodnie z metodyką testu wynosiła < 9 DU/mL, a seropozytywność wobec CMV (IgG CMV⁺) > 11 DU/mL. Współczynnik zmienności wewnątrztestowej (ang. *intra-assay CV*) stosowanego testu ELISA wynosi 7,75%, międzetestowy współczynnik zmienności (ang. *inter-assay CV*) wynosi 11,45%.

Do oceny parametrów krwi obwodowej, w tym: liczby krwinek białych (ang. *white blood cells*, WBC), granulocytów (ang. *granulocytes*, GRA), limfocytów (ang. *lymphocytes*, LYM) i krwinek czerwonych (ang. *red blood cell*, RBC), stężenia hemoglobiny (ang. *haemoglobin*, Hb), wartości hematokrytu (ang. *haematocrit*, HCT), średniej objętości krwinki czerwonej (ang. *mean corpuscular volume*, MCV), średniej masy hemoglobiny w krwince czerwonej (ang. *mean corpuscular hemoglobin*, MCH), średniego stężenia

hemoglobiny w krwince (ang. *mean haemoglobin concentration*, MCHC) oraz liczby płytek krwi (ang. *platelets*, PLT) wykorzystano automatyczny 3 diff'owy analizator BM HEM3 Biomaxima (Polska).

Stężenie cholesterolu całkowitego (ang. *total cholesterol*, TC), trójglicerydów (ang. *triglycerides*, TG), lipoprotein o niskiej (ang. *low density lipoprotein*, LDL) i wysokiej gęstości (ang. *high density lipoprotein*, HDL) oznaczono z wykorzystaniem analizatora biochemicznego BM200 Biomaxima (Polska). Cholesterol nie-HDL (ang. *non cholesterol HDL*) obliczono według wzoru: nie-HDL=TC-HDL. Białko ostrej fazy (ang. *C reactive protein*, CRP) oznaczono za pomocą testu o wysokiej czułości w dwóch powtórzeniach z wykorzystaniem zestawu immunoenzymatycznego DRG International (USA) z granicą czułości 0,001 mg/L. Współczynnik CV stosowanego testu ELISA wynosi 4,44%, międzytestowy CV wynosi 3,28%. Stężenie glukozy w surowicy krwi oznaczono przy użyciu mobilnego spektrofotometru DP 310 Vario II (Niemcy).

1.5. Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wykonano z wykorzystaniem środowiska R wersja 3.6.1 [R Core Team 2020]. Założenia do zastosowania testów parametrycznych lub nieparametrycznych sprawdzono za pomocą testu Shapiro-Wilka do oceny normalności rozkładów i Levene'a do oceny jednorodności wariancji. Do testowania istotności pomiędzy grupami (aktywni vs. nieaktywni fizycznie) zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). W przypadku naruszenia założeń normalności i jednorodności zastosowano nieparametryczny test Manna-Whitneya. Dodatkowo jako miarę siły efektu określono eta-kwadrat (η^2). Wartości η^2 pomiędzy 0 oraz 0,01 wskazują na brak efektu, $0,01 \leq \eta^2 < 0,06$ wskazuje na minimalny efekt, $0,06 \leq \eta^2 < 0,14$ wskazuje na umiarkowany efekt wpływu, $\eta^2 \geq 0,14$ wskazuje na silny wpływ badanego czynnika na wynik w grupie [Cohen i wsp. 1988, Miles i wsp. 2001]. Do oceny zależności między elementami składu ciała a liczbą komórek T zastosowano analizę korelacji Spearmana (r_s , współczynnik korelacji Spearmana). Za statystycznie istotną różnicę pomiędzy średnimi przyjęto poziom $p < 0,05$. Wyniki badań przedstawiono za pomocą średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego ($\bar{x} \pm SD$).

2. Wyniki badań

2.1. Analiza składu ciała

Wartość BMI wyniosła w grupie aktywnej fizycznie od 19,4 do 35,0 kg/m² i nie różniła się istotnie od wartości obserwowanych w grupie nieaktywnej fizycznie (od 19,0 do

37,0 kg/m²). Osoby otyłe (BMI ≥ 30 kg/m²) stanowiły 20% w obu grupach. Między BMI a FM wykazano wysoką korelację w grupie aktywnej ($r_s=0,806$, $p<0,001$) i nieaktywnej fizycznie ($r_s=0,783$, $p<0,001$). W grupie nieaktywnych seniorów wykazano także istotne zależności między FM a liczbą limfocytów T CD4⁺ ($r_s=0,491$, $p<0,05$) oraz między FM a liczbą limfocytów T CD4⁺CD45RO⁺ ($r_s=0,636$, $p<0,01$). Zaobserwowane wysokie wartości współczynników korelacji wskazują na związek zawartości tkanki tłuszczowej ze zmianami liczby limfocytów T pomocniczych oraz limfocytów T pamięci, i są zgodne z obserwacjami dokonanymi przez van der Weerd i wsp. [2012]. Autorzy wykazali istotnie wyższą liczbę limfocytów T CD4⁺ u osób otyłych. Podobnie, Womack i wsp. [2007] zaobserwowali wyższą liczbę limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ i zwiększoną pulę limfocytów T u otyłych afrykańskich kobiet. Natomiast, Tanaka i wsp. [2001] wykazali zmniejszenie populacji limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ we krwi obwodowej otyłych w porównaniu do nieotyłych uczestników badania. Powodem rozbieżności pomiędzy przedstawionymi obserwacjami może być zróżnicowanie płci i wieku badanych oraz niska liczebność grup.

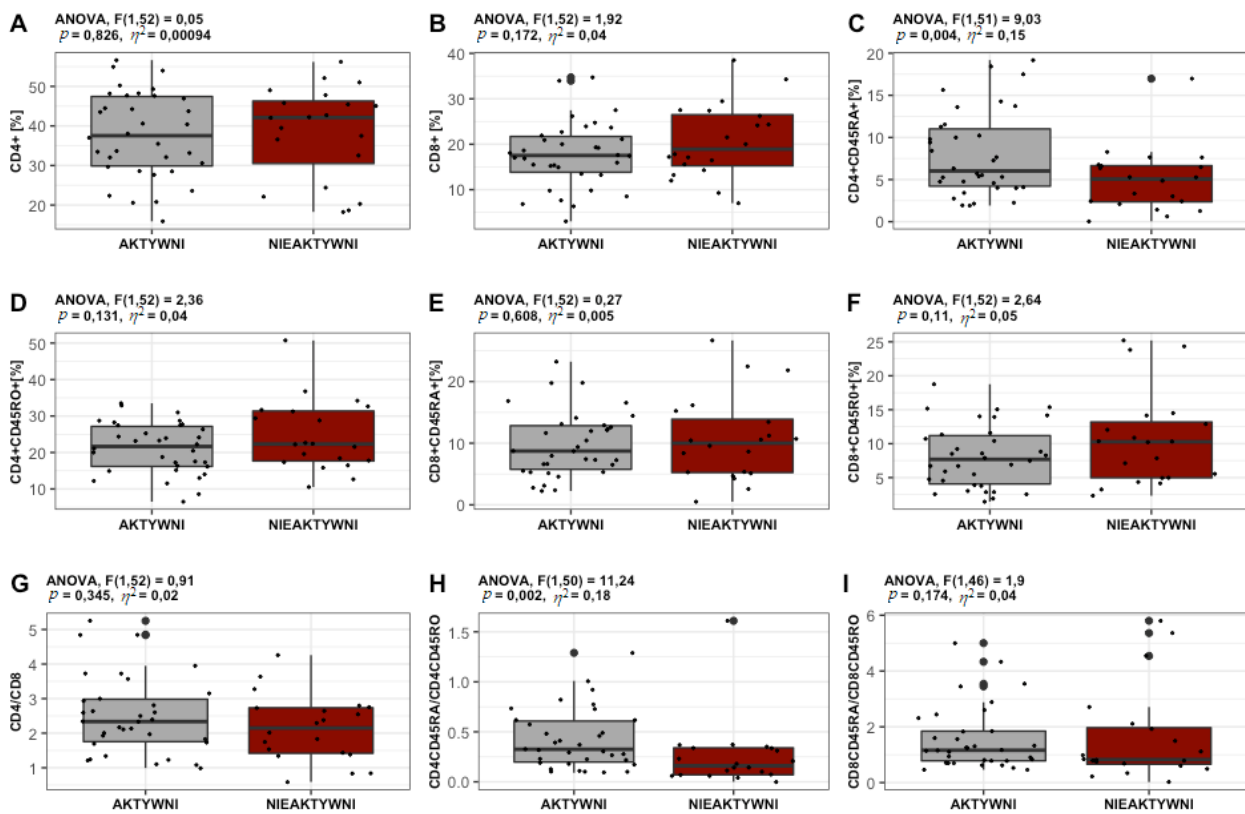
2.2. Ocena sprawności funkcjonalnej i poziomu wydolności fizycznej

Uczestnicy badań reprezentujący wysoki poziom sprawności funkcjonalnej (prędkość chodu między 1,3-1,8 m/s i poziom VO₂max >35 mL/kg/min) charakteryzowali się wyższą wartością odsetka populacji limfocytów T CD4⁺CD45RA⁺ i wyższym stosunkiem CD4CD45RA/CD4CD45RO w porównaniu do grupy nieaktywnej fizycznie. Osoby poruszające się z prędkością <1,3 m/s i wartością VO₂max ≤ 35 mL/kg/min wykazywały zarówno wyższy odsetek limfocytów T CD4⁺CD45RO⁺, jak i limfocytów T CD8⁺CD45RO⁺, co nie wpłynęło na stosunek CD4CD45RA/CD4CD45RO. Podobnych obserwacji dokonali Spielmann i wsp. [2011] u osób starszych z wysokimi wartościami VO₂max $47,3 \pm 0,9$ mL/kg/min, którzy charakteryzowali się mniejszą liczbą starzejących się limfocytów T o fenotypie CD28⁻CD57⁺, CD4⁺ i CD8⁺ i większą liczbą dziewiczych komórek T CD8⁺ w porównaniu do osób z VO₂max $43 \pm 0,6$ ml/kg/min. Apostolopoulos i wsp. [2014] w badaniu obejmującym 17 013 osób w wieku powyżej 12 lat wykazali, że osoby nieaktywne fizyczne przez większość swojego życia są do 50% bardziej narażone na przedwczesną śmierć w porównaniu do osób starszych podejmujących aktywność fizyczną nawet o niskiej lub umiarkowanej intensywności. Według Wen i wsp. [2011] 15 minut dziennie (lub 90 minut w tygodniu) dynamicznego marszu z prędkością chodu 1,34 m/s istotnie redukuje śmiertelność i wydłuża oczekiwaną długość życia.

2.3. Analiza immunofenotypowa limfocytów T

Analiza immunofenotypowa limfocytów T u osób aktywnych fizycznie pokazała zmniejszony odsetek limfocytów T $CD4^+CD45RO^+$ i $CD8^+CD45RO^+$ (ryc. 1D i ryc. 1F), a także limfocytów T cytotoksycznych $CD8^+$ (ryc. 1B). W tej samej grupie stwierdzono także istotnie wyższy odsetek $CD4^+CD45RA^+$ (ryc. 1C) i stosunek $CD4CD45RA/CD4CD45RO$ (ryc. 1H). Wartość η^2 wskazuje na silny wpływ ćwiczeń związanych ze stylem życia odsetek limfocytów T $CD4^+CD45RA^+$ jak i na stosunek $CD4/CD45RA/CD4CD45RO$. Według Weyh i wsp. [2020] odmłodzenie układu odpornościowego u osób aktywnych może wiązać się ze wzrostem IL-15 aktywującej limfocyty T dziewicze. W przypadku analizy profilu odpornościowego ryzyka IRP wyrażonego stosunkiem liczby limfocytów pomocniczych $CD4^+$ do cytotoksycznych $CD8^+$ zaobserwowano różnice pomiędzy grupami. Około 60% aktywnych fizycznie seniorów charakteryzowało się $CD4/CD8$ w przedziale wartości referencyjnych między ≥ 1 a $\leq 2,5$, co klasyfikuje tę grupę jako reprezentantów pomyślnego starzenia się. Stosunek $CD4/CD8 < 1$ zaobserwowano jedynie u 3% aktywnych fizycznie. Natomiast w grupie nieaktywnych fizycznie, 45% badanych wykazywało $CD4/CD8$ w przedziale wartości referencyjnych ≥ 1 a $\leq 2,5$, 40% wykazywało $CD4/CD8 > 2,5$, a 15% wykazywało $CD4/CD8 < 1$.

Zaobserwowano wyraźny związek zawartości tkanki tłuszczowej z IRP w obu grupach badanych. Osoby aktywne z prawidłowym BMI charakteryzowały się stosunkiem $CD4/CD8$ w przedziale wartości referencyjnej między ≥ 1 a $\leq 2,5$, natomiast z nadwagą wykazywały $CD4/CD8 > 2,5$. Wśród nieaktywnych fizycznie 30% osób miało nadwagę i charakteryzowało się odwróconym stosunkiem $CD4/CD8 < 1$, natomiast 67% nieaktywnych z otyłością wykazywało $CD4/CD8 > 2,5$ (tab. 4).



Rycina 1. Zmiany w odsetku CD4⁺ (A) i CD8⁺ T limfocytów (B) CD4⁺CD45RA⁺ T limfocytów (C) CD4⁺CD45RO⁺ T limfocytów (D), CD8⁺CD45RA⁺ T limfocytów (E) i CD8⁺CD45RO⁺ T limfocytów (F) oraz między stosunkami CD4/CD8 (G) CD4CD45RA/CD4CD45RO (H) and CD8CD45RA/CD8CD45RO (I) pomiędzy aktywnymi a nieaktywnymi starszymi osobami.

Tabela 4. Zmiany stosunku CD4/CD8 w zależności od wartości wskaźnika masy ciała (BMI).

	Aktywni <i>n</i> =34			Nieaktywni <i>n</i> =20		
CD4/CD8	<1	≥ 1 a ≤ 2,5	>2,5	<1	≥ 1 a ≤ 2,5	>2,5
Prawidłowa masa ciała BMI 18,5-24,9 kg/m ²	0%	60%	40%	10%	60%	30%
Nadwaga BMI 25,0-29,9 kg/m ²	0%	53%	47%	28,6%	28,6%	42,8%
Otyłość BMI ≥30 kg/m ²	14,3%	57,1%	28,6%	0%	33,3%	66,7%

2.4. Status IgG CMV a zmiany w subpopulacjach komórek immunologicznych

W grupie aktywnych fizycznie, 88% badanych było seropozytywnych wobec CMV (IgG CMV⁺ 98,1 ± 21,21 DU/mL). W grupie nieaktywnej fizycznie 100% badanych było seropozytywnych wobec CMV (IgG CMV⁺ 92,3 ± 22,8 DU/mL). Występowanie CMV jest powszechne. Według autorów, swoiste przeciwciała IgG skierowane przeciw CMV są

wykrywane u 40% do 80% mieszkańców Europy [Gaj i wsp. 2012]. Cytotoksyczna reakcja niszczenia komórek zainfekowanych CMV podlega restrykcji MHC oraz jest regulowana poprzez wydzielanie szeregu cytokin [Hansson i wsp. 1989]. Istnieje wiele dowodów na to, że wirus CMV odgrywa znaczącą rolę w reorganizacji limfocytów T. Pawelec i wsp. [2012] wykazali, że infekcja CMV obniża liczbę limfocytów T dziewiczych i zwiększa odsetek limfocytów T pamięci. Przeprowadzone przez nas badania pokazały istotne różnice w liczbie limfocytów T CD4⁺CD45RA⁺ i między stosunkiem CD4CD45RA/CD4CD45RO pomiędzy aktywnymi fizycznie IgG CMV⁺ w porównaniu do nieaktywnych fizycznie IgG CMV⁺. Najwyższy stosunek CD4/CD8 zaobserwowano w grupie aktywnych seniorów seronegatywnych wobec CMV w porównaniu zarówno do grupy aktywnych seropozytywnych względem CMV, jak i do grupy nieaktywnych seropozytywnych wobec CMV. (tab. 5). Jednak ze względu na małą liczebność seronegatywnych wobec CMV (aktywni IgG CMV⁻ n=4) nie jest możliwe wyciągnięcie wiarygodnych wniosków dotyczących związku zakażenia CMV ze zmianami stosunku CD4/CD8 w badanej grupie.

Tabela 5. Zmiany w subpopulacjach limfocytów T o odpowiedzi na obecność przeciwciał przeciw cytomegalovirus CMV ($\bar{x} \pm SD$).

Bezwzględna liczba limfocytów T [μ L]	Aktywni IgG CMV ⁺ n=30	Aktywni IgG CMV ⁻ n=4	p level	η^2	Nieaktywni IgG CMV ⁺ n=20	Aktywni vs. Nieaktywni p level	η^2
CD4 ⁺	922,4 \pm 349,6	569,0 \pm 356,0	0,067	0,101	846,3 \pm 506,4	0,258	0,008
CD8 ⁺	434,5 \pm 226,9	265,2 \pm 164,8	0,198	0,060	446,7 \pm 262,7	0,992	0,001
CD4 ⁺ CD45RA ⁺	189,0 \pm 112,8	128,9 \pm 120,8	0,337	0,030	108,0 \pm 88,3	<0,01	0,132
CD4 ⁺ CD45RO ⁺	518,2 \pm 219,5	319,5 \pm 221,0	0,099	0,083	579,8 \pm 568,8	0,589	0,006
CD8 ⁺ CD45RA ⁺	247,6 \pm 149,7	123,8 \pm 103,9	0,118	0,074	230,1 \pm 164,5	0,536	0,003
CD8 ⁺ CD45RO ⁺	192,8 \pm 114,3	145,2 \pm 137,1	0,453	0,018	252,7 \pm 299,5	0,977	0,020
CD4/CD8	2,5 \pm 1,0	2,8 \pm 1,8	0,541	0,012	2,1 \pm 1,0	0,294	0,023
CD4CD45RA/CD4CD45RO	0,4 \pm 0,3	0,4 \pm 0,2	0,777	0,000	0,3 \pm 0,3	<0,001	0,061
CD8CD45RA/CD8CD45RO	1,6 \pm 1,2	1,0 \pm 0,3	0,393	0,038	1,6 \pm 1,7	0,350	0,000

2.5. Analiza morfologii krwi obwodowej

Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy limfocytami, %LYM, %GRA, MCV, MCHC, MCH w grupie osób aktywnych fizycznie w porównaniu do nieaktywnych uczestników badania. Jedynie istotne różnice pomiędzy wykazano w przypadku liczby płytek krwi. W grupie osób aktywnych wykazano jedynie tendencję do

wyższych wartości parametrów czerwokrwinkowych takich jak: Hb, RBC i HCT (tab. 6).

Wartość η^2 wskazuje na umiarkowany wpływ aktywnego stylu życia na stężenie Hb.

Tabela 6. Wartości parametrów hematologicznych w grupie aktywnej i nieaktywnej fizycznie ($x \pm SD$).

	Wartości referencyjne	Aktywni <i>n</i> =34	Nieaktywni <i>n</i> =20	Aktywni vs. Nieaktywni <i>p</i> level	η^2
WBC [$10^3/\mu\text{L}$]	5,0 - 11,6	6,7 \pm 2,1	6,5 \pm 2,0	0,740	0,055
Limfocyty [$10^3/\mu\text{L}$]	1,3 - 4,0	2,3 \pm 0,6	2,2 \pm 0,9	0,119	0,002
Granulocyty [$10^3/\mu\text{L}$]	2,4 - 7,6	3,9 \pm 1,6	3,8 \pm 1,4	0,851	0,076
LYM %	19,1 - 48,5	35,5 \pm 7,6	33,7 \pm 9,0	0,486	0,003
GRA %	43,6 - 73,4	57,2 \pm 9,2	57,2 \pm 9,0	0,981	0,000
RBC [$10^3/\mu\text{L}$]	K 4,0 - 5,5 M 4,5 - 6,6	4,8 \pm 0,3	4,7 \pm 0,3	0,209	0,054
Hb [g/dL]	K 12,5 - 16,0 M 13,5 - 18,0	13,9 \pm 0,7	13,7 \pm 0,8	0,513	0,108
HCT [%]	K 37 - 47 M 40,0 - 51,0	39,5 \pm 2,0	38,6 \pm 2,4	0,201	0,031
MCV [fL]	K 80 - 95 M 80 - 97	81,9 \pm 3,0	81,7 \pm 2,6	0,950	0,048
MCH [pg]	K 27,0 - 32,0 M 26,0 - 32,0	28,7 \pm 1,3	29,0 \pm 1,1	0,395	0,054
MCHC [g/dL]	K 32,0 - 36,0 M 31,0 - 36,0	35,1 \pm 0,8	35,5 \pm 0,6	0,330	0,018
PLT [$10^3/\mu\text{L}$]	150 - 400	270 \pm 60	236 \pm 39	<0,01	0,031

WBC liczba białych krwinek, LYM limfocyty, GRA granulocyty, RBC liczba krwinek czerwonych, Hb hemoglobina, HCT hematokryt, MCV średnia objętość krwinki czerwonej, MCH średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej, MCHC średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej, PLT liczba płytek krwi, K kobiety, M mężczyźni

2.6. Analiza biochemiczna

Analiza lipidogramu nie wykazała różnic istotnych statystycznie pomiędzy aktywnymi a nieaktywnymi starszymi osobami. Stężenia powyżej wartości referencyjnych (TC >200 mg/dL) zaobserwowano u 87%, co było związane z nieprzyjmowaniem przez badanych leków hipolipemicznych. Pomiar stężenia CRP jest markerem uogólnionego stanu zapalnego. Wysokie stężenia CRP >3 mg/L stwierdzono u 25% aktywnych fizycznie i 30% nieaktywnych fizycznie seniorów (tab. 7). Analiza wielkości efektu (η^2) nie wykazała wpływu aktywności fizycznej na stężenie glukozy, elementy profilu lipidów i stężenie CRP. Pomimo, że między grupami nie było różnic istotnych statystycznie, stężenie CRP ujemnie

korelowało z prędkością chodu ($r=-0,350$, $p<0,05$). Potwierdza to obserwacje Gleeson i wsp. [2011], że regularna aktywność fizyczna obniża ogólnoustrojową odpowiedź zapalną.

Tabela 7. Porównanie glukozy, profilu lipidowego i białka CRP między aktywnymi a nieaktywnymi fizycznie uczestnikami badania ($\bar{x} \pm SD$).

	Wartości referencyjne	Aktywni <i>n</i>=34	Nieaktywni <i>n</i>=20	Aktywni vs. Nieaktywni <i>p</i> level	η^2
Glukoza [mg/dL]	60 - 115	98,6 ± 17,1	97,6 ± 20,3	0,452	0,000
TG [mg/dL]	<150	90,2 ± 25,7	83,7 ± 26,0	0,375	0,000
TC [mg/dL]	<200	262,4 ± 52,6	251,3 ± 59,1	0,534	0,013
LDL [mg/dL]	<130	147,1 ± 40,3	149,1 ± 50,8	0,889	0,000
HDL [mg/dL]	>60	82,2 ± 16,0	81,1 ± 11,8	0,603	0,023
nie-HDL [mg/dL]	<130	180,2 ± 54,7	170,2 ± 65,5	0,599	0,047
CRP [mg/L]	0,068 - 8,2	3,2 ± 2,5	2,8 ± 3,1	0,121	0,004

TG trójglicerydy, TC całkowity cholesterol, LDL lipoproteiny o niskiej gęstości, HDL lipoproteiny o wysokiej gęstości, CRP białko C-reaktywne

IV. Podsumowanie i wnioski

Z przeglądu literatury dokonanego przez Tylutka i Zembron-Lacny [Immunological aging and clinical consequences. Postepy Hig Med. Dosw 2020; 74: 260-271. doi:10.5604/01.3001.0014.3054] wynika, że ocena zmian subpopulacji limfocytów T, B i komórek NK we krwi obwodowej osób po 60 roku życia jest istotna w prognozowaniu zaburzeń metabolicznych lub nasilenia objawów chorób współistniejących. Zakażenie wirusem cytomegalii CMV oraz czynniki środowiskowe, jak zanieczyszczenie środowiska, jakość diety i aktywność fizyczna mogą wpływać na profil odpornościowego ryzyka (ang. *immune risk profile*, IRP) przyspieszając lub spowalniając starzenie układu immunologicznego, a w konsekwencji starzenie się całego organizmu. IRP może być wyrażony poprzez pomiar mediatorów zapalenia i/lub stosunku liczby limfocytów T CD4⁺ do limfocytów T CD8⁺ we krwi obwodowej. Pierwsze obserwacje dokonane w latach 90-tych pokazały, że obniżenie wartości IRP <1 skutkuje wyższą śmiertelnością w ciągu kolejnych lat obserwacji.

Analiza wyników badań przedstawionych w publikacji Tylutka i wsp. [Lifestyle exercise attenuates immunosenescence; flow cytometry analysis. BMC Geriatr 2021; 21: 200. doi: 10.1186/s12877-021-02128-7] pokazała, że:

1. Aktywność fizyczna podejmowana przez całe życie (ang. *lifestyle exercise*) spowalnia immunosenescencję, a nawet „odmładza” układ immunologiczny → odsetek limfocytów T dziewiczych o fenotypie CD4⁺CD45RA⁺ i stosunek CD4CD45RA/CD4CD45RO były istotnie wyższe u aktywnych fizycznie (prędkość chodu 1,5 ± 0,1 m/s) w porównaniu do nieaktywnych osób (prędkość chodu 1,0 ± 0,1 m/s).
2. Aktywny styl życia istotnie wpływa na profil odpornościowego ryzyka IRP → stosunek CD4/CD8 w przedziale referencyjnym między ≥1 a ≤2,5 stwierdzono u około 60% aktywnych fizycznie, podczas gdy odwrócony stosunek CD4/CD8 (wartości <1) obserwowano głównie w grupie nieaktywnych fizycznie seniorów.
3. Niska aktywność fizyczna i wysoka zawartość tkanki tłuszczowej nasilają immunosenescencję i stwarzają szczególne ryzyko zaburzeń metabolicznych u osób starszych → zawartość tkanki tłuszczowej wysoko korelowała z liczbą CD4⁺ i CD4⁺CD45O⁺ w grupie nieaktywnych osób.

V. Piśmiennictwo

1. Apostolopoulos V, Borkoles E, Polman R, Stojanovska L. Physical and immunological aspects of exercise in chronic diseases. *Immunotherapy* 2014; 6: 1145-1157.
2. Åstrand PO. Human physical fitness with special reference to sex and age. *Physiol Rev* 1956; 36: 307-335.
3. Bartlett DB, Fox O, McNulty CL, Greenwood HL, Murphy L, Sapey E, et al. Habitual physical activity is associated with the maintenance of neutrophil migratory dynamics in healthy older adults. *Brain Behav Immun* 2016; 56: 12-20.
4. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). Hillsdale, NJ: Erlbaum; 1988.
5. Corley J, Shivappa N, Hébert JR, Starr JM, Deary IJ. Associations between dietary inflammatory index scores and inflammatory biomarkers among older adults in the Lothian Birth Cohort 1936 Study *J Nutr Health. Aging* 2019;23: 628-636.
6. Drela N. Immunologiczna teoria starzenia. *Post. Bioch* 2014; 60: 221-232.
7. Fuentes E, Fuentes M, Alarcón M, Palomo I. Immune system dysfunction in the elderly. *AnAcad Bras Cienc* 2017; 89: 285-299.
8. Fülöp T, Larbi A, Dupuis G, Le Page A, Frost EH, Cohen AA, Witkowski JM, Franceschi C. Immunosenescence and inflamm-aging as two sides of the same coin: friends or foes? *Front Immunol* 2018; 8: 1960.
9. Gaj Z, Rycel M, Wilczyński J, Nowakowska D. Seroprewalencja zakażeń cytomegalowirusem w populacji polskich kobiet ciężarnych. *Ginekol Pol* 2012; 83: 337-341
10. Gala K, Burdzinska A, Paczek L. Mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego a starzenie. *Post. Biol. Komórki* 2010; 37: 89-106.
11. Geard D, Rebar AL, Dionigi RA, Reaburn PRJ. Testing a model of successful aging on masters' athletes and non-sporting adults. *Res Q Exerc Sport* 2020; 6:1-10.
12. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Rev Immunol* 2011; 11: 607-15.
13. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The Anti-Inflammatory Effects of Exercise: Mechanisms and Implications for the Prevention and Treatment of Disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 607–615, doi:10.1038/nri3041.
14. Hang J, Huang J, Zhou S, Wu L, Zhu Y, Zhu L, Zhou H, Xu K, Jiang H, Yang X. The clinical implication of CD45RA+ naïve T cells and CD45RO+ memory T cells in advanced pancreatic cancer: a proxy for tumor biology and outcome prediction. *Cancer Med* 2019; 8: 1326–1335.
15. Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 1989; 135: 169.
16. Holland AE, Spruit MA, Troosters T, Puhon MA, Pepin V, Saey D, et al. An official European Respiratory Society/American Thoracic Society technical standard: field walking tests in chronic respiratory disease. *Eur Respir J* 2014; 44: 1428-1446.
17. Hu B, Jadhav RR, Gustafson CE, Le Saux S, Ye Z, Li X, Tian L, Weyand CM, Goronzy JJ. Distinct Age-Related Epigenetic Signatures in CD4 and CD8 T Cells. *Front Immunol* 2020; 11: 585168. doi: 10.3389/fimmu.2020.585168. eCollection 2020.
18. Inoue S, Saito M, Kotani J. Immunosenescence in neurocritical care. *J Intensive Care* 2018; 6: 65.
19. Kohut ML, Lee W, Martin A, Arnston B, Russell DW, Ekkekakis P, Yoon KJ, Bishop A, Cunnick JE. The exercise-induced enhancement of influenza immunity is

- mediated in part by improvements in psychosocial factors in older adults. *Brain Behav Immun* 2005; 19: 357-366.
20. Lara J, Cooper R, Nissan J, Ginty AT, Khaw KT, Deary IJ, Lord JM, Kuh D, Mathers JC. A proposed panel of biomarkers of healthy ageing. *BMC Med* 2015; 13: 222.
 21. Lee IM, Shiroma EJ, Kamada M, Bassett DR, Matthews CE, Buring JE. Association of step volume and intensity with all-cause mortality in older women. *JAMA Intern. Med* 2019; 179: 1105-1112.
 22. Lynch LA, O'Connell JM, Kwasnik AK, Cawood TJ, O'Farrelly C, O'Shea DB. Are natural killer cells protecting the metabolically healthy obese patient? *Obesity. (Silver Spring)* 2009; 17: 601-605.
 23. McBride JA, Striker R. Imbalance in the game of T cells: What can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? *PLoS Pathog* 2017; doi: 10.1371/journal.ppat.1006624.
 24. Middleton A, Fritz SL, Lusardi M. Walking speed: the functional vital sign. *J Aging Phys Act* 2015; 23: 314-322.
 25. Miles J, Shevlin M. *Applying regression and correlation: a guide for students and researchers.* Sage: London; 2001.
 26. Murray MA, Chotirmall SH. The Impact of immunosenescence on pulmonary disease. *Mediators. Inflamm* 2015; 2015: 692546.
 27. O'Rourke RW, Kay T, Scholz MH, Diggs B, Jobe BA, Lewinsohn DM, Bakke AC. Alterations in T-cell subset frequency in peripheral blood in obesity. *Obes Surg* 2005; 15: 1463-1468.
 28. O'Shea D, Cawood TJ, O'Farrelly C, Lynch L. Natural killer cells in obesity: impaired function and increased susceptibility to the effects of cigarette smoke. *PLoS One* 2010; 5: e8660.
 29. Palmer DB. The effect of age on thymic function. *Front Immunol* 2013; 4: 316.
 30. Panda A, Qian F, Mohanty S, van Duin D, Newman FK, Zhang L, Chen S, Towle V, Belshe RB, Fikrig E, Allore HG, Montgomery RR, Shaw AC. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J Immunol* 2010; 184: 2518-2527.
 31. Pawelec G, McElhaney JE, Aiello AE, Derhovanessian E. The impact of CMV infection on survival in older humans. *Curr Opin Immunol* 2012; 24: 507-511.
 32. Pawelec G. Immune signatures associated with mortality differ in elderly populations from different birth cohorts and countries even within northern Europe. *Mech. Ageing Dev* 2019; 177: 182-185.
 33. R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing. Vienna Austria, 2020; <https://www.R-project.org/>
 34. Santoro A, Bientinesi E, Monti D. Immunosenescence and inflammaging in the aging process: age-related diseases or longevity? *Ageing Res Rev* 2021; 71: 101422. doi: 10.1016/j.arr.2021.101422. Epub 2021 Aug 13.
 35. Shirakawa K, Sano M. T Cell Immunosenescence in aging, obesity, and cardiovascular disease. *Cells* 2021; 10: 2435.
 36. Simoni M, Baldacci S, Maio S, Cerrai S, Sarno G, Viegi G. Adverse effects of outdoor pollution in the elderly. *J Thorac Dis* 2015; 7: 34-45.
 37. Spielmann G, McFarlin BK, O'Connor DP, Smith PJW, Pircher H, Simpson RJ. Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man. *Brain Behav Immun* 2011; 25: 1521-1529. doi: 10.1016/j.bbi.2011.07.226.
 38. Strindhall J, Skog M, Ernerudh J, Bengner M, Löfgren S, Matussek A, Nillson BO, Wikby A. The inverted CD4/CD8 ratio and associated parameters in 66-year-old individuals: the Swedish HEXA immune study. *Age (Dordr.)* 2013; 35: 985-991.

39. Tanaka S, Isoda F, Ishihara Y, Kimura M, Yamakawa T. T lymphopaenia in relation to body mass index and TNF-alpha in human obesity: adequate weight reduction can be corrective. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001; 54: 347-354.
40. Tylutka A, Zembroń-Łacny A. Immunological aging and clinical consequences. *Postepy Hig Med. Dosw* 2020; 74: 260-271. doi: 10.5604/01.3001.0014.3054
41. Tylutka A, Morawin B, Gramacki A, Zembron-Lacny A. Lifestyle exercise attenuates immunosenescence; flow cytometry analysis. *BMC Geriatr* 2021; 21: 200. doi: 10.1186/s12877-021-02128-7.
42. Tylutka A, Morawin B, Zembroń-Łacny A. Fizjologia starzenia się. W: *Fizjologia człowieka. Podstawy* (red. Hanna Krauss, Magdalena Gibas-Dorna) Wyd. Lekarskie PZWL Warszawa 2021: s. 515-528.
43. van der Weerd K, Dik WA, Schrijver B, Schweitzer DH, Langerak AW, Drexhage HA, et al. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4+ T cells with skewing toward a treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes* 2012; 61: 401-408.
44. Wawrzyniak-Gramacka E, Hertmanowska N, Wacka E, Tylutka A, Morawin B, Gutowicz M, Zembron-Lacny A. The association of anti-inflammatory diet ingredients and lifestyle exercise with inflammaging. *Nutrients* 2021; doi: 10.3390/nu12071933.
45. Wen ChP, Wai JPM, Tsai MK, Yang YC, Cheng TY, Lee MC, Chan HT, Tsao CK, Tsai SP, Wu X. Minimum amount of physical activity for reduced mortality and extended life expectancy: a prospective cohort study. *Lancet* 2011; 378:1244-1253.
46. Weyh C, Krüger K, Strasser B. Physical Activity and Diet Shape the Immune System during Aging. *Nutrients* 2020; 12: 622, doi: 10.3390/nu12030622.
47. Wikby A, Johansson B, Ferguson FG. The OCTO and NONA immune longitudinal studies: a review of 11 years studies of Swedish very old humans. *Advances in Cell Aging and Gerontology* 2002; 13: 1-16.
48. Wikby A, Ferguson F, Forsey R, Thompson J, Strindhall J, Löfgren S, Nilsson BO, Ernerudh J, Pawelec G, Johansson B. An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J Gerontol A Biol Sci Med. Sci* 2005; 60: 556-565.
49. Wikby A, Nilsson BO, Forsey R, Thompson J, Strindhall J, Löfgren S, Ernerudh J, Pawelec G, Ferguson F, Johansson B. The immune risk phenotype is associated with IL-6 in the terminal decline stage: findings from the Swedish NONA immune longitudinal study of very late life functioning. *Mech Ageing Dev* 2006; 127: 695-704.
50. Womack J, Tien PC, Feldman J, Shin JH, Fennie K, Anastos K, et al. Obesity and immune cell counts in women. *Metabolism* 2007; 56: 998–1004.
51. Woods JA, Davis JM, Smith JA, Nieman DC. Exercise and cellular innate immune function. *Med. Sci Sports Exerc* 1999; 31: 57-66.
52. Zembron-Lacny A, Dziubek W, Rynkiewicz M, Morawin B, Woźniewski M. Peripheral brain-derived neurotrophic factor is related to cardiovascular risk factors in active and inactive elderly men. *Braz J MedBiol Res.* 2016; doi: 10.1590/1414-431X20165253.
53. Zembron-Lacny A, Dziubek W, Wolny-Rokicka, Dabrowska G, Woźniewski M. The relation of inflammaging with skeletal muscle properties in elderly men. *Am J Mens Health.* 2019;13; doi: 10.1177/1557988319841934.

Received: 09.09.2019
Accepted: 05.05.2020
Published: 08.07.2020**Starzenie się układu immunologicznego i jego konsekwencje dla zdrowia****Immunological aging and clinical consequences****Anna Tylutka, Agnieszka Zembroń-Łacny**

Katedra Fizjologii Stosowanej i Klinicznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Zielonogórski

Streszczenie

Starzenie się układu odpornościowego, określane terminem immunosenescencji (immunosenescence), jest procesem postępującym i nieodwracalnym obejmującym obniżenie liczby dziewiczych limfocytów T i limfocytów B, aktywności cytotoksycznej komórek NK oraz zaburzenia równowagi pro- i przeciwzapalnej poprzez zmiany wytwarzania IL-2, -4, -6, -10, -17, TNF- α , IFN- γ i in. Z wiekiem nasila się autoimmunizacja i uogólniony stan zapalny z jednoczesnym deficytem immunologicznym, zwiększając podatność na choroby infekcyjne, obniżając reaktywność na szczepienia profilaktyczne, zachorowalność na choroby autoimmunologiczne. Zwiększa się ryzyko infekcyjnych powikłań urazów, zaostrzają się objawy chorób przewlekłych z niedostateczną reakcją na obecność komórek nowotworowych. Od lat na podstawie analizy częstotliwości zakażeń wirusowych i bakteryjnych, wskaźników immunologicznych i zapalenia podejmowane są próby opracowania profilu odpornościowego ryzyka (immune risk profile, IRP) oraz skutecznych metod profilaktyki zaburzeń funkcji układu immunologicznego i przedłużenia sprawności funkcjonalnej osób starszych.

Słowa kluczowe:**immunosenescencja • limfocyty T • limfocyty B • komórki NK • profil odpornościowego ryzyka****Summary**

Immunosenescence is defined as the changes in the immune system associated with age. It is a progressive and irreversible process involving a decrease in the number of naïve T and B cells, NK cells cytotoxic and activity, and disruption of pro and anti-inflammatory balance by altering the production of IL-2, -4, -6, -10, -10, TNF- α , interferon γ and others. With age there is an increase in autoimmunity and generalized inflammation with simultaneous immunodeficiency, which results in greater susceptibility to infectious diseases, a decrease in reactivity to prophylactic vaccinations, the incidence of autoimmune diseases, and increased risk of infectious injury complications, exacerbation of symptoms of chronic diseases and an insufficient response to the presence of cells cancer. For years, based on the analysis of the frequency of viral and bacterial infections, immunological indicators and inflammation, attempts have been made to develop the immune risk profile (IRP) and effective methods of preventing disorders of the immune system and prolonging the functional capacity of the elderly.

Keywords:**immunosenescence • T lymphocytes • B lymphocytes • NK cells • immune risk profile**

GICID	01.3001.0014.3054
DOI:	10.5604/01.3001.0014.3054
Word count:	6319
Tables:	5
Figures:	1
References:	80

Adres autorki: mgr Anna Tylutka, Katedra Fizjologii Stosowanej i Klinicznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Zielonogórski, ul. Zyty 28, 65-046 Zielona Góra, e-mail: a.tylutka@cm.uz.zgora.pl

Wykaz skrótów: **AD** – choroba Alzheimera (Alzheimer's disease), **AGT1R** – receptor angiotensyny II typu 1 (angiotensin II type 1 receptor), **CD** – antygen różnicowania powierzchniowego (cluster of differentiation), **BCL-2** – rodzina endogennych białkowych regulatorów apoptozy (B cell leukemia/lymphoma 2), **CMV** – wirus cytomegalii (cytomegalovirus), **DN** – komórki podwójnie negatywne (double negative cells), **DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy (deoxyribonucleic acid), **DP** – komórki podwójnie pozytywne (double positive cells), **ETP** – wczesne komórki pregenitorowe limfocytów T (earliest thymic progenitors), **HSC** – hematopoetyczne komórki macierzyste (hematopoietic stem cell), **IFN-γ** – interferon gamma (interferon gamma), **IL-1β, -2, -4, -5, -6, -7, -10, -17, -23** – interleukiny IL-1β, -2, -4, 5, -6, -7, -10, -17, 23), **IRP** – profil odpornościowego ryzyka (immune risk profile), **KIR** – immunoglobulinopodobny receptor komórki cytotoksycznej (killer cell immunoglobulin-like receptors), **LIR** – immunoglobulinopodobne receptory leukocytów (leukocyte immunoglobulin-like receptor), **mCRP** – monomeryczna postać białka C-reaktywnego (monomeric C-reactive protein), **MHC** – główny układ zgodności tkankowej (major histocompatibility complex), **MIP1α** – białko zapalne 1α makrofagów (macrophage inflammatory protein 1α), **MM** – szpiczak mnogiej (multiple myeloma), **NCR** – receptory naturalnej cytotoksyczności (natural cytotoxicity receptors), **nCRP** – natywna postać białka C-reaktywnego (native C-reactive protein), **NK** – komórki naturalni zabójcy (natural killer cell), **NKG2C** – receptor aktywujący znajdujący się na komórkach NK (killer cells lectin-like receptor C2), **NKG2D** – receptor aktywujący znajdujący się na komórkach NK (killer cell lectin-like receptor, subfamily K, member 1), **NKp30** – receptor naturalnej cytotoksyczności o właściwościach aktywujących NKp30 (natural cytotoxicity receptor p30), **NKp46** – receptor naturalnej cytotoksyczności o właściwościach aktywujących NKp46 (natural cytotoxicity receptor p46), **NO** – tlenek azotu (nitric oxide), **ONOO** – nadtlenoazotyn (peroxynitrite), **PBMC** – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cell), **PD** – choroba Parkinsona (Parkinson's disease), **PGI2** – prostacyklina (prostacyclin), **RANTES** – chemokina β syntetyzowana przez limfocyty T (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted), **RZS** – reumatoidalne zapalenie stawów (rheumatoid arthritis), **TCM** – niespolaryzowane komórki centralnej pamięci limfocytów T (central memory T cells), **TCR** – receptor limfocyta T (T cells receptor), **TEC** – komórki nabłonkowe grasicy (thymic epithelial cells), **TEM** – spolaryzowane komórki T z pamięcią efektorową (effector memory T cells), **TGF-β** – transformujący czynnik wzrostu beta (transforming growth factor β), **Th1, Th2, Th17** – limfocyty T pomocnicze Th1, -2, -17 (T helper cells), **TLR** – receptory Toll podobne (Toll like receptor), **TNF-α** – czynnik martwicy nowotworów (tumor necrosis factor), **Treg** – komórki T regulatorowe (regulatory T cells), **VCAM** – cząsteczka adhezji komórkowej naczyń (vascular cell adhesion molecule), **VLA-4** – antygen 4 powierzchniowy limfocytów (very late antigen-4).

WPROWADZENIE

Zjawisko starzenia się populacji to problem demograficzny dotyczy społeczeństw Europy, a także innych wysoko rozwiniętych krajów świata. W ciągu najbliższych trzydziestu lat, liczba osób młodych będzie się zmniejszać, natomiast liczba wymagających wsparcia i opieki osób starszych stale rosnać. Szacuje się, że liczba osób powyżej 60. roku życia podwoi się z 901 milionów w 2015 r. do 2,1 miliarda w 2050 r. [59]. Starzenie się (senescence) jest złożonym procesem fizjologicznym obejmującym zmiany liczby, struktury i funkcji komórek oraz macierzy pozakomórkowej, pogarsza-

jąc sprawność czynnościową tkanek i narządów. Jedną z teorii starzenia zakłada, że komórki przestają się dzielić z powodu tzw. starzenia replikacyjnego, które jest wynikiem skracania telomerów. Komórki mogą również ulegać starzeniu niereplikacyjnemu na skutek zaburzeń mechanizmów epigenetycznych (acetylacji, metylacji, deacetylacji, ubikwitynacji), upośledzenia zdolności naprawy DNA, mutacji somatycznych, uszkodzeń wywołanych przez reaktywne formy tlenu i azotu oraz nagromadzenia zmienionych strukturalnie białek z powodu obniżenia aktywności proteasomów [28]. W latach 60. ub.w. amerykański gerontolog Roy Walford wprowadził termin starzenie immunologiczne (immunosenescence).

sce), opierając się na pewnego rodzaju paradoksie obserwowanym u starszych osób, tj. nasileniu autoimmunizacji i przewlekłego ponadprogowego stanu zapalnego z jednoczesnym deficytem immunologicznym. Późniejsze badania kliniczne potwierdziły słuszność koncepcji Walforda, że proces starzenia człowieka jest wynikiem zmian we właściwościach komórek immunologicznych i nieprawidłowo zachodzących procesów odpornościowych [tab. 1; 26]. Najważniejszymi cechami immunosenescencji jest obniżenie liczby dziewiczych limfocytów T, limfocytów B i zmniejszenie różnorodności występujących na ich powierzchni receptorów. Powoduje to słabszą odpowiedź immunologiczną, obniża miana wytwarzanych przeciwciał i uwalnianie interferonu przez plazmacytoidalne komórki dendrytyczne. Procesy te osłabiają odporność na zakażenia wirusowe i bakteryjne oraz zwiększają syntezę mediatorów reakcji zapalnej, powodując stały stan zapalny u starszych osób (inflammaging) [49, 53]. Z wiekiem nie zaobserwowano zmian całkowitej liczby komórek należących do odporności nieswoistej jak neutrofile, monocyty/makrofagi, ale wykazano zmniejszoną różnorodność w ich subpopulacjach i wrażliwość na apoptozę oraz spadek aktywności chemotaktycznej i fagocytarnej m.in. przez zmniejszone wytwarzanie tlenku azotu (NO) i nadtlenoazotynu (ONOO⁻). Wykazano wzrost liczby komórek NK (natural killer T cells), ale osłabienie ich cytotoksycznej aktywności przez redukcję syntezy proteaz serynowych, takich jak granzymy i perforyny. Obniża to zdolność naciekania przez neutrofile i makrofagi uszkodzonej tkanki i wydłuża czas gojenia, zwiększając ryzyko infekcyjnych powikłań urazów, zaostrzenia objawów chorób przewlekłych oraz niedostateczną reakcją na obecność komórek nowotworowych [17, 36]. W ostatnich latach zwrócono także uwagę na związek immunosenescencji z zaburzeniem mechanizmów epigenetycznych (epigenetic age). Z wiekiem zmienia się wzór metylacji DNA oraz stężenie acetylacji białek histonowych w populacji limfocytów T CD8⁺ i limfocytów Treg wyizolowa-

nych z jednojądrzastnych komórek krwi obwodowej (peripheral blood mononuclears cells, PBMCs), a to może być przyczyną wzrostu ryzyka rozwoju chorób przewlekłych, takich jak: reumatoidalne zapalenie stawów, wrzodziejące zapalenie jelit, cukrzyca typu 2 czy stwardnienie rozsiane [32, 38].

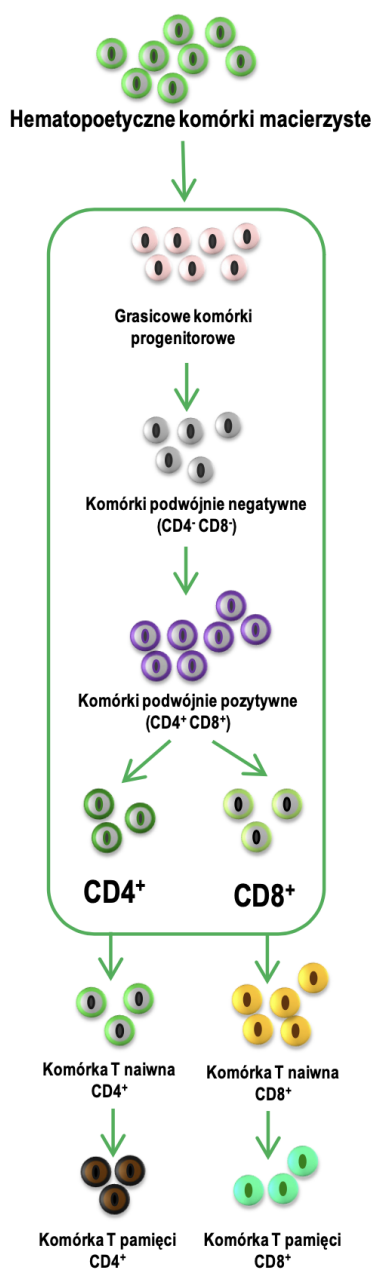
Poznanie zależności między starzeniem się organizmu a właściwościami komórek immunologicznych jest istotne dla zrozumienia zwiększonej podatności osób po 65. roku życia na choroby zakaźne i infekcyjne, zachorowalności na choroby niezakaźne, np.: nowotwory, cukrzyca typu 2, choroby sercowo-naczyniowe, choroby neurodegeneracyjne i choroby autoimmunologiczne [23].

LIMFOCYTY T

Limfocyty T są populacją komórek odporności swoistej, których funkcja w procesie starzenia najbardziej ulega upośledzeniu, co jest związane z zanikiem grasicy około 3% rocznie do wieku średniego i około 1% rocznie przez resztę życia. Inwolucja grasicy redukuje syntezę IL-7 przez komórki nabłonkowe grasicy niezbędnej do prawidłowego rozwoju i dojrzewania wczesnych prekursorów limfocytów T [45]. Zmniejsza to do 80% pulę dziewiczych limfocytów T oraz ich różnorodność we krwi obwodowej i tkankach limfatycznych u osób po 65. roku życia. Prekursory komórek T tworzone są w szpiku kostnym czerwonym z hematopoetycznych komórek macierzystych (hematopoietic stem cell, HSC). W małych ilościach docierają początkowo do grasicy, gdzie po interakcji z nabłonkiem powstają pierwsze grasicowe komórki progenitorowe (earliest thymic progenitors, ETP). Komórki przechodzą kolejne etapy dojrzewania – od komórek podwójnie negatywnych (double negative, DN) CD4⁻CD8⁻, poprzez komórki podwójnie pozytywne (double positive, DP) CD4⁺CD8⁺, do komórek funkcjonujących jako komórki pojedynczo pozytywne CD4⁺ lub CD8⁺ [ryc. 1; 62].

Tabela 1. Zmiany właściwości komórek immunologicznych obserwowane u osób starszych [17]

RODZAJ KOMÓREK	ZMIANY OBSERWOWANE Z WIEKIEM
Limfocyty T	zmniejszanie populacji komórek dziewiczych CD45RA CCR7+ wzrost populacji limfocytów pamięci CD45RO CCR7- ograniczenie różnorodności receptorów antygenów, tzw. repertuar TCR (T cells receptor) zwiększone uwalnianie cytokin prozapalnych
Limfocyty B	zmniejszenie liczby komórek dziewiczych wzrost subpopulacji komórek pamięci wzrost liczby limfocytów B-1 CD5+ wytwarzających autoprzeciwciała zaburzona interakcja między limfocytami T i B – zmniejszenie różnorodności przeciwciał zaburzone profile reearanżacji genów
Komórki NK	liczba komórek zwiększona niezmieniona synteza receptorów TLR (Toll like receptor) hamowanie syntezy cząstek kostymulujących zahamowanie chemotaksji, endocytozy, wytwarzania reaktywnych form tlenu



Ryc. 1. Dojrzwanie i różnicowanie limfocytów T

Dalszy rozwój i nabywanie kompetencji przez limfocyty T odbywa się w grasicy. Mikrośrodowisko grasicy dostarcza podstawowych mediatorów proliferacji i różnicowania komórek progenitorowych limfocytów T napływających ze szpiku kostnego. W dojrzywaniu limfocytów T uczestniczą komórki nabłonkowe grasicy (thymic epithelial cells, TEC) tworzące charakterystyczną organizację wewnętrzną z podziałem na specjalistyczne

obszary kory i rdzenia grasicy. Grasicca umożliwia rozwój immunokompetentnych komórek T, ale nie może ciągle uzupełniać nowych komórek progenitorowych. Widoczne z wiekiem dysproporcje w populacji limfocytów T są skutkiem zaniku grasicy, a właściwie zmniejszenia przestrzeni TEC i redukcji wytwarzania czynników grasiczo-hormonalnych, jak tyrozyny czy tymopoetyny. W wieku 70 lat TEC stanowi zaledwie 10% przestrzeni pierwotnej i jest zastępowana tkanką tłuszczową [17, 52].

Molekularne mechanizmy opisywanych zmian w grasicy nie są jeszcze dokładnie wyjaśnione. W 1984 r. Farr i wsp. [20] wskazali zależność między starzeniem się TEC ze zmniejszoną ekspresją cząsteczek układu zgodności tkankowej (major histocompatibility complex, MHC) a zmniejszonym wytwarzaniem tymopoetycznych cytokin. Badania Bendersa i wsp. [5] oraz Malanguangera i wsp. [45] wykazały, że fizjologicznemu starzeniu się towarzyszy spadek bezwzględnej liczby limfocytów T i komórek dziewiczych CD4⁺ i CD8⁺ oraz wzrost liczby limfocytów T pamięci. Zmienia się stosunek liczby limfocytów pomocniczych Th1 do Th2. Wzrost liczby subpopulacji limfocytów T pamięci wykazujących obniżenie ekspresji cząsteczki kostymulującej CD28 wymaganej do pełnej aktywacji limfocytów T osłabia odpowiedź immunologiczną. Skutkiem jest pojawienie się tzw. limfocytów anergicznyc, czyli niereagujących na stymulację antygenową zwłaszcza po 65. roku życia [45]. Puła limfocytów T dziewiczych CD4⁺ zmniejsza się około 70. roku życia. Natomiast zdecydowanie wcześniej następuje spadek liczby komórek dziewiczych CD8⁺ ze względu na ich większą wrażliwość na apoptozę [30, 73]. Nasiloną apoptozą w limfocytach T dziewiczych CD8⁺ wiąże się z obniżeniem stężenia białka antyapoptotycznego bcl-2 i wzrostem proapoptotycznych białek – kaspazy-8 i kaspazy-3 [33, 56].

Limfocyty T pamięci CD4⁺ i CD8⁺ zróżnicowano na dwie subpopulacje. Pierwsza subpopulacja to niespolaryzowane komórki centralnej pamięci (central memory T cells, TCM), które wykazują ekspresję chemokiny CCR7 [29]. TCM uczestniczą w odpowiedzi na antygeny głównie we wtórnych narządach limfatycznych, stymulują komórki dendrytyczne i wydzielają IL-2 [37]. Druga subpopulacja to spolaryzowane komórki T z pamięcią efektorową (effector memory T cells, TEM), które utraciły zdolność ekspresji chemokiny CCR7 i mogą migrować do tkanek nielimfatycznych [29]. TEM odznaczają się dużą aktywnością proliferacyjną, wydzielają IFN-γ i IL-4 i IL-5 [37]. Dotąd nie wyjaśniono skutków zmian liczby subpopulacji komórek T obserwowanych w procesie starzenia układu immunologicznego. Pierwsi zaobserwowali zmiany populacji komórek T dziewiczych i TCM u osób starszych Pilarski i wsp. [58]. Autorzy wykazali, że liczba komórek TCM z ekspresją receptora CCR7 jest wyższa u starszych osób, podczas gdy liczba komórek CCR7 jest istotnie wyższa u młodszych osób. Kang i wsp. [37] potwierdzili te badania, analizując zmiany populacji TCM, jak CD4⁺CD45RA⁺ i CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁺ oraz populacji TEM, jak CD4⁺CD45RA⁻CCR7⁻ u zdrowych osób w wieku

65 lat lub więcej, stosując cytometrię przepływową. Komórki z ekspresją chemokiny CCR7⁺ mają możliwość przekształcenia się w komórki pamięci efektorowej TEM, zapewniając ochronę przed patogenami. Zamiana komórek TCM CD4⁺ na komórki TEM CD4⁺ następuje kosztem obniżenia funkcji komórek TEM i osłabienia migracji w miejsce infekcji. Dysproporcje w opisywanych populacjach limfocytów T pamięci centralnej i efektorowej zdecydowanie przyczyniają się do osłabienia odpowiedzi immunologicznej u osób starszych [37].

LIMFOCYTY B

Limfocyty B pochodzą z hematopoetycznych komórek macierzystych (hemapoietic stem cell, HSC) znajdujących się w szpiku kostnym czerwonym. Z komórek HSC powstają komórki progenitorowe limfopoety, z których rozwijają się limfocyty T i B. Rozwój limfocytów B w szpiku jest procesem złożonym i dynamicznym obejmującym proliferację oraz selekcję komórek w mechanizmie apoptozy. Proces dojrzewania prekursorów limfocytów do komórek B z ekspresją immunoglobuliny jest związany z antygenami różnicowania (CD10, CD19, CD 21, CD23, CD34, CD45). Jest kontrolowany przez czynniki transkrypcyjne, oddziaływanie z komórkami podścieliska szpiku przez cząsteczki adhezyjne (VCAM-1, VLA-4) i cytokiny (IL-1 α , IL-4, IL-7, TGF- β i TNF- α) [9, 10]. Obserwowane z wiekiem zmiany liczby obwodowych komórek B są spowodowane zanikiem szpiku kostnego czerwonego oraz zmniejszonym wytwarzaniem IL-7, głównej cytokiny w rozwoju limfocytów B i obniżonej zdolności rearanżacji genów przeciwciał [48, 69, 72].

Limfocyty B po przejściu wszystkich etapów dojrzewania opuszczają szpik jako komórki dziewicze (naïve B cells) i charakteryzują się ekspresją IgD⁺ przy braku IgG⁻, IgA⁻ i CD27⁻ [6]. Ze względu na zredukowaną masę szpiku

kostnego czerwonego u starszych osób liczba komórek B dziewiczych zmniejsza się, ale ich odsetek ulega zwiększeniu [24] lub pozostaje niezmienny [6].

Populacja limfocytów B pamięci obejmuje trzy główne subpopulacje różniące się między sobą klasą wydzielanych przeciwciał. Pierwsza subpopulacja, to „IgM memory”, które mają na powierzchni marker CD27⁺ i IgM (fenotyp IgD⁺IgM⁺CD27⁺ charakterystyczny dla komórek dziewiczych), przy braku immunoglobuliny G (IgG⁻) i immunoglobuliny A (IgA⁻) [6, 22]. Druga subpopulacja, to „classical switched”, które wykazują ekspresję IgG⁺ i IgA⁺ (fenotyp IgG⁺IgA⁺CD27⁺ i IgG⁺IgA⁺CD27⁻). Trzecia subpopulacja limfocytów B pamięci, to „late/exhausted memory cells” bez ekspresji receptorów klasy IgD⁻ i CD27⁻ opisywana jako komórki podwójnie negatywne (double negative, DN) [6, 22, 44].

Od kilku lat naukowcy badają wpływ starzenia się na zmiany subpopulacji limfocytów B, ale wyniki obserwacji nie są jednoznaczne [tab. 2]. Chong i wsp. [13], Shi i wsp. [65] oraz Frasca i wsp. [24], analizując u osób w wieku 18–86 lat całkowitą pulę obwodowych limfocytów B o fenotypie CD19⁺, populację komórek „IgM memory”, „classical switched” i „late/exhausted memory cells” oraz komórek dziewiczych, wykazali istotny spadek populacji CD19⁺. Z wiekiem procentowa zawartość komórek dziewiczych zwiększa się, ale liczba komórek „IgM memory” zmniejsza się [24, 46]. Liczba „classical switched” nie zmienia się, ale ich zawartość procentowa z wiekiem istotnie się obniża [6]. Doprowadza to do zwiększonej podatności starszych osób na infekcje zarówno bakteryjne, jak i wirusowe. Ponadto u starszych osób wykazano wzrost populacji komórek podwójnie negatywnych (double negative, DN) odpowiadających za syntezę przeciwciał IgG i IgA. Zwiększenie syntezy i wydzielania tych dwóch klas przeciwciał

Tabela 2. Zmiany w wybranych subpopulacjach komórek B

RODZAJ KOMÓREK	ZMIANY PO 65 r. ż.	PIŚMIENNICTWO
Limfocyty B fenotyp CD19 ⁺ CD27 ⁺	obniżony odsetek w całkowitej puli limfocytów krwi obwodowej	[13, 24, 64, 65]
	zwiększony odsetek w całkowitej puli limfocytów krwi obwodowej	[4]
Dziewicze limfocyty B	zwiększony odsetek w całkowitej puli limfocytów krwi obwodowej/narządach limfatycznych	[39, 65]
	zmniejszony odsetek w całkowitej puli limfocytów krwi obwodowej	[14]
IgM memory fenotyp IgD ⁺ IgM ⁺ CD27 ⁺	obniżona całkowita liczba	[46]
Switch memory fenotyp IgG ⁺ IgA ⁺ CD27 ⁺ i IgG ⁺ IgA ⁺ CD27 ⁻	obniżony odsetek w całkowitej puli limfocytów krwi obwodowej	[13, 14, 65]
Late/exhausted memory fenotyp IgD ⁻ CD27 ⁻	zwiększony odsetek w całkowitej puli limfocytów krwi obwodowej	[14, 47]

kompensuje zmniejszenie ich swoistości. W przypadku immunoglobulin IgM i IgD zaobserwowano spadek ich stężenia wynikający ze zmniejszającej się liczby komórek IgM memory (fenotyp IgD⁺IgM⁺CD27⁺) odpowiedzialnych za ich wydzielanie [6]. W komórkach DN zaobserwowano także skrócenie telomerów, a to obniża potencjał proliferacyjny DN u starszych osób [48].

Charakterystyczne dla starzejącego się organizmu jest też zwiększenie populacji limfocytów B1 CD5⁺ uczestniczących w wytwarzaniu autoprzeciwciał, czego następstwem jest wzrost chorób wynikających z autoagresji [6, 74]. Bancos i wsp. [4] badali zmiany we krwi obwodowej subpopulacji limfocytów B pamięci o fenotypie CD19⁺CD27⁺ u osób starszych. Wykazali zwiększoną procentową zawartość tej subpopulacji limfocytów B, co nasila uwalnianiem IL-6. Cytokina ta jest niezbędna do różnicowania komórek B i syntezy przeciwciał, ale jej nadmierne wytwarzanie przyczynia się do zwiększonego stanu zapalnego i ryzyka chorób autoimmunologicznych u osób starszych.

Zmiany w morfologii i funkcjonowaniu limfocytów B, objawiające się obniżeniem jakości przeciwciał, wzrostem procentowej zawartości komórek DN i innych subpopulacji limfocytów B u osób powyżej 65. roku życia, obniżają skuteczność układu odpornościowego. Zwiększa to ryzyko występowania infekcji bakteryjnych i wirusowych oraz powikłań i zgonów. Zapalenie płuc i grypa są szóstą przyczyną zgonów wśród osób po 65. roku życia w krajach wysoko rozwiniętych. Śmiertelność z powodu *Streptococcus pneumoniae* wynosi w tej grupie wiekowej prawie 30% z powodu zapalenia płuc, a nawet do 50% w przypadku zapalenia opon mózgowych oraz sepsy. Niestety stosowanie 23-walentnej pneumokokowej szczepionki jest mniej skuteczne niż u osób młodych. Podobnie szczepionka przeciw *Influenza virus* chroni osoby starsze jedynie w 56% [18, 73].

KOMÓRKI NK

Komórki NK (natural killer T cells) stanowią 5–15% limfocytów krwi obwodowej i są pierwszą linią obrony przed infekcjami i rozwijającymi się nowotworami. Są wysoce heterogenną populacją komórek różniących się między sobą potencjałem proliferacyjnym, zdolnościami funkcjonalnymi, wytwarzaniem cytokin regulujących aktywność innych komórek układu immunologicznego, a także odmienną odpowiedzią na cytokiny [61]. Zdolność do zabijania komórek docelowych, zwana inaczej cytotoksycznością komórek NK, podlega ścisłej regulacji i zależy od pobudzenia odpowiednich receptorów hamujących i aktywujących obecnych na powierzchni tych komórek. Duża aktywność cytotoksyczna komórek NK jest uznawana za marker dobrego zdrowia i długowieczności, mała aktywność – za marker starzenia i zwiększonego ryzyka śmiertelności [17, 34, 42]. Ze względu na różnice w ekspresji receptora powierzchniowego CD56, populację komórek NK podzielono na:

- komórki NK o fenotypie CD56^{bright}, które wytwarzają cytokiny IFN- γ , TNF- α i IL-10 oraz chemokiny RANTES i MIP1- α przy względnie niewielkiej aktywności cytotoksycznej; występują w tkankach i drugorzędowych narządach limfatycznych,
- komórki NK o fenotypie CD56^{dim}, które wykazują dużą aktywność cytotoksyczną i są zdolne do spontanicznej lizy komórek nowotworowych; stanowią główną subpopulację komórek NK we krwi obwodowej, tj. około 90% [25, 31, 61, 71].

W procesie starzenia wzrasta całkowita liczba komórek NK we krwi obwodowej, widoczne są również zmiany w rozkładzie ilościowym subpopulacji CD56^{bright} i CD56^{dim} [35]. Badania Chidrawara i wsp. [12] z udziałem 115 osób w wieku 20–40 lat, 40–60 lat i powyżej 60. roku życia z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, ujawniły istotne obniżenie procentowej zawartości komórek NK w całkowitej populacji limfocytów krwi obwodowej. Ponadto wykazały stopniową redukcję liczby CD56^{bright} z 15,6 komórek/ μ l w młodszych grupach do 8,1 komórek/ μ l w grupie powyżej 60 lat. Obniżenie liczby i aktywności CD56^{bright} osłabia zdolności proliferacyjne całej populacji NK i rozpoznawania antygenów oraz cytotoksyczność wobec komórek nowotworowych. Natomiast w przypadku liczby komórek CD56^{dim} wykazano tendencję wzrostową w grupie 40–60 lat i powyżej 60 lat w porównaniu do grupy 20–40 lat. Gounder i wsp. [31] także zaobserwowali wzrost liczby komórek NK o fenotypie CD56^{dim} w porównaniu do CD56^{bright} u osób po 60. roku życia. Zmiany w subpopulacjach CD56^{dim} i CD56^{bright} u starszych osób mogą spowodować upośledzenie odpowiedzi swoistej komórek T i B inicjowanej przez komórki NK [15].

Receptory obecne na powierzchni komórek NK uczestniczą w rozróżnianiu komórek prawidłowych od zainfekowanych lub nowotworowych. Ich ekspresja zmienia się z wiekiem [tab. 3; 15]. Pierwszą grupą są immunoglobulinowe receptory cytotoksyczne KIR (killer immunoglobulin-like receptors), wykazujące działanie aktywujące lub hamujące ze zdolnością rozpoznawania cząsteczek układu zgodności tkankowej MHC I. Druga grupa to białkowe receptory typu II NKG2, które łączą się w błonie komórkowej z cząsteczką CD94 odpowiedzialną za transdukcję sygnału o działaniu aktywującym lub hamującym aktywność komórek NK [21]. Trzecia grupa to aktywujące naturalne receptory cytotoksyczne NCR (neutral cytotoxicity receptors) rozpoznające wirusowe hemaglutyniny i bakteryjne białka powierzchniowe [2, 19]. Le Garff-Tavernier i wsp. [42], analizując 20 próbek krwi pępowinowej i 55 próbek od pacjentów powyżej 60 lat wykazali, że ekspresja receptora hamującego CD94/NKG2A na powierzchni komórek NK jest wyższa w próbkach krwi pępowinowej w porównaniu do starszych osób. Natomiast ekspresja receptora NKG2D należącego do receptorów aktywujących wzrasta z wiekiem, co zaburza rozpoznawanie zainfekowanych lub zmienionych nowotworowo komórek.

Szybkość aktywacji komórek NK jest oceniana za pomocą wczesnego markera aktywacji CD69, który stymuluje

Tabela 3. Zmiany ekspresji wybranych receptorów komórek NK w zależności od wieku

RECEPTOR	OSOBY MŁODE	OSOBY STARSZE	PIŚMIENICTWO
LIR/ILT2	↓ ekspresji	↑ ekspresji	[42]
NKG2C	brak zmian	brak zmian	[42]
NKG2D	↓ ekspresji	↑ ekspresji	[42]
CD69	↓ ekspresji	↑ ekspresji	[42]
CD94/NKG2A	↑ ekspresji	↓ ekspresji brak zmian	[8, 42]
FcγRIIIA/CD16	brak zmian	brak zmian	[67]
NKp30	↑ ekspresji	↓ ekspresji	[67]
NKp46	↑ ekspresji	↓ ekspresji	[67]

cytotoksyczność i kostymuluje wytwarzanie cytokin przez komórki NK [60]. Poziom markera CD69 zarówno w subpopulacji CD56^{bright}, jak i CD56^{dim} jest istotnie wyższy u starszych osób w porównaniu do noworodków [42]. Z niewielu do tej pory przeprowadzonych badań wiadomo, że obniżona aktywność NK, określona zmniejszoną obecnością CD69 na powierzchni komórek u osób starszych, jest związana ze zwiększoną zapadalnością na infekcje oraz ze wzrostem częstotliwości występowania nowotworów [1]. W nowotworach okrężnicy na podstawie analizy markera CD69 wykazano, że pacjenci z prawidłową aktywnością cytotoksyczną komórek NK zdecydowanie częściej pozostają wolni od przerzutów, podczas gdy u pacjentów z małą aktywnością NK częściej następuje nawrót choroby. W ostatnich latach rozpoczęto badania nad wykorzystaniem komórek NK w immunoterapii, która na etapie zaawansowanego lub uogólnionego procesu nowotworowego może doprowadzić do wieloletnich przeżyć pacjentów. Jednak czy ten

rodzaj immunoterapii doprowadzi do całkowitego wyleczenia pacjenta z choroby nowotworowej wymaga dalszej oceny w kontrolowanych badaniach klinicznych [7].

SKUTKI IMMUNOSENESCENJI

Choroby u starszych osób wynikają z zaburzenia regulacji reakcji odpornościowych oraz nadmiernego i chronicznego stanu zapalnego. Wyniki opisanych badań klinicznych potwierdzają słuszność tej hipotezy. Na podstawie analizy częstotliwości zakażeń przede wszystkim wirusem CMV, wskaźników immunologicznych lub zapalenia, od lat podejmowane są próby opracowania profilu odpornościowego ryzyka (immune risk profile, IRP) określającego potencjalne tempo starzenia układu immunologicznego, a tym samym całego organizmu. Pierwsze obserwacje dotyczące IRP w latach 90. ub.w. przeprowadzili Szwedzi (projekt OCTO/NONA populacja Jönköping), którzy wykazali, że u 15% badanych z niekorzystnym IRP śmiertelność

Tabela 4. Zmiany profilu odpornościowego ryzyka związanego ze śmiertelnością obserwowanych populacji w projektach OCTO/NONA, 85-Plus, BELFRAIL [54]

PROJEKT	WYNIKI
OCTO/NONA czynniki zwiększające umieralność w okresie 2, 4 i 6 lat (kobiety i mężczyźni)	stosunek limfocytów CD4 do CD8 <1 obniżona proliferacja w odpowiedzi na mitogeny kumulacja komórek o fenotypie CD27 ⁻ CD28 ⁻ CD8 ⁺ T obecność przeciwciał przeciw CMV zwiększona liczba neutrofilii
85-Plus czynniki pozytywnie związane z 8-letnią przeżywalnością w wieku 89 lat (kobiety i mężczyźni)	kumulacja komórek o fenotypie CD28 ⁻ CD8 ⁺ T w odpowiedzi na antygeny CMV akumulacja komórek T CD4 o fenotypie podobnym do komórek T regulatorowych
BELFRAIL czynniki pozytywnie związane z 3-letnią przeżywalnością w wieku 85 lat (kobiety)	stosunek limfocytów CD4 do CD8 <1 obecność przeciwciał przeciw CMV
czynniki negatywnie związane z 3-letnią przeżywalnością w wieku 85 lat (kobiety)	stosunek limfocytów CD4 do CD8 >5 kumulacja dziewiczych limfocytów T CD4 brak przeciwciał przeciw CMV

była istotnie wyższa w ciągu 2, 4 i 6 lat obserwacji [75, 76, 77]. Badania były kontynuowane przez Holendrów (projekt 85-Plus populacja Leiden) i Belgów (projekt BELFRAIL populacja Flandrii). Część przeprowadzonych obserwacji jest porównywalna, a stwierdzone różnice wynikają z odmiennych warunków środowiska i stylu życia populacji [tab. 4; 54].

Ocena profilu ryzyka odpornościowego, obejmującego zmiany funkcji i liczby określonych subpopulacji komórek immunologicznych, może być istotna w prognozowaniu rozwoju zaburzeń metabolicznych lub nasilenia objawów chorób, których występowanie jest częstsze w wieku podeszłym, takich jak: nowotwory, cukrzyca typu 2, choroby sercowo-naczyniowe, neurodegeneracyjne, autoimmunologiczne i in. Wiadomo, że tym czynnikiem, który ma duży wpływ na IRP, jest nadmierna zawartość tkanki tłuszczowej. Wykazano, że u osób otyłych zwiększa się udział procentowy limfocytów T CD3⁺CD4⁺, a obniża się udział limfocytów CD3⁺CD8⁺ i spada cytotoxyczność komórek NK, co stwarza ryzyko chorób zakaźnych i nowotworów [50, 51]. Badania Lyncha i wsp. [43] dotyczące zmian w subpopulacji limfocytów T między osobami otyłymi i metabolicznie chorymi a otyłymi i metabolicznie zdrowymi wykazały niewielki udział procentowy limfocytów cytotoksycznych CD8⁺ i komórek NK u pacjentów otyłych i metabolicznie chorych. Między grupami nie wykazano różnic poziomu limfocytów pomocniczych CD4⁺. W ocenie ryzyka rozwoju cukrzycy typu 2 istotnym elementem IRP jest wzrost populacji limfocytów T CD4⁺ i limfocytów CD8⁺ aktywnych w tkance tłuszczowej makrofagi M1 o właściwościach prozapalnych związanych z profilem uwalnianych cytokin IL-1 β , -6, -12, -23 i TNF- α . U osób z cukrzycą typu 2 wykazano także dodatnią korelację między wartością wskaźnika masy ciała a stężeniem IFN- γ wydzielanego przez limfocyty CD3⁺CD8⁺ [79].

Nadmierna masa ciała jest przyczyną chorób sercowo-naczyniowych z powodu oddziaływania na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych wymienionych wyżej mediatorów reakcji zapalnej, głównie IL-1 β , IL-6 i TNF- α . Ponadto zwiększone wytwarzanie białka C-reaktywnego w odpowiedzi na wysokie stężenie cytokin prozapalnych u osób starszych redukuje uwalnianie ze śródbłonna tlenu azotu (NO) i prostacykliny PGI2 będących głównymi mediatorami regulującymi napięcie ściany naczyniowej. Oprócz rozszerzania naczyń krwionośnych, oba związki ograniczają adhezję makrofagów do ściany i proliferację komórek macierzystych mięśni gładkich, tym samym hamując odbudowę uszkodzonych naczyń. Jednak nadal nie wyjaśniono, która z postaci CRP, tj. natywna (nCRP) czy monomeryczna (mCRP) działa aterogennie [68]. U chorych z nadciśnieniem tętniczym wykazano występowanie autoprzeciwciał skierowanych przeciw receptorom AT 1 dla angiotensyny II (AGT1R), których obecność stwierdzono na powierzchni limfocytów T i komórek NK. Najnowsze badania wykazują, że makrofagi i komórki dendrytyczne mogą być istotnym źródłem samej angiotensyny typu II, która stymuluje syntezę i wydzielanie cytokin aterogennych IL-12 i TNF- α [70].

Zmiany IPR w chorobach neurodegeneracyjnych są analizowane głównie w przypadku Alzheimer'a i Parkinsona. Wśród populacji osób w wieku 60 lat częstotliwość występowania AD szacuje się na 1%, natomiast w populacji osób w wieku 90 i więcej lat nawet do 50%. Choroba Parkinsona, podobnie jak AD, dotyczy przede wszystkim pacjentów po 60. roku życia. W populacji ogólnej występuje u 0,15%, natomiast u osób po 70. roku życia prawie u 2%. Wykazano, że limfocyty T osób chorych na AD charakteryzują się większym niż u osób zdrowych nagromadzeniem ich specyficznej odmiany, w której nastąpiła rewersja do fenotypu komórek dziewiczych CD45RA⁺. Niedawno wykazano, że β -amyloid ma nie tylko właściwości antygenowe, ale jest nieswoistym modulatorem wzmacniającym odpowiedź proliferacyjną i sekrecyjną limfocytów T CD4⁺, co zwiększa wydzielanie IL-6, IL-10 i TNF- α oraz IFN- γ [78]. U pacjentów z zaawansowaną PD wykazano większy udział procentowy komórek NK oraz mniejszy limfocytów T CD3⁺ i limfocytów B CD19⁺ we krwi obwodowej. Stosunek limfocytów Treg/Th17 był niższy u pacjentów z PD, zwłaszcza u kobiet. Nie wykazano zmian w zawartości procentowej limfocytów T pomocniczych CD3⁺CD4⁺ i cytotoksycznych CD3⁺CD8⁺ w całkowitej puli limfocytów krwi. Autorzy sugerują, że badany profil komórek immunologicznych mógłby być markerem postępu choroby Parkinsona [11].

Najczęściej opisywanym przykładem zaburzeń funkcji układu immunologicznego jest reumatoidalne zapalenie stawów (rheumatoid arthritis, RZS). Przez wiele lat uważano, że główną przyczyną rozwoju RZS jest nadmierne wytwarzanie kompleksów immunologicznych. Jednak coraz częściej pojawiają się doniesienia naukowe wskazujące, że nadmierne wytwarzanie przeciwciał i w konsekwencji powstawanie nadmiaru kompleksów immunologicznych jest w tej chorobie drugorzędne do defektu pomocniczych limfocytów T CD4⁺. Objawia się to m.in. obniżoną zdolnością do proliferacji *in vitro*, podwyższonym odsetkiem komórek pamięci immunologicznej CD45RO⁺ oraz nagromadzeniem limfocytów o fenotypie CD4⁺CD28⁻ i CD4⁺CD28low, a to wiąże się z nadmierną sekrecją prozapalnej cytokiny TNF- α . Związany z RZS proces zapalny ma charakter uogólniony, doprowadzając do uszkodzenia wielu tkanek w tym układu sercowo-naczyniowego, powodując przedwczesne wystąpienie zmian miażdżycowych i związaną z nimi chorobę niedokrwienną serca [78].

W ostatnich latach wiele badań dotyczących immunosenescencji jest ukierunkowanych na nowotwory hematologiczne, a szczególnie szpiczaka mnogiego (multiple myeloma, MM) diagnozowanego u 70% pacjentów onkologicznych powyżej 65 lat. Pessoa de Magalhães i wsp. [57] wykazali obniżony stosunek CD4/CD8 zarówno w krwi obwodowej, jak i aspiratach szpiku kostnego u pacjentów ze zdiagnozowanym szpiczakiem, którzy po terapii pozostają wolni od nawrotów choroby przez ponad 5 lat (long term disease control - multiple myeloma, LTDC-MM) w porównaniu do zdrowych osób. Obserwowane zmiany były spowodowane wzrostem liczby limfocytów T CD8⁺ przy braku zmian liczby

CD4⁺. Natomiast całkowita liczba komórek dendrytycznych nie różniła się istotnie u pacjentów wolnych od progresji czy nowo zdiagnozowanych. U chorych LTDC-MM odnotowano wyższy odsetek plazmocytoidalnych komórek dendrytycznych w krwi i szpiku oraz wyższy odsetek mieloidalnych komórek dendrytycznych w krwi obwodowej. Zelle-Rieser i wsp. [80] także zaobserwowali zmiany w populacji limfocytów T CD8⁺ przy braku zmian udziału procentowego limfocytów T CD4⁺ w krwi i szpiku u chorych w porównaniu do zdrowych osób. Ponadto autorzy wykazali brak istotnych różnic w odsetkach niedojrzałych i dziewiczych limfocytów B między LTDC-MM i zdrowymi osobami, natomiast wzrost u pacjentów nowo zdiagnozowanych i pacjentów z objawowym szpiczakiem mnogim. U pacjentów, u których nie stwierdzono nawrotu choroby przez ponad 10 lat, liczba komórek T CD8⁺, CD4⁺ dziewiczych komórek B i mieloidalnych komórek dendrytycznych była istotnie wyższa w porównaniu do pacjentów z 5–10-letnim brakiem remisji, ale także w porównaniu do osób zdrowych. Oznacza to, że profil immunologiczny pacjentów uznawanych za wyleczonych nie odzwierciedla profilu immunologicznego osób zdrowych, a stanowi raczej unikalną „sygnaturę immunologiczną” [57].

MARKERY IMMUNOSENESCENCJI – PODSUMOWANIE

Główną funkcją układu immunologicznego jest zapewnienie integralności organizmu w warunkach stałej ekspozycji na antygeny wewnątrz- i zewnątrzpochodne. Zakażenie wirusem cytomegalii, zaburzenia metaboliczne i choroby degeneracyjne oraz czynniki środowiskowe, jak zanieczyszczenie środowiska, jakość diety i aktywność fizyczna mogą wpływać na profil odpornościowego ryzyka (immune risk profile, IRP), przyspieszając lub spowalniając starzenie układu immunologicznego i całego organizmu. Markerami natężenia immunosenescencji rekomendowanymi przez większość naukowców są: liczba dziewiczych limfocytów B, immunofenotyp limfocytów T i stosunek komórek CD4/CD8,

stężenie białka C-reaktywnego i cytokin prozapalnych, zdolność prezentacji antygenów przez komórki dendrytyczne, liczba komórek NK z jednoczesnym określeniem ich aktywności cytotoksycznej, aktywność fagocytarna neutrofilii, długość telomerów w komórkach immunologicznych [tab. 5; 27, 40, 54].

W celu spowolnienia procesów starzenia i związanych z tym zaburzeń funkcji układu immunologicznego, utrzymania sprawności fizycznej i intelektualnej, a tym samym samodzielności, należy wprowadzać prewencję gerontologiczną obejmującą:

- edukację zdrowotną o zjawiskach związanych ze zmianą odporności w wieku starszym i promocji zdrowego stylu życia,
- modyfikację diety przez wprowadzanie do pożywienia składników o niskim indeksie prozapalnym (dietary inflammatory index) lub wysokim potencjale antyoksydacyjnym (dietary antioxidant capacity), takich jak np. owoce i warzywa zawierające flawonoidy,
- odpowiednią liczbę snu (powyżej 7 godzin na dobę), co zwiększa wydzielanie przeciwciał sIgA, a tym samym zapobiega infekcji układu pokarmowego i górnych dróg oddechowych, obniża stężenia cytokin prozapalnych IL-1 β , -6, -18, TNF- α i osłabia przewlekły stan zapalny oraz wpływa na aktywność komórek NK i odsetek komórek T pomocniczych CD3⁺CD4⁺, cytotoksycznych CD3⁺CD8⁺,
- codzienną aktywność fizyczną na poziomie minimum 4400 kroków dziennie, wykonywanych w środowisku o niskiej zawartości immunotoksyn PM10, NO₂, SO₂, CO i in., co obniża stężenia immunoenдокrynnych mediatorów reakcji zapalnej, np. kortyzolu, IL-1 β , TNF- α i IL-18 oraz zwiększa (nawet o 50%) liczbę komórek NK,
- upowszechnienie szczepień przeciw *Influenza virus* i *Streptococcus pneumoniae* uwzględniających immunosenescencję zapewniających pełną odporność przeciw grypie i zapaleniu płuc [3, 16, 41, 55, 63, 66].

Tabela 5. Biomarkery charakteryzujące efektywność działania układu immunologicznego u osób starszych [40]

Wskaźnik/ liczba/stężenie	Związek ze starzeniem	Predyktor umieralności	Związek ze słabością/ obniżoną sprawnością funkcjonalną
Komórki B	+++++	+	+
CMV seropozytywność	++++	++	+
Białko C-reaktywne	+++++	+++++	+
Komórki dendrytyczne	+	+	+
Cytokiny IL-6 i TNF- α	+++++	+++++	+++
Komórki NK	+++++	+	++
Neutrofile	+++++	+	+
Fenotyp komórek T	+++++	+	+
Długość telomerów	+++++	+++++*	+

Zależności: +++++ bardzo silna, ++++ silna, +++ umiarkowana, ++ niska, + bardzo niska lub brak; * niejednoznaczne wyniki badań długości telomerów w komórkach immunologicznych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Al-Attar A., Presnell S.R., Clasey J.L., Long D.E., Walton R.G., Sexton M., Starr M.E., Kern P.A., Peterson C.A., Lutz C.T.: Human body composition and immunity: Visceral adipose tissue produces IL-15 and muscle strength inversely correlates with NK cell function in elderly humans. *Front. Immunol.*, 2018; 9: 440
- [2] Arnon T.I., Lev M., Katz G., Chernobrov Y., Porgador A., Mandelboim O.: Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur. J. Immunol.*, 2001; 31: 2680–2689
- [3] Asif N., Iqbal R., Nazir C.F.: Human immune system during sleep. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.*, 2017; 6: 92–96
- [4] Bancos S., Phipps R.P.: Memory B cells from older people express normal levels of cyclooxygenase-2 and produce higher levels of IL-6 and IL-10 upon *in vitro* activation. *Cell. Immunol.*, 2010; 266: 90–97
- [5] Bender B.S., Nagel J.E., Adler W.H., Andres R.: Absolute peripheral blood lymphocyte count and subsequent mortality of elderly man. The Baltimore longitudinal study of aging. *J. Am. Geriatr. Soc.*, 1986; 34: 649–654
- [6] Bulati M., Buffa S., Candore G., Caruso C., Dunn-Walters D.K., Pellicanò M., Wu Y.C., Colona Romano G.: B cells and immunosenescence: A focus on IgG⁺IgD⁺CD27⁺ (DN) B cells in aged humans. *Ageing Res. Rev.*, 2011; 10: 274–284
- [7] Camous X., Pera A., Solana R., Larbi A.: NK cells in healthy aging and age-associated diseases. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012; 2012: 195956
- [8] Campos C., Pera A., Sanchez-Correa B., Alonso C., Lopez-Fernandez I., Morgado S., Tarazona R., Solana R.: Effect of age and CMV on NK cell subpopulations. *Exp. Gerontol.*, 2014; 54: 130–137
- [9] Cano L.E., Lopera D.E.: Introduction to T and B lymphocytes. W: Autoimmunity: From Bench to Bedside, red.: J.M. Anaya, Y. Shoenfeld, A. Rojas-Villarraga, R.A. Levy, R. Cervera. El Rosario University Press, Bogota (Colombia) 2013
- [10] Carrasco Y.R., Fleire S.J., Cameron T., Dustin M.L., Batista F.D.: LFA-1/ICAM-1 interaction lowers the threshold of B cell activation by facilitating B cell adhesion and synapse formation. *Immunity*, 2004; 20: 589–599
- [11] Cen L., Yang C., Huang S., Zhou M., Tang X., Li K., Guo W., Wu Z., Mo M., Xiao Y., Chen X., Yang X., Huang Q., Chen C., Qu S., Xu P.: Peripheral lymphocyte subsets as a marker of Parkinson's disease in a Chinese population. *Neurosci. Bull.*, 2017; 33: 493–500
- [12] Chidrawar S.M., Khan N., Chan Y.L., Nayak L., Moss P.A.: Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56 bright NK cells. *Immun. Ageing.*, 2006; 3: 10
- [13] Chong Y., Ikematsu H., Yamaji K., Nishimura M., Nabeshima S., Kashiwagi S., Hayashi J.: CD27⁺ (memory) B cell decrease and apoptosis-resistant CD27⁺ (naive) B cell increase in aged humans: Implications for age-related peripheral B cell developmental disturbances. *Int. Immunol.*, 2005; 17: 383–390
- [14] Colonna-Romano G., Bulati M., Aquino A., Pellicanò M., Vitello S., Lio D., Candore G., Caruso C.: A double-negative (IgD-CD27-) B cell population is increased in the peripheral blood of elderly people. *Mech. Ageing Dev.*, 2009; 130: 681–690
- [15] Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A.: The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.*, 2001; 22: 633–640
- [16] Corley J., Shivappa N., Hébert J.R., Starr J.M., Deary I.J.: Associations between dietary inflammatory index scores and inflammatory biomarkers among older adults in the Lothian Birth Cohort 1936 Study. *J. Nutr. Health. Ageing.*, 2019; 23: 628–636
- [17] Drela N.: Immunologiczna teoria starzenia. *Post. Bioch.*, 2014; 60: 221–232
- [18] Dunn-Walters D.K.: The ageing human B cell repertoire: A failure of selection? *Clin. Exp. Immunol.*, 2016; 183: 50–56
- [19] Esin S., Batoni G., Counoupas C., Stringaro A., Brancatisano F.L., Colone M., Maisetta G., Florio W., Arancia G., Campa M.: Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKp44 to the surfaces of mycobacteria and other bacteria. *Infect. Immun.*, 2008; 76: 1719–1727
- [20] Farr A.G., Sidman C.L.: Reduced expression of Ia antigens by thymic epithelial cells of aged mice. *J. Immunol.*, 1984; 133: 98–103
- [21] Flórez-Álvarez L., Hernandez J.C., Zapata W.: NK cells in HIV-1 infection: From basic science to vaccine strategies. *Front. Immunol.*, 2018; 9: 2290
- [22] Frasca D., Diaz A., Romero M., Landin A.M., Blomberg B.B.: Age effects on B cells and humoral immunity in humans. *Ageing Res. Rev.*, 2011; 10: 330–335
- [23] Frasca D., Diaz A., Romero M., Thaller S., Blomberg B.B.: Metabolic requirements of human pro-inflammatory B cells in aging and obesity. *PLoS One*, 2019; 14: e0219545
- [24] Frasca D., Landin A.M., Riley R.L., Blomberg B.B.: Mechanisms for decreased function of B cells in aged mice and humans. *J. Immunol.*, 2008; 180: 2741–2746
- [25] Fu B., Tian Z., Wei H.: Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology*, 2014; 141: 483–489
- [26] Fuentes E., Fuentes M., Alarcón M., Palomo I.: Immune system dysfunction in the elderly. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 2017; 89: 285–299
- [27] Fülöp T., Larbi A., Dupuis G., Le Page A., Frost E.H., Cohen A.A., Witkowski J.M., Franceschi C.: Immunosenescence and inflammaging as two sides of the same coin: Friends or foes? *Front. Immunol.*, 2018; 8: 1960
- [28] Gala K., Burdzinska A., Paczek L.: Mezenchymalne komórki macierzyste szpiku kostnego a starzenie. *Post. Biol. Komórki*, 2010; 37: 89–106
- [29] Geginat J., Sallusto F., Lanzavecchia A.: Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.*, 2001; 194: 1711–1719
- [30] Goronzy J.J., Weyand C.M.: Successful and maladaptive T cells aging. *Immunity*, 2017; 46: 364–378
- [31] Gounder S.S., Abdullah B.J., Radzuanb N.E., Zain F.D., Sait N.B., Chua C., Subramani B.: Effect of aging on NK cell population and their proliferation at *ex vivo* culture condition. *Anal. Cell. Pathol.*, 2018; 2018: 7871814
- [32] Guzik T.J., Cosentino F.: Epigenetics and immunometabolism in diabetes and aging. *Antioxid. Redox. Signal.*, 2018; 29: 257–274
- [33] Haynes L., Maue A.C.: Effects of aging on T cell function. *Curr. Opin. Immunol.*, 2009; 21: 414–417
- [34] Hazeldine J., Lord J.M.: The impact of ageing on natural killer cell function and potential consequences for health in older adults. *Ageing. Res. Rev.*, 2013; 12: 1069–1078
- [35] Hecht M.L., Rosental B., Horlacher T., Hershkovitz O., De Paz J.L., Noti C., Schauer S., Porgador A., Seeberger P.H.: Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *J. Proteome Res.*, 2009; 8: 712–720
- [36] Inoue S., Saito M., Kotani J.: Immunosenescence in neurocritical care. *J. Intensive Care*, 2018; 6: 65
- [37] Kang I., Hong M.S., Nolasco H., Park S.H., Dan J.M., Choi J.Y., Craft J.: Age associated change in the frequency of memory CD4⁺ T cells impairs long term CD4⁺ T cell responses to influenza vaccine. *J. Immunol.*, 2004; 173: 673–681
- [38] Keenan C.R., Allan R.S.: Epigenomic drivers of immune dysfunction in aging. *Aging Cell.*, 2019; 18: e12878

- [39] Kolar G.R., Mehta D., Wilson P.C., Capra J.D.: Diversity of the Ig repertoire is maintained with age in spite of reduced germinal centre cells in human tonsil lymphoid tissue. *Scand. J. Immunol.*, 2006; 64: 314–324
- [40] Lara J., Cooper R., Nissan J., Ginty A.T., Khaw K.T., Deary I.J., Lord J.M., Kuh D., Mathers J.C.: A proposed panel of biomarkers of healthy ageing. *BMC Med.*, 2015; 13: 222
- [41] Lee I.M., Shiroma E.J., Kamada M., Bassett D.R., Matthews C.E., Buring J.E.: Association of step volume and intensity with all-cause mortality in older women. *JAMA Intern. Med.*, 2019; 179: 1105–1112
- [42] Le Garff-Tavernier M., Béziat V., Decocq J., Siguret V., Gandjbakhch F., Pautas E., Debré P., Merle-Beral H., Vieillard V.: Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell.*, 2010; 9: 527–535
- [43] Lynch L.A., O'Connell J.M., Kwasnik A.K., Cawood T.J., O'Farrelly C., O'Shea D.B.: Are natural killer cells protecting the metabolically healthy obese patient? *Obesity*, 2009; 17: 601–605
- [44] Ma S., Wang C., Mao X., Hao Yi.: B cell dysfunction associated with aging and autoimmune diseases. *Front. Immunol.*, 2019; 10: 318
- [45] Malaguarnera L., Cristaldi E., Lipari H., Malaguarnera M.: Acquired immunity: Immunosenescence and physical activity. *Eur. Rev. Aging. Phys. Act.*, 2008; 5: 61
- [46] Martin V., Wu Y.C., Kipling D., Dunn-Walters D.K.: Age-related aspects of human IgM⁺ B cell heterogeneity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2015; 1362: 153–163
- [47] Martorana A., Balistreri C.R., Bulati M., Buffa S., Azzarello D.M., Camarda C., Monastero R., Caruso C., Colonna-Romano G.: Double negative (CD19⁺IgG⁺IgD⁺CD27⁻) B lymphocytes: a new insight from telomerase in healthy elderly, in centenarian offspring and in Alzheimer's disease patients. *Immunol. Lett.*, 2014; 162: 303–309
- [48] Mehr R., Melamed D.: Reversing B cell aging. *Aging*, 2011; 3: 438–443
- [49] Murray M.A., Chotirmall S.H.: The Impact of immunosenescence on pulmonary disease. *Mediators. Inflamm.*, 2015; 2015: 692546
- [50] O'Rourke R.W., Kay T., Scholz M.H., Diggs B., Jobe B.A., Lewinsohn D.M., Bakke A.C.: Alterations in T-cell subset frequency in peripheral blood in obesity. *Obes. Surg.*, 2005; 15: 1463–1468
- [51] O'Shea D., Cawood T.J., O'Farrelly C., Lynch L.: Natural killer cells in obesity: Impaired function and increased susceptibility to the effects of cigarette smoke. *PLoS One.*, 2010; 5: e8660
- [52] Palmer D.B.: The effect of age on thymic function. *Front. Immunol.*, 2013; 4: 316
- [53] Panda A., Qian F., Mohanty S., van Duin D., Newman F.K., Zhang L., Chen S., Towle V., Belshe R.B., Fikrig E., Allore H.G., Montgomery R.R., Shaw A.C.: Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J. Immunol.*, 2010; 184: 2518–2527
- [54] Pawelec G.: Immune signatures associated with mortality differ in elderly populations from different birth cohorts and countries even within northern Europe. *Mech. Ageing Dev.*, 2019; 177: 182–185
- [55] Pedersen B.K.: The physiology of optimizing health with focus on exercise as medicine. *Annu Rev Physiol.*, 2019; 81: 607–627
- [56] Pertovaara M., Raitala A., Lehtimäki T., Karhunen P.J., Oja S.S., Jylhä M., Hervonen A., Hurme M.: Indoleamine 2,3-dioxygenase activity in nonagenarians is markedly increased and predicts mortality. *Mech. Ageing Dev.*, 2006; 127: 497–499
- [57] Pessoa de Magalhães R.J., Vidriales M.B., Paiva B., Fernandez-Gimenez C., Garcia-Sanz R., Mateos M.V., Gutierrez N.C., Leclerc Q., Blanco J.F., Hernandez J., de las Heras N., Martinez-Lopez J., Roig M., Costa E.S., Ocio E.M., et al.: Analysis of the immune system of multiple myeloma patients achieving long-term disease control by multidimensional flow cytometry. *Haematologica*, 2013; 98: 79–86
- [58] Pilarski L.M., Yacyshyn B.R., Jensen G.S., Pruski E., Pabst H.F.: Beta 1 integrin (CD29) expression on human postnatal T cell subsets defined by selective CD45 isoform expression. *J. Immunol.*, 1991; 147: 830–837
- [59] Pinti M., Appay V., Campisi J., Frasca D., Fülöp T., Sauce D., Larbi A., Weinberger B., Cossarizza A.: Aging of the immune system: Focus on inflammation and vaccination. *Eur. J. Immunol.*, 2016; 46: 2286–2301
- [60] Pisegna S., Zingoni A., Pirozzi G., Cinque B., Cifone M.G., Morone S., Piccoli M., Frati L., Palmieri G., Santoni A.: Src-dependent Syk activation controls CD69-mediated signaling and function on human NK cells. *J. Immunol.*, 2002; 169: 68–74
- [61] Ponnappan S., Ponnappan U.: Aging and immune function: Molecular mechanisms to interventions. *Antioxid Redox Signal.*, 2011; 14: 1551–1585
- [62] Salam N., Rane S., Das R., Faulkner M., Gund R., Kandpal U., Lewis V., Mattoo H., Prabhu S., Ranganathan V., Durdik J., George A., Rath S., Bal V.: T cell ageing: Effects of age on development, survival & function. *Indian. J. Med. Res.*, 2013; 138: 595–608
- [63] Santos R.V., Viana V.A., Boscolo R.A., Margues V.G., Santana M.G., Lira F.S., Tufik S., de Mello M.T.: Moderate exercise training modulates cytokine profile and sleep in elderly people. *Cytokine*, 2012; 60: 731–735
- [64] Scholz J.L., Diaz A., Riley R.L., Cancro M.P., Frasca D.: A comparative review of aging and B cell function in mice and humans. *Curr. Opin. Immunol.*, 2013; 25: 504–510
- [65] Shi Y., Yamazaki T., Okubo Y., Uehara Y., Sugane K., Agematsu K.: Regulation of aged humoral immune defense against pneumococcal bacteria by IgM memory B cell. *J. Immunol.*, 2005; 175: 3262–3267
- [66] Simoni M., Baldacci S., Maio S., Cerrai S., Sarno G., Viegi G.: Adverse effects of outdoor pollution in the elderly. *J. Thorac. Dis.*, 2015; 7: 34–45
- [67] Solana C., Tarazona R., Solana R.: Immunosenescence of natural killer cells, inflammation, and Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimers. Dis.*, 2018; 2018: 3128758
- [68] Sproston N.R., El Mohtadi M., Slevin M., Gilmore W., Ashworth J.J.: The effect of C-reactive protein isoforms on nitric oxide production by U937 monocytes/macrophages. *Front. Immunol.*, 2018; 9: 1500
- [69] Szabo P., Shen S., Telford W., Weksler M.E.: Impaired rearrangement of IgH V to DJ segments in bone marrow Pro-B cells from old mice. *Cell. Immunol.*, 2003; 222: 78–87
- [70] Tawinwung S., Petpiroon N., Chanvorachote P.: Blocking of type 1 angiotensin II receptor inhibits T-lymphocyte activation and IL-2 production. *In Vivo*, 2018; 32: 1353–1359
- [71] Tseng H.C., Bui V., Man Y.G., Cacalano N., Jewett A.: Induction of split anergy conditions natural killer cells to promote differentiation of stem cells through cell-cell contact and secreted factors. *Front. Immunol.*, 2014; 5: 269
- [72] Tsuboi I., Morimoto K., Hirabayashi Y., Li G.X., Aizawa S., Mori K.J., Kanno J., Inoue T.: Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: Decrease in interleukin-7 and transforming growth factor- β levels in stromal cells of senescence-accelerated mice. *Exp. Biol. Med.*, 2004; 229: 494–502
- [73] Urbanowicz I., Nahaczewska W., Stacherzak-Pawlik J., Woźniak M.: Starzenie się limfocytów i jego wpływ na rozwój przewlekłej białaczki limfocytowej. *Diagn. Lab.*, 2013; 49: 137–144
- [74] Weksler M.E.: Changes in the B-cell repertoire with age. *Vaccine*, 2000; 18: 1624–1628
- [75] Wikby A., Ferguson F., Forsey R., Thompson J., Strindhall J., Löfgren S., Nilsson B.O., Ernerudh J., Pawelec G., Johansson B.: An immune risk phenotype, cognitive impairment, and survival in very late life: Impact of allostatic load in Swedish octogenarian and nonagenarian humans. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 2005; 60: 556–565

[76] Wikby A., Johansson B., Ferguson F.: The OCTO and NONA immune longitudinal studies: A review of 11 years studies of Swedish very old humans. *Adv. Cell. Aging Gerontol.*, 2002; 13: 1–16

[77] Wikby A., Nilsson B.O., Forsey R., Thompson J., Strindhall J., Löfgren S., Ernerudh J., Pawelec G., Ferguson F., Johansson B.: The immune risk phenotype is associated with IL-6 in the terminal decline stage: Findings from the Swedish NONA immune longitudinal study of very late life functioning. *Mech. Ageing Dev.*, 2006; 127: 695–704

[78] Witkowski J.M.: Mechanizmy starzenia się układu odpornościowego na niektóre choroby wieku podeszłego. *Post. Bioch.*, 2014; 60: 233–239

[79] Xia C., Rao X., Zhong J.: Role of T lymphocytes in type 2 diabetes and diabetes-associated inflammation. *J. Diabetes. Res.*, 2017; 2017: 6494795

[80] Zelle-Rieser C., Thangvadivel S., Biedermann R., Brunner A., Stoitzner P., Willenbacher E., Greil R., Jöhner K.: T cells in multiple myeloma display features of exhaustion and senescence at the tumor site. *J. Hematol. Oncol.*, 2016; 9: 116

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Lifestyle exercise attenuates immunosenescence; flow cytometry analysis



Anna Tylutka¹, Barbara Morawin¹, Artur Gramacki² and Agnieszka Zembron-Lacny^{1*}

Abstract

Background: Interaction of physical activity and overall immune profile is very complex and depends on the intensity, duration and frequency of undertaken physical activity, the exposure to cytomegalovirus (CMV) infection and the age-related changes in the immune system. Daily physical activity, which particularly influences immunity, declines dramatically with age. Therefore, the aim of the study was to explain whether physical activity sustained throughout life can attenuate or reverse immunosenescence.

Methods: Ninety-nine older adults (60–90 years) were recruited for the study. According to the 6-min walk test (6WMT), the Åstrand-Ryhmig bike test ($VO_2\max$) and Community Healthy Activities Model Program for Seniors (CHAMPS) questionnaire, the individuals were classified as physically active ($n = 34$) and inactive ($n = 20$) groups. The analysis of T lymphocytes between active vs. inactive participants was performed using eight-parameter flow cytometry.

Results: Analysis of the baseline peripheral naïve and memory T lymphocytes showed a significant relationship of lifestyle exercise with the CD4/CD8 ratio. Above 50% of physically active participants demonstrated the CD4/CD8 ratio ≥ 1 or ≤ 2.5 contrary to the inactive group who showed the ratio < 1 . The older adults with the result of 6WMT > 1.3 m/s and $VO_2\max > 35$ mL/kg/min had a significantly higher CD4⁺CD45RA⁺ T lymphocyte percentage and also a higher ratio of CD4⁺CD45RA⁺/CD4⁺CD45RO⁺. Interestingly, in active older adults with IgG CMV⁺ ($n = 30$) the count of CD4⁺CD45RA⁺ T lymphocytes was higher than in the inactive group with IgG CMV⁺ ($n = 20$).

Conclusion: Based on the flow cytometry analysis, we concluded that lifestyle exercise could lead to rejuvenation of the immune system by increasing the percentage of naïve T lymphocytes or by reducing the tendency of the inverse CD4/CD8 ratio.

Keywords: Lymphocytes T, Obesity, Physical activity, Successful ageing

Background

Immune function deregulates with age in the process commonly called immunosenescence. The characteristics of immunosenescence are related to a weaker response to new infections and vaccination as well as

diminished anti-tumor immunosurveillance with increased self-reactivity and chronic systemic inflammation. Age-related thymus involution is a dynamic process that influences overall T lymphocytes development [1]. The T lymphocyte pool is part of subpopulations of antigen-inexperienced naïve T lymphocytes and antigen-experienced memory T lymphocytes. The human immune compartment is composed of $\sim 10^{12}$ T lymphocytes in total, $\sim 10^{11}$ of which are naïve [2].

* Correspondence: a.zembron-lacny@cm.uz.zgora.pl

¹Department of Applied and Clinical Physiology, Collegium Medicum University of Zielona Gora, 28 Zyty Str., 65-046 Zielona Gora, Poland
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

During the process of ageing, the population of naïve T lymphocytes decreases, while the population of memory T lymphocytes undergoes intensive proliferation [3–5]. An increase in memory T lymphocytes reinforces immunological memory of previously encountered antigens, thereby augmenting the existent immune protection. The remaining naïve T lymphocyte pool experiences a loss of T lymphocyte receptor (TCR) ‘structural diversity’ [6, 7]. The appropriate range of antigen specificity is ensured by the diversity of T lymphocyte clones associated with a different number of TCR complexes [2]. Ageing affects naïve CD4⁺ T and CD8⁺ T lymphocyte counts in a different way. The number of CD4⁺ naïve T lymphocytes is stable for most of the lifespan but it markedly declines around the age of 70 years. Contrastingly, CD8⁺ naïve T lymphocytes appear to be more susceptible to apoptosis and therefore are more sensitive to age-related changes. Homeostatic proliferation plays an important role in the maintenance of the number of naïve T lymphocytes, and cytokine IL-7 particularly supports the survival of CD8⁺ naïve T lymphocytes [8]. The immunosenescence-related disproportion in T lymphocytes increases a risk of infectious diseases and contributes to the cardiovascular, metabolic, autoimmune, and neurodegenerative diseases [9].

As ageing is a natural process, the risk associated with relatively invasive surgical and immune-therapeutic procedures, i.e. gene and/or cytokine therapy and monoclonal antibody therapy, in otherwise healthy people is unlikely to be deemed acceptable. Of late, there has been some interest in the changes to modifiable factors, such as physical activity and certain lifestyle factors, which can significantly attenuate immunosenescence [10, 11]. In their latest study, Wong et al. [12] revealed that an immune response to the vaccination was more pronounced in physically active older adults females. However, the majority of studies concentrate on the effects of long-term physical activity on immunity in elite athletes, immunity in active and inactive young participants or they only document the immune changes following an exercise training intervention or physical therapy [10, 13]. Daily physical activity which particularly affects immunity and dramatically declines with age has not been widely investigated yet.

The interaction of lifestyle exercise and immunity is very complex and yet to be clarified. Regular physical activity including cardiovascular and resistance exercise has been associated with lower levels of pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF α , and higher antioxidant capacity [14, 15], improved neutrophils chemotaxis [16], NK cell cytotoxicity and increased T lymphocytes proliferation [17] as well as a stronger post-vaccination response [12, 18]. Previous studies on immunosenescence did not indicate which aspects of

age-related immune changes are driven by exercise factors and which may be the consequence of a sedentary lifestyle. Future analyses can improve our understanding of the major features of immunosenescence and the impact of regular physical activity on the immune system in old age [19]. Therefore, the present study was designed to evaluate the relationship between lifestyle exercise and percentage of CD4⁺ and CD8⁺ naïve and memory T lymphocytes as well as CD4/CD8 ratio in active compared to inactive older adults.

Methods

Participants

Ninety-nine participants were recruited from the University of the Third Age (U3A), which is an organization encouraging the older adults over 55 years of age to stay active by participating in many educational programmes, including arts, classical studies, discussion classes, computer courses, crafts, drama, film/cinema studies, history, languages, literature, music, sciences, social sciences, and physical activity. The current health status and lifestyle of the participants were controlled by using the health history questionnaire [20]. The age of 60–90 years and the same access to medical healthcare were the inclusion criteria. The exclusion criteria, based on the medical interview, were as follows: acute infectious and oncologic diseases, cardiovascular, neurological and musculoskeletal disturbances and an implemented pacemaker. Moreover, twenty-two older adults withdrew from the project during the study due to high blood pressure above 180/110 mmHg, hospitalization, serious knee injury or a cold. Eventually, the study included fifty-four individuals aged 65–88 years (females $n = 47$, males $n = 7$) who represented the successful ageing according to the definition by Geard et al. [21]. According to the gait speed measurement (6-min walk test), the Åstrand-Ryhmung bike test and Community Healthy Activities Model Program for Seniors (CHAMPS) questionnaire, the participants were classified into physically active ($n = 34$) and inactive ($n = 20$) groups (Table 1). All participants were informed of the aim of the study and gave their written consent for participation in the project. The protocol of the study was approved by The Bioethics Commission at Regional Medical Chamber Zielona Gora, Poland (N^o01/66/2017, N^o21/103/2018) in accordance with the Helsinki Declaration.

Body composition

Body mass (BM) and body composition fat-free mass (FFM) and fat mass (FM) were evaluated by a bioelectrical impedance method using Tanita Body Composition Analyser MC-980 (Japan) calibrated prior to each test session in accordance with the manufacturer’s guidelines. Duplicate measurements were made standing

Table 1 Anthropometrics and body composition as well as physical activity level (mean \pm SD)

	Active n = 34	Inactive n = 20	Active vs. Inactive p level	η^2
Age [yr.]	70.2 \pm 5.8	73.5 \pm 5.4	< 0.05	0.008
Weight [kg]	69.8 \pm 11.8	67.1 \pm 11.3	0.567	0.000
Height [cm]	160.3 \pm 6.0	159.7 \pm 7.2	0.573	0.040
BMI [kg/m ²]	27.1 \pm 3.6	26.3 \pm 4.1	0.529	0.006
FM [kg]	24.1 \pm 5.8	22.0 \pm 5.9	0.268	0.004
FM%	34.3 \pm 4.7	32.7 \pm 6.2	0.348	0.006
FFM [kg]	45.7 \pm 7.7	45.1 \pm 8.7	0.622	0.012
SBP [mmHg]	145.1 \pm 19.2	151.3 \pm 20.9	0.264	0.017
DBP [mmHg]	81.2 \pm 11.6	79.2 \pm 12.9	0.602	0.004
6MWT [m]	527 \pm 52	388 \pm 59	< 0.001	0.662
Gate speed [m/s]	1.5 \pm 0.1	1.0 \pm 0.1	< 0.001	0.662
VO ₂ max [mL/kg/min]	35.8 \pm 5.7	32.8 \pm 4.0	0.131	0.060

Abbreviations: *BMI* Body Mass Index, *FM* Fat Mass, *FFM* Fat-Free Mass, *SBP* systolic blood pressure, *DBP* diastolic blood pressure, *6MWT* 6-min walking test, *VO₂max* maximal oxygen consumption. The measurements in groups are compared by the one-way ANOVA or the Mann-Whitney non-parametric test (if the normality assumption is violated)

upright and the average value was included for the final analysis. The recurrence of measurement was 98%. The measurements were taken between 7:00 and 9:00 a.m., before blood sampling in accordance with the procedure previously used by us in older adults [15, 22].

Functional fitness

The 6-min walking test (6MWT) was accomplished according to technical standards of European Respiratory Society and American Thoracic Society [23]. A marked walkway was laid out in a 50-m rectangular area (dimensions: 20 \times 5 m), with cones placed at regular intervals to indicate the distance covered. The aim of the test was to walk as fast and as far as possible within the allotted time (6 min). The total distance walked in the test was recorded and the 6MWT gait speed was then calculated by the following equation: 6MWT gait speed (m/s) = total distance(m)/360 s. The gait speed ranging from 1.3 to 1.8 m/s classified the participants as physically active and the gait speed < 1.3 m/s classified them as inactive according to Middleton et al. [24].

Cardiorespiratory fitness

The measurement of maximal oxygen consumption (VO₂max) was executed via the indirect method known as the Åstrand-Ryhming bike test (6-min submaximal exercise test) which depends on the linear relationship between heart rate (HR) and VO₂ to predict maxVO₂ and which is approved for both men and women of different ages [25]. Each participant performed a 6-min submaximal exercise test on a cycle ergometer eBike GE Healthcare (Germany). Initially, the study participants rested for 15 min prior to the measurement of their

resting HR. According to normative data for submaximal exercise test, the participants who reached the values of VO₂max > 35 mL/kg/min were classified as active (high activity level) and the remaining ones were determined as inactive (average and low activity level).

Type and amount of physical activity

The type and weekly amount of physical activity was evaluated by CHAMPS questionnaire [26]. The CHAMPS was originally designed to assess the types and intensity levels of physical activity including lighter (e.g. leisurely walking, water gymnastics, stretching, Tai-Chi) as well as more vigorous activities (e.g. dancing, cycling, swimming). Currently, the CHAMPS also includes a group of items related to a sedentary lifestyle e.g. sitting and chatting with friends.

Blood sampling

Blood samples were taken from the median cubital vein using S-Monovette-EDTA K₂ tubes (Sarstedt, Austria) for flow cytometry analysis and morphology and S-Monovette - serum tubes were used for other biochemical markers. Serum samples were left to clot for 45 min before centrifugation and then centrifuged at 3000 g for 10 min. Aliquots of serum were stored at - 80 °C.

Flow cytometry analysis

Cytometric analysis was performed using eight-parameter CyFlow Space Sorter flow cytometer by Sysmex Partec (Germany). For the analysis of immune cells, CyLyse kit by Sysmex (Germany) was used. One hundred microliter venous blood was mixed with fluorochrome labelled monoclonal antibodies (CD8 APC, CD4

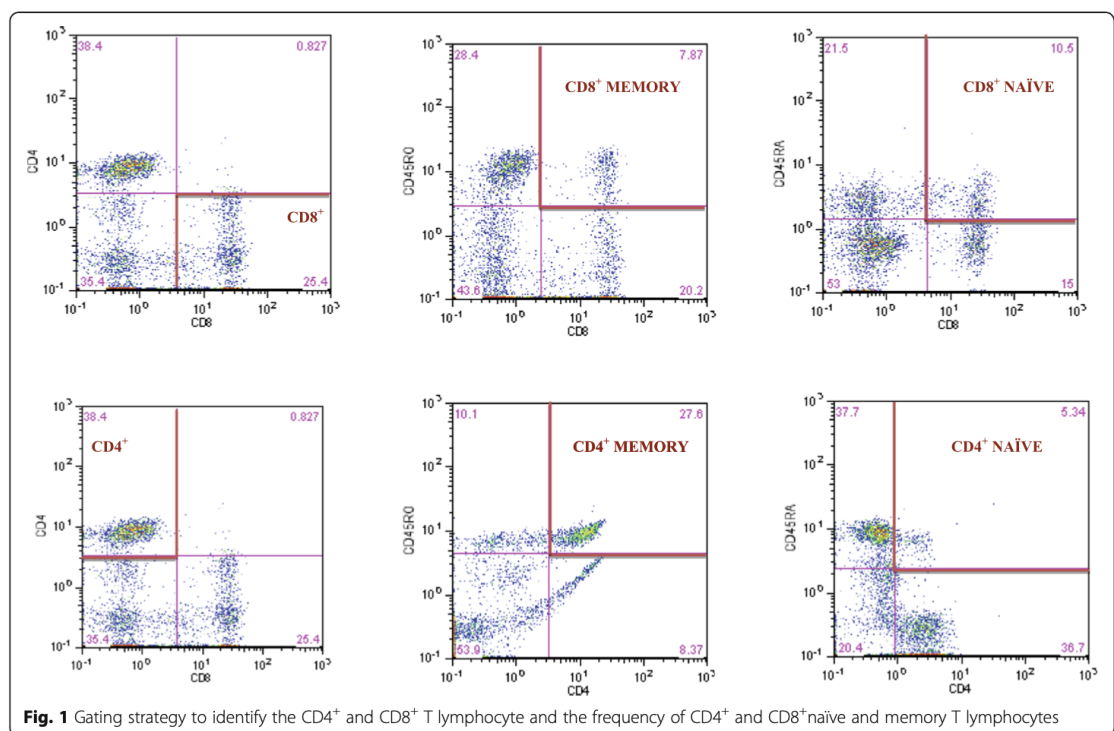
FITC, CD45 RA Pacific Blue™ CD45RO PE) and incubated for 15 min in the dark at room temperature. After the incubation 100 µL of Leukocyte Fixation Reagent A was added and incubated again in the dark for 10 min. In the last step, 2.5 ml Erythrocytes Lysing Reagent B was added, mixed and incubated in the dark for 20 min and further measurements were made. T helper and cytotoxic lymphocytes were gated by positive surface staining for CD4 and CD8 and were expressed as a percentage of gated lymphocytes. Memory and naïve subpopulations were gated by positive surface staining for CD45RO and CD45RA, respectively. The strategy of gated lymphocytes T was shown in Fig. 1. The ratios of CD4⁺CD45RA⁺ to CD4⁺CD45RO⁺ and CD8⁺CD45RA⁺ to CD8⁺CD45RO⁺ as prognostic markers of chronic diseases, were calculated according to Hang et al. [27]. The CD4/CD8 ratio was calculated according to McBride and Striker [28] and the reference values were adopted from Strindhall et al. [29]. The ratios ≥1 or ≤2.5 are generally considered normal, however, a wide heterogeneity exists because of sex, age, ethnicity, genetics, environmental exposures and infections. The inverted or high CD4/CD8 ratio (<1 or >2.5) is regarded as an immune risk phenotype and is associated with immunosenescence and chronic inflammatory diseases [29].

Haematological variables

Peripheral blood morphology: white blood cell count (WBC), granulocytes (%GRA), lymphocytes (%LYM), red blood cells count (RBC), haemoglobin (HB), haematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC), platelets (PLT) were determined by using 3 diff BM HEM3 Biomaxima (Poland).

Biochemical markers

Total cholesterol (TC), high-density lipoproteins (HDL), low-density lipoproteins (LDL), triglycerides (TG) were determined by using BM200 Biomaxima (Poland). Non-HDL cholesterol was calculated by subtracting HDL from the total cholesterol concentration. CRP was measured using a high sensitivity assay in duplicate by means of a commercial kit from DRG International (USA) with the detection limit of 0.001 mg/L. The intra-assay coefficient of variation (intra-assay CV) for the CRP ELISA kit was 4.44%, and the inter-assay coefficient of variation (inter-assay CV) was 3.28%. The serum glucose was evaluated by using commercially available reagents and a mobile spectrophotometer DP 310 Vario II (Germany).



Cytomegalovirus (CMV) IgG

The CMV IgG serostatus was determined using a commercial kit from DRG International (USA). The reference values of CMV-seronegativity (IgG CMV⁻) were < 9 DU/mL and CMV-seropositivity (IgG CMV⁺) > 11 DU/mL. The intra-assay CV for the CMV kit was 7.75% and inter-assay CV was 11.45%.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the R system, version 3.6.1 [30]. The assumptions for the use of parametric or non-parametric tests were checked using the Shapiro-Wilk and Levene's tests to evaluate the normality of the distributions and the homogeneity of variances, respectively. The significant differences in mean values between the groups (active vs. inactive) were assessed by the one-way ANOVA. The analysis of covariance (ANCOVA) was used in classification of body composition and functional fitness that might influence the covariate variables such as CMV IgG concentration and T lymphocyte phenotypes. The chi-squared (χ^2) test was used to compare females and males using categorical data from CHAMPS questionnaire. If the normality and homogeneity assumptions were violated, the Mann-Whitney non-parametric test was used. Additionally, eta-squared (η^2) was used as a measure of effect size which is indicated as having no effect if $0 \leq \eta^2 < 0.01$, a minimum effect if $0.01 \leq \eta^2 < 0.06$, a moderate effect if $0.06 \leq \eta^2 < 0.14$, and a strong effect if $\eta^2 \geq 0.14$ [31, 32]. Spearman's rank correlation (r_s - Spearman rank correlation coefficient) was calculated to describe the relationships between body composition and T lymphocyte count. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

Body composition

The body mass index (BMI) in the physically active older adults ranged from 19.4 to 35.0 kg/m² whereas in the physically non-active older adults their BMI fell within 19.0 to 37.0 kg/m² range (Table 1). Jointly, in both groups, approximately 20% were classified as obese (BMI > 30 kg/m²). The BMI value highly correlated with fat mass in active ($r_s = 0.806$, $p < 0.001$) and inactive individuals ($r_s = 0.783$, $p < 0.001$). In the physically inactive group, the high fat mass significantly correlated with CD4⁺ ($r_s = 0.491$, $p < 0.05$) and CD4⁺CD45RO⁺ lymphocytes ($r_s = 0.636$, $p < 0.01$) (Fig. 2). This shows that a low level of everyday activities impairs immunity more considerably in the obese than in the slim older adults.

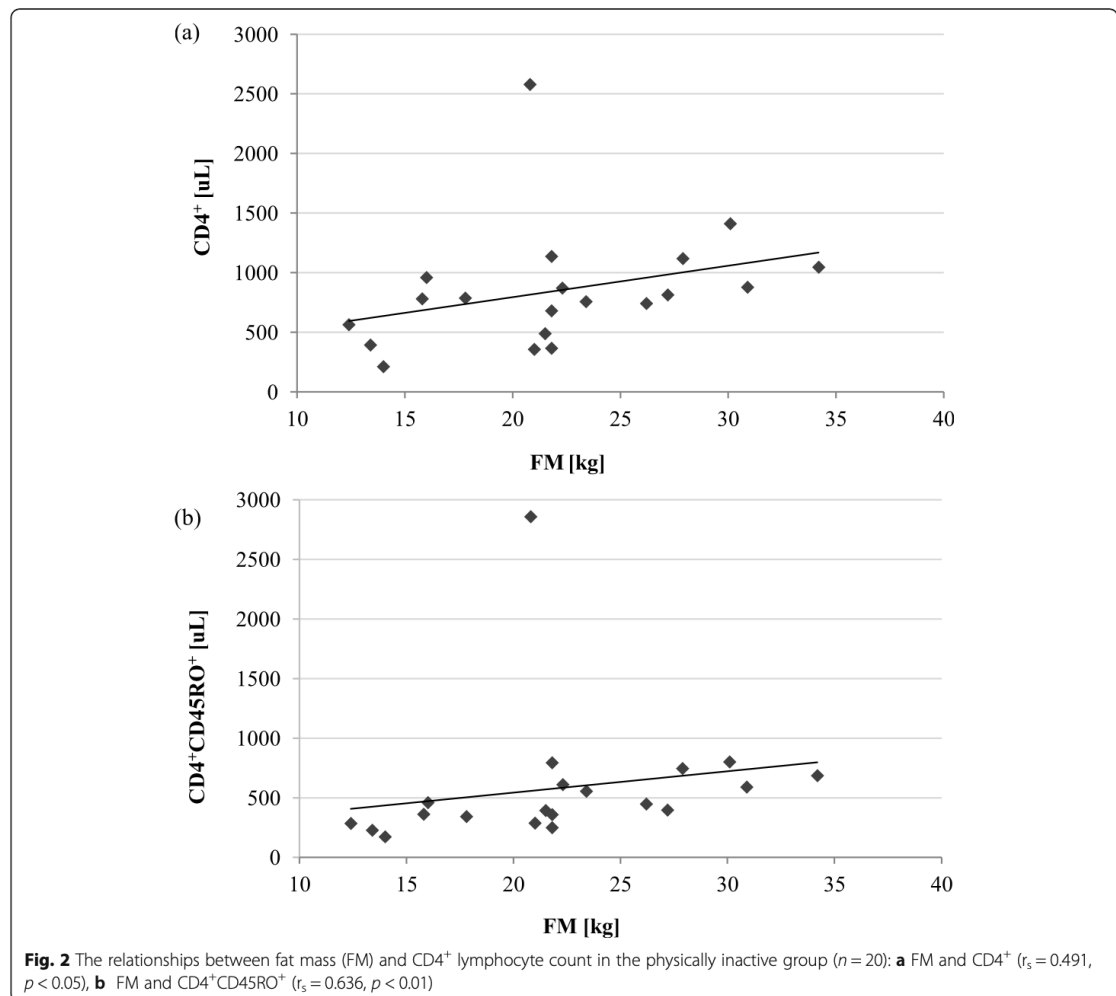
Functional and cardiorespiratory fitness

The result of the 6MWT was 36% higher in active than inactive group (Table 1). Above 95% of the study participants achieved a normal gait speed > 1 m/s according to

reference values by Middleton et al. [24]. High physical fitness level was confirmed by VO₂max value which was elevated by 10% in active individuals. Interestingly, the older adults who demonstrated a superior gait speed > 1.3 m/s and VO₂max > 35 mL/kg/min demonstrated a significantly higher CD4⁺CD45RA⁺T lymphocyte population and a higher CD4⁺CD45RA⁺/CD4⁺CD45RO⁺ ratio compared to the inactive group. In turn, the inactive older adults whose gait speed amounted to 1.0 ± 0.1 m/s, demonstrated VO₂max < 35 mL/kg/min and had a significantly higher percentage of both CD4⁺CD45RO⁺ and CD8⁺CD45RO⁺T lymphocytes compared to the active individuals. The disproportion in the naïve and memory T lymphocytes emphasises the important role of physical activity in the immunity in the older adults. The value η^2 indicated a strong effect of lifestyle exercise on the result of the gait speed test and a moderate effect on VO₂max value. The most physically active participants, regardless of their gender, indicated Tai-Chi as their favourite type of physical activity (60% of respondents in CHAMPS questionnaire) as opposed to leisurely walking, water gymnastics or Nordic-walking. Tai-Chi was already earlier recommended as an intervention for a wide variety of health problems as it can contribute to reduction of chronic inflammation in the older adults [33].

Flow cytometry analysis

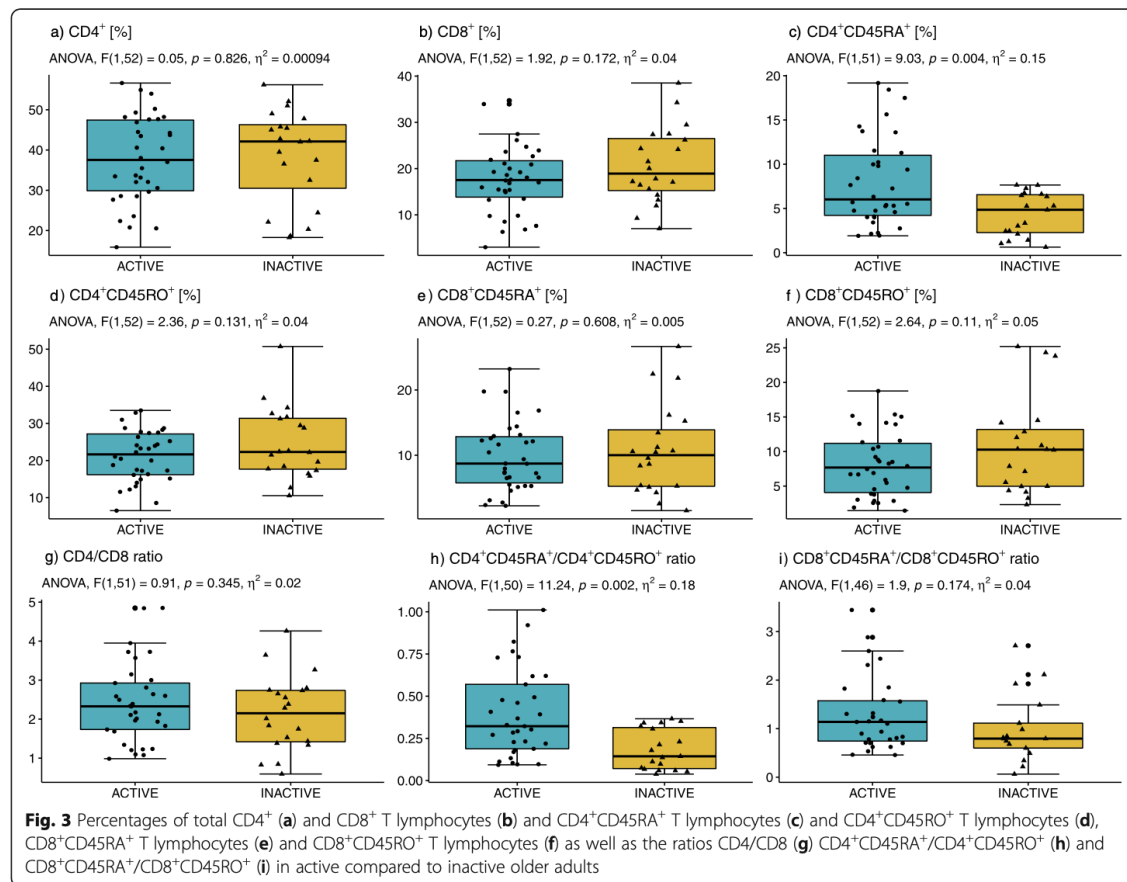
CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were analysed within naïve and memory subpopulations in the study groups of active and inactive older adults (Fig. 3, Table 2). The percentage of CD8⁺ T lymphocytes showed a tendency towards low values in physically active compared to inactive older adults participants but the differences did not reach the level of significance (Fig. 3b). The active study group of older adults was found to exhibit a decreased percentage of both CD4⁺CD45RO⁺ and CD8⁺CD45RO⁺ T lymphocytes (Fig. 3d and f). However, the percentage of CD4⁺CD45RA⁺ (Fig. 3c) and the CD4⁺CD45RA⁺/CD4⁺CD45RO⁺ ratio (Fig. 3h) were significantly higher in the physically active group compared to the inactive one. There were no statistically significant differences between males and females in either of the groups (active vs. inactive). The value η^2 indicated a strong impact of lifestyle exercise on the CD4⁺CD45RA⁺ T lymphocytes as well as on the ratio of CD4⁺CD45RA⁺/CD4⁺CD45RO⁺. The CD4/CD8 ratio was observed to be higher in the active than inactive individuals (Fig. 3g). 55.9% of the physically active older adults demonstrated CD4/CD8 ratio ≥ 1 or ≤ 2.5 , 41.2% of them exhibited the CD4/CD8 ratio > 2.5, and the ratio < 1 was recorded only in 2.9%. The CD4/CD8 ratio ≥ 1 or ≤ 2.5 was detected in approximately 45% of the inactive older adults, whereas 40% of them exhibited the CD4/CD8 ratio > 2.5, and only 15% showed the CD4/



CD8 ratio < 1 . This shows that inactive lifestyle especially shifts the values of CD4/CD8 ratio < 1 . The changes in CD4/CD8 ratio also depend on BMI (normal, overweight and obesity) in both active and inactive older adults. The majority of active older adults participants, regardless of body mass, had a CD4/CD8 value within the reference range and only 14% of active adults with obesity had an inverted CD4/CD8. In turn, the majority of the inactive older adults, regardless of their body mass, manifested CD4/CD8 ratio > 2.5 and approximately 30% of older inactive adults with overweight had CD4/CD8 < 1 (Table 3). The results clearly indicate that a low level of lifestyle exercise changes the CD4/CD8 ratio included in IRP which, in turn, is related to immunosenescence and chronic inflammatory diseases [29].

CMV IgG status and immune cells (Table 4)

88% of the active older adults participants were CMV-seropositive and the mean value of IgG CMV⁺ was 98.1 ± 21.21 DU/mL and only 12% of the active participants were CMV-seronegative. The results obtained for the inactive older adults showed that 100% of them were CMV-seropositive and the average value reached 92.3 ± 22.8 DU/mL. In the physically inactive IgG CMV⁺ participants, a decreasing trend of the CD4/CD8 ratio was observed unlike in the physically active individuals with IgG CMV⁺, however, both values of the CD4/CD8 ratio fell within the reference range. The conducted analyses revealed statistically significant differences in the absolute CD4⁺CD45RA⁺ T lymphocytes count as well as the CD4⁺CD45RA⁺/



CD4⁺CD45RO⁺ ratio between active CMV-seropositive compared to inactive CMV-seropositive participants. T lymphocyte absolute counts did not differ between CMV-seronegative and CMV-seropositive groups, which can be ascribed to a small

size of the CMV-seronegative group. The obtained results suggest that regular physical activity has a positive effect on the immune system, especially in CD4⁺CD45RA⁺ T lymphocyte count, regardless of CMV-seropositivity.

Table 2 Changes in T lymphocytes absolute count (mean ± SD)

T lymphocytes absolute count [μL]	Active n = 34	Inactive n = 20	Active vs. Inactive p level	η^2
CD4 ⁺	880.8 ± 363.7	846.3 ± 506.4	0.210	0.031
CD8 ⁺	414.6 ± 225.3	446.7 ± 262.7	0.560	0.007
CD4 ⁺ CD45RA ⁺	181.9 ± 113.5	108.0 ± 88.3	< 0.01	0.192
CD4 ⁺ CD45RO ⁺	494.8 ± 225.8	579.8 ± 568.8	0.784	0.002
CD8 ⁺ CD45RA ⁺	233.1 ± 149.4	230.1 ± 164.5	0.920	0.001
CD8 ⁺ CD45RO ⁺	187.2 ± 115.9	252.7 ± 299.5	0.649	0.004
CD4/CD8	2.5 ± 1.1	2.1 ± 1.0	0.345	0.018
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ /CD4 ⁺ CD45RO ⁺	0.4 ± 0.3	0.3 ± 0.3	< 0.001	0.179
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ /CD8 ⁺ CD45RO ⁺	1.6 ± 1.1	1.6 ± 1.7	0.132	0.040

The measurements in groups are compared by the one-way ANOVA or the Mann-Whitney non-parametric test (if the normality assumption is violated)

Table 3 Changes in the CD4/CD8 ratio depending on body mass index (BMI)

CD4/CD8 ratio	Active n = 34			Inactive n = 20		
	< 1	≥ 1 or ≤ 2.5	> 2.5	< 1	≥ 1 or ≤ 2.5	> 2.5
Normal weight BMI 18.5–24.9 kg/m ²	0%	60%	40%	10%	60%	30%
Overweight BMI 25.0–29.9 kg/m ²	0%	53%	47%	28.6%	28.6%	42.8%
Obesity BMI ≥ 30 kg/m ²	14.3%	57.1%	28.6%	0%	33.3%	66.7%

Haematological variables (Table 5)

The immune cell numbers (lymphocytes, %LYM, %GRA, %HCT, MCV, MCHC, MCH) were found to be at similar levels in all participants. However, there were significant differences between PLT in the active compared to inactive individuals. Moreover, an increasing trend in HB, RBC and HCT was observed in the physically active group. The value η^2 indicated a moderate influence of lifestyle exercise on HB level, which suggests that a protective effect of physical activity is also exerted on hematopoietic processes in the older adults. There were no statistically significant differences in HB, RBC and HCT between males and females in both groups (active vs. inactive).

Biochemical markers (Table 6)

The glucose and TG concentrations did not exceed the limits of the reference values in most study participants. TC concentration was found to fall within the range of 157 to 372 mg/dL in the physically active participants whereas in the inactive group it amounted to the values from 162 to 394 mg/dL. High TC concentration > 200 mg/dL was observed in approximately 87% of the study participants and only 5 participants took lipid-modifying drugs. Similar

observations were made with regard to the changes in LDL, HDL and non-HDL concentrations. CRP level tended to reach higher values in the active than inactive participants but remained within the reference range. However, a lower CRP concentration (2.62 ± 1.88 mg/L) was found in the older adults who demonstrated a superior gait speed ≥ 1.4 m/s when compared to the other active participants (4.19 ± 2.75 mg/L). CRP concentration was inversely correlated with the results of the 6MWT or gait speed test ($r = -0.350$, $p < 0.05$) in the active older adults, which clearly indicates that lifestyle exercise diminishes the systemic inflammatory response.

Discussion

Regular physical activity has a profound effect on normal functioning of the immune system. For decades it has been accepted that prolonged periods of high-intensity exercise could depress immunity [34]. However, current evidence from epidemiological studies shows that leading a physically active lifestyle is likely to be beneficial rather than harmful to the immune function [35]. Exercise-induced improvements in immunity can be related to reduction in inflammation, maintenance of thymic mass, changes in the composition of memory

Table 4 Distribution of T lymphocytes phenotypes in relation to CMV serostatus (mean \pm SD)

T lymphocytes absolute count [μ L]	Active IgG CMV ⁺ n = 30	Active IgG CMV ⁻ n = 4	p level	η^2	Inactive IgG CMV ⁺ n = 20	Active vs. Inactive p level	η^2
CD4 ⁺	922.4 \pm 349.6	569.0 \pm 356.0	0.067	0.101	846.3 \pm 506.4	0.258	0.008
CD8 ⁺	434.5 \pm 226.9	265.2 \pm 164.8	0.198	0.060	446.7 \pm 262.7	0.992	0.001
CD4 ⁺ CD45RA ⁺	189.0 \pm 112.8	128.9 \pm 120.8	0.337	0.030	108.0 \pm 88.3	< 0.01	0.132
CD4 ⁺ CD45RO ⁺	518.2 \pm 219.5	319.5 \pm 221.0	0.099	0.083	579.8 \pm 568.8	0.589	0.006
CD8 ⁺ CD45RA ⁺	247.6 \pm 149.7	123.8 \pm 103.9	0.118	0.074	230.1 \pm 164.5	0.536	0.003
CD8 ⁺ CD45RO ⁺	192.8 \pm 114.3	145.2 \pm 137.1	0.453	0.018	252.7 \pm 299.5	0.977	0.020
CD4/CD8	2.5 \pm 1.0	2.8 \pm 1.8	0.541	0.012	2.1 \pm 1.0	0.294	0.023
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ /CD4 ⁺ CD45RO ⁺	0.4 \pm 0.3	0.4 \pm 0.2	0.777	0.000	0.3 \pm 0.3	< 0.001	0.061
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ /CD8 ⁺ CD45RO ⁺	1.6 \pm 1.2	1.0 \pm 0.3	0.393	0.038	1.6 \pm 1.7	0.350	0.000

Abbreviations: IgG CMV⁻ cytomegalovirus seronegativity, IgG CMV⁺ cytomegalovirus seropositivity. The comparison between active and inactive group concerns CMV seropositive participants. The measurements in groups are compared by the one-way ANOVA or the Mann-Whitney non-parametric test (if the normality assumption is violated)

Table 5 Haematological variables (mean \pm SD)

	Reference values	Active <i>n</i> = 34	Inactive <i>n</i> = 20	Active vs. Inactive <i>p</i> level	η^2
WBC [$10^3/\mu\text{L}$]	5.0–11.6	6.7 \pm 2.1	6.5 \pm 2.0	0.740	0.055
Lymphocytes [$10^3/\mu\text{L}$]	1.3–4.0	2.3 \pm 0.6	2.2 \pm 0.9	0.119	0.002
Granulocytes [$10^3/\mu\text{L}$]	2.4–7.6	3.9 \pm 1.6	3.8 \pm 1.4	0.851	0.076
LYM %	19.1–48.5	35.5 \pm 7.6	33.7 \pm 9.0	0.486	0.003
GRA %	43.6–73.4	57.2 \pm 9.2	57.2 \pm 9.0	0.981	0.000
RBC [$10^3/\mu\text{L}$]	F 4.0–5.5 M 4.5–6.6	4.8 \pm 0.3	4.7 \pm 0.3	0.209	0.054
HB [g/dL]	F 12.5–16.0 M 13.5–18.0	13.9 \pm 0.7	13.7 \pm 0.8	0.513	0.108
HCT [%]	F 37–47 M 40.0–51.0	39.5 \pm 2.0	38.6 \pm 2.4	0.201	0.031
MCV [fL]	F 80–95 M 80–97	81.9 \pm 3.0	81.7 \pm 2.6	0.950	0.048
MCH [pg]	F 27.0–32.0 M 26.0–32.0	28.7 \pm 1.3	29.0 \pm 1.1	0.395	0.054
MCHC [g/dL]	F 32.0–36.0 M 31.0–36.0	35.1 \pm 0.8	35.5 \pm 0.6	0.330	0.018
PLT [$10^3/\mu\text{L}$]	150–400	270 \pm 60	236 \pm 39	< 0.01	0.031

Abbreviations: *WBC* white blood cells, *LYM* lymphocytes, *GRA* granulocytes, *RBC* red blood cells, *HB* haemoglobin, *HCT* haematocrit, *MCV* mean corpuscular volume, *MCH* mean cells haemoglobin, *MCHC* corpuscular/cellular haemoglobin concentration, *PLT* platelets, *F* female, *M* male. The measurements in groups are compared by the one-way ANOVA or the Mann-Whitney non-parametric test (if the normality assumption is violated)

and naïve T lymphocytes or enhanced immunosurveillance. Indeed, physical activity is a powerful intervention that has a great potential to improve immune and health outcomes in the older adults, the obese, and patients with cancer and chronic viral infections [10, 34]. The benefits of regular physical activity undertaken by the older adults are much less documented than the effects of regular physical activity on the immune system in young individuals [36]. Randomized prospective trials were conducted to explain the effect of aerobic exercise on the immune system of the older adults, where Nieman et al. [37] found that a 3-month moderate aerobic exercise programme did not cause a significant increase in T lymphocyte mitogenesis. On the other hand, the effect of resistance training on the immune function has

also been poorly investigated and most researchers agreed that 8–12-week training had minimal effects on innate or acquired immunity in older adults [38]. It is well known that physical activity does not only exert anti-inflammatory effects but also positively affects the metabolic health in the older adults. The results of CHAMPS questionnaire in our study confirmed the activity of our recruited participants in everyday life, where older adults who were physically active were much more likely to lead a more active life by being engaged in Nordic walking, swimming, intensive walks, and Tai-Chi, than inactive older adults participants. In our study, the active older adults covered a much longer distance in the 6MWT compared to the inactive older adults. In addition, the active older adults demonstrated the gait

Table 6 Lipoprotein-lipid profile, glucose and C-reactive protein (mean \pm SD)

	Reference values	Active <i>n</i> = 34	Inactive <i>n</i> = 20	Active vs. Inactive <i>p</i> level	η^2
Glucose [mg/dL]	60–115	98.6 \pm 17.1	97.6 \pm 20.3	0.452	0.000
TG [mg/dL]	< 150	90.2 \pm 25.7	83.7 \pm 26.0	0.375	0.000
TC [mg/dL]	< 200	262.4 \pm 52.6	251.3 \pm 59.1	0.534	0.013
LDL [mg/dL]	< 130	147.1 \pm 40.3	149.1 \pm 50.8	0.889	0.000
HDL [mg/dL]	desirable > 60	82.2 \pm 16.0	81.1 \pm 11.8	0.603	0.023
non-HDL [mg/dL]	< 130	180.2 \pm 54.7	170.2 \pm 65.5	0.599	0.047
CRP [mg/L]	0.068–8.2	3.2 \pm 2.5	2.8 \pm 3.1	0.121	0.004

Abbreviations: *TG* triglycerides, *TC* total cholesterol, *LDL* low density lipoprotein, *HDL* high density lipoprotein, *CRP* C-reactive protein. The measurements in groups are compared by the one-way ANOVA or the Mann-Whitney non-parametric test (if the normality assumption is violated)

speed of 1.5 ± 0.1 m/s that was significantly higher in comparison to the non-active group whose gait speed amounted to 1.0 ± 0.1 m/s, which can be indicative of better functional fitness of the active older adults. It is believed that a low intensity of everyday activity and a sedentary lifestyle constitute an independent risk of diseases known as „sedentariness“. A longitudinal Canadian study of 17,013 people aged over 12 years demonstrated that those who were inactive for a longer time span were up to 50% more likely to die prematurely in comparison to individuals who spent shorter periods of time in a sitting position [39].

In addition to beneficial effects on the immune system, physical activity throughout lifetime also favourably affects well-being and facilitates daily functioning in society [40]. Good functional status of the older adults participants could be related to their participation in various physical and health education programmes at the University of the Third Age. In recent years the effects of regular physical activity on T lymphocytes have attracted a considerable interest and plenty of evidence showed the lifestyle exercise may lead to rejuvenation of the immune system and may exert a positive effect on thymic output. The active older adults in our study were observed to have a statistically significantly increased percentage of blood $CD4^+CD45RA^+$ T lymphocytes in comparison to the inactive older adults. According to Weyh et al. [41], this may be associated with elevated IL-15 levels that affect the immune homeostasis which is caused by the induction of a better survival rate of naïve T lymphocytes. Duggal et al. [19] noticed some reduction in systemic inflammation in amateur cyclists (mean age: 55–75 years) engaged in high levels of physical activity for most of their adult life. Spielmann et al. [42] also found that males aged 18–61 years, with high VO_2 max level, demonstrated an increased number of $CD8^+$ naïve T lymphocytes.

Attempts to determine the relationships between CMV-seropositivity and changes in the count of T lymphocytes have been undertaken by scientists for many years. The results of the research carried out due to the health condition of the examined patients, genetic background and/or many others factors in highly diverse human populations are varied. Most researchers agree that CMV infection at least accelerates the age-related decrease in the number of naïve T lymphocytes and the increase in memory T lymphocytes [43]. In our study, we showed that, regardless of CMV-seropositivity, in the physically active older adults there was an increase in the count of $CD4^+CD45RA^+$ T lymphocytes as well as in the $CD4^+CD45RA^+/CD4^+CD45RO^+$ ratio compared to the inactive CMV-seropositive older adults. This emphasises the beneficial effect which the activity of older adults exerts on their immune system functioning.

Latent infection in people with normal immunity frequently shows no symptoms, but it could be dangerous for immune compromised ones. This is associated with $CD4/CD8 < 1$ identified in immune-risk individuals, which induces a high risk of mortality due to weaker immune response [44]. In our study, the inactive older adults CMV-seropositive individuals showed a lower $CD4/CD8$ ratio compared to the active older adults CMV-seropositive adults. Interestingly, older active CMV-seronegative adults obtained the $CD4/CD8$ ratio of 2.8 ± 1.5 which is higher than that observed in the active older CMV-seropositive adults (2.5 ± 1.0) as well as in the inactive CMV-seropositive individuals (2.1 ± 0.9). Nevertheless, due to the limited number of IgG CMV-seronegative individuals we were not able to draw unequivocal conclusions and the research must be continued.

During the past decade, three prospective cohort studies with the participation of Swedes, Dutch and Belgians were performed to assess the IRP in the older adults defined by the $CD4/CD8$ ratio [45]. The inconsistencies may be ascribed to a large number of factors, including gender, age, nutrition, amount of physical activity or fat content, which can all affect the ratio, and also to the fact that the values ≥ 1 or ≤ 2.5 are commonly used as the reference values in healthy individuals [28]. The $CD4/CD8$ ratio can also be a useful marker to determine the body response to lifestyle exercise. Researchers have not yet unequivocally established whether the $CD4/CD8$ ratio increases or decreases with age. Neither are they unanimous as to whether the rise or the decline in the ratio is more favourable to maintain the longevity of the older adults. The $CD4/CD8$ ratio was found to increase with age in OCTO/NONA surviving participants over 100 years of age [29]. On the other hand, the analysis by Vasson et al. [46] showed a decreasing trend of the $CD4/CD8$ with age in Spanish and French population. In our study, we searched for the answer whether lifestyle exercise had an effect on the $CD4/CD8$ ratio. Interestingly, the $CD4/CD8$ ratio was found to fall within the range of the reference values in 55.9% of the group of older active participants. Our study group of active older adults was classified as representing healthy ageing. The frequency of the $CD4/CD8$ ratio is also contingent on the body fat content and in all our study participants (both active and inactive), high fat content shifted the $CD4/CD8$ ratio < 1 .

Ageing is commonly accompanied by abdominal obesity, which is often associated with health problems and with an increased risk of infections. Adipose tissue acts as a ‘link’ between nutrition, metabolism and the proper functioning of the immune system in healthy individuals [47]. Furthermore, ageing does not only induce adiposity but it also causes changes in body composition, such as

the loss of muscle mass, muscle fat infiltration or bone loss [48], and the ensuing decline in physical performance adversely affects the quality of life [49]. Changes in body composition are a significant risk factor for developing impaired physical performance, however, there is little evidence that the FFM and FM indices are associated with physical disability in older adults, women and men alike [48].

It is worth mentioning that visceral adipose tissue contains the major immune cells which play a critical role in immune-metabolic homeostasis. The changes in adipose tissue T lymphocytes in obesity have been well documented in mice and humans [47]. In obese individuals the percentage of T lymphocytes of both CD4 and CD8 cells in adipose tissue is on the increase, secreting pro-inflammatory cytokines such as: IFN- γ (Th1) and IL-17 (Th17). The increased proportion of inflammatory CD4⁺ T lymphocytes in obese individuals results in a decrease in the number of T_{reg} [50].

To date, only a limited number of studies have analysed the composition of the peripheral blood of the immune system in obesity. In our study, a positive correlation between CD4⁺ T lymphocyte count and FM was observed in the inactive older adults. This finding suggests that the CD4⁺ T lymphocyte pool is on the rise along with the increase in the body fat. The results are consistent with the ones obtained by van der Weerd et al. [51], who reported an increase in the number of CD4⁺ T lymphocytes in obese people. Womack et al. [52] analysed both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in African women and they also recorded an increased T lymphocyte pool in the obese study participants. However, Tanaka et al. [53] observed a decrease in the T lymphocyte (CD4⁺ and CD8⁺) population in the peripheral blood of 34 obese individuals as compared to 50 non-obese participants. Contrastingly, O'Rourke et al. [54] demonstrated an elevated number of CD4⁺ T lymphocytes and a reduced number of CD8⁺ T lymphocytes in morbidly obese women compared to healthy, normal-weight controls. A potential mechanism related to such divergent results is a consequence of gender and age diversity of the study population as well as a small sample size. Therefore, the relationship between body mass and the CD4⁺ T lymphocyte pool invites additional consideration. What calls for further investigation is also the level of leptin, a hormone that is involved in the development of thymus gland especially in the differentiation of thymocytes from double positive cells to single positive CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes [55]. One of potential mechanisms of leptin has been proven to increase the production of naïve T lymphocytes (CD4⁺CD45RA⁺CD45RO⁻) and

to inhibit the proliferation of memory T lymphocytes (CD4⁺CD45RO⁺CD45RA⁻) [56]. It is still not entirely clear how obesity-induced metabolic dysfunction affects and changes the imbalance in the naïve and memory T lymphocytes population. Naïve T lymphocytes remain at rest and their activation is contingent on the energy demand for phosphorylation. After activation, the metabolic signature changes to provide support for increased glycolysis to fulfil cellular energy requirements [57]. According to Pearce et al. [58], the development and survival of memory T lymphocytes is reliant on fatty-acid oxidation (FAO). In our research we also demonstrated a positive correlation between FM and CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocyte count. Yang et al. [59, 60] observed that obesity accelerated the age-related reduction of T-lymphocyte receptor, which was connected with reduced thymopoiesis. Obesity was observed to lead to reduction in peripheral naïve T lymphocytes with increased frequency of effector-memory T lymphocytes. The precise role of leptin and the association between FM and immune cells, T lymphocytes in particular, in older individuals shall be analysed in further investigation in our cohort.

Appropriate strategies to counteract immunosenescence should be implemented and one of them should take into account the beneficial effect of lifestyle exercise on subpopulations of the immune system [61]. To date, numerous studies have confirmed a favourable impact of physical activity on the immune system including an enhanced proliferative capacity of T lymphocytes and magnified cytotoxic activity of NK cells. The extent of exercise-induced changes to the immune system in the older adults is quite diverse and depends on the type of physical activity as well as its volume and intensity. Future analyses will allow us to understand the role which physical activity sustained throughout life plays on prevention of immunosenescence and lifestyle diseases [62].

Conclusions

In this study we demonstrated that major features of immunosenescence were driven by lifestyle exercise. Physical activity sustained throughout life enhances the immune system by increasing the percentage of naïve T lymphocyte population and by reversing the CD4⁺CD45RA⁺/CD4⁺CD45RO⁺ ratio. Interestingly, the beneficial changes in the CD4/CD8 ratio were observed at the values of ≥ 1 or ≤ 2.5 in $\sim 50\%$ of physically active older adults regardless of their body weight, which classified them as successfully ageing older adults, contrary to the inactive and obese older adults who demonstrated the CD4/CD8 ratio < 1 .

Limitations

The limitations of the study include a relatively small number of participants especially male individuals. Lack of information on the exposure to pathogens throughout life of study participants may also have affected the proportions in the populations of the analysed cells. Moreover, some lifestyle factors e.g. diet, were not taken into account in our analysis, which should also be acknowledged as the limitation of the study.

Abbreviations

BMI: Body mass index; CHAMPS: Community Healthy Activities Model Program for Seniors; CMV: Cytomegalovirus; CRP: C-reactive protein; DBP: Diastolic blood pressure; FAO: Fatty-acid oxidation; FFM: Fat-free Mass; FM: Fat mass; GRA: Granulocytes; HB: Haemoglobin; HCT: Haematocrit; HDL: High density lipoprotein; HIV: Human immunodeficiency virus; HR: Heart rate; IRP: Immune risk profile; LDL: Low density lipoprotein; LYM: Lymphocytes; MCH: Mean corpuscular haemoglobin; MCHC: Mean corpuscular haemoglobin concentration; MCV: Mean corpuscular volume; NK: Natural killer; PLT: Platelets; RBC: Red blood cells count; SBP: Systolic blood pressure; TC: Total cholesterol; TCR: T cell receptor; TG: Triglycerides; U3A: University of the Third Age; VO2max: Maximal oxygen consumption; WBC: White blood cells count; 6MWT: 6-min walking test

Acknowledgements

We are grateful for cooperation with University of the Third Age in Zielona Gora, and thank PhD Jolanta Chmielowiec, a nurse, for blood collection.

Authors' contributions

AT, BM and AZL contributed to the research concept and design, data acquisition. AT analysed and interpreted the data and coordinated the preparation of the manuscript. AZL raised funds for research and revised the manuscript for its substantive content. AG performed the statistical analyses. All authors read and approved of the final manuscript.

Funding

This work was supported by the funds for young investigators from the University of Zielona Gora (N^o 222267/E-545/S/2019) and the National Science Centre Poland (N^o 2016/21/N/NZ7/03329). The opinions, results, and conclusions reported in this article are those of the authors and are independent from the funding sources.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

All participants were informed of the aim of the study and gave their written consent for participation in the project. The protocol of the study was approved by The Bioethics Commission at Regional Medical Chamber Zielona Gora, Poland (N^o01/66/2017, N^o21/103/2018) in accordance with the Helsinki Declaration.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Department of Applied and Clinical Physiology, Collegium Medicum University of Zielona Gora, 28 Zyty Str., 65-046 Zielona Gora, Poland. ²Faculty of Computer, Electrical and Control Engineering, Institute of Control and Computation Engineering University of Zielona Gora, Zielona Gora, Poland.

Received: 21 July 2020 Accepted: 2 March 2021

Published online: 22 March 2021

References

1. Thomas R, Wang W, Su DM. Contribution of age-related thymic involution to immunosenescence and inflammaging. *Immun Ageing*. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12979-020-0173-8>.
2. Lewkiewicz S, Chuang YL, Chou T. A mathematical model of the effects of aging on naive T cells populations and diversity. *Bull Math Biol*. 2019;81:2783–817.
3. Fagnoni FF, Vescovini R, Passeri G, Bologna G, Pedrazzoni M, Lavagetto G, et al. Shortage of circulating naive CD8(+) T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. *Blood*. 2000;95:2860–8.
4. Globerson A, Effros RB. Aging of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today*. 2000;21:515–21.
5. Tylutka A, Zembron-Lacny A. Immunological aging and clinical consequences. *Post Hig Med Dosw*. 2020;74:259–70.
6. Goronzy JJ, Lee WW, Weyand CM. Aging and T-cell diversity. *Exp Gerontol*. 2007;42:400–6.
7. Goronzy JJ, Fang F, Cavanagh MM, Qi Q, Weyand CM. Naive T cell maintenance and function in human aging. *J Immunol*. 2015;194:4073–80.
8. Arnold CR, Wolf J, Brunner S, Herndler-Brandstetter D, Grubeck-Loebenstein B. Gain and loss of T cells subset in old age – age related reshaping of the T cells repertoire. *J Clin Immunol*. 2011;31:137–46.
9. Muller L, Pawelec G. Aging and immunity - impact of behavioral intervention. *Brain Behav Immun*. 2014;39:8–22.
10. Simpson RJ, Lowder TW, Spielmann G, Bigley AB, LaVoy EC, Kunz H. Exercise and the aging immune system. *Ageing Res Rev*. 2012;11:404–20.
11. Simpson RJ, Campbell JP, Gleeson M, Krüger K, Nieman DC, Pyne DB, et al. Can exercise affect immune function to increase susceptibility to infection? *Exerc Immunol Rev*. 2020;26:8–22.
12. Wong GCL, Narang V, Lu Y, Camous X, Nyunt MSZ, Carre C, et al. Hallmarks of improved immunological responses in the vaccination of more physically active elderly females. *Exerc Immunol Rev*. 2019;25:20–33.
13. Minuzzi LG, Rama L, Chupel MU, Rosado F, Dos Santos JV, Simpson R, et al. Effects of lifelong training on senescence and mobilization of T lymphocytes in response to acute exercise. *Exerc Immunol Rev*. 2018;24:72–84.
14. Gleeson M, Bishop NC, Stensel DJ, Lindley MR, Mastana SS, Nimmo MA. The anti-inflammatory effects of exercise: mechanisms and implications for the prevention and treatment of disease. *Nature Rev Immunol*. 2011;11:607–15.
15. Zembron-Lacny A, Dziubek W, Rynkiewicz M, Morawin B, Woźniowski M. Peripheral brain-derived neurotrophic factor is related to cardiovascular risk factors in active and inactive elderly men. *Braz J Med Biol Res*. 2016. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165253>.
16. Bartlett DB, Fox O, McNulty CL, Greenwood HL, Murphy L, Sapey E, et al. Habitual physical activity is associated with the maintenance of neutrophil migratory dynamics in healthy older adults. *Brain Behav Immun*. 2016;56:12–20.
17. Woods JA, Davis JM, Smith JA, Nieman DC. Exercise and cellular innate immune function. *Med Sci Sports Exerc*. 1999;31:57–66.
18. Kohut ML, Lee W, Martin A, Arnston B, Russell DW, Ekkekakis P, et al. The exercise-induced enhancement of influenza immunity is mediated in part by improvements in psychosocial factors in older adults. *Brain Behav Immun*. 2005;19:357–66.
19. Duggal NA, Pollock RD, Lazarus NR, Harridge S, Lord JM. Major features of immunosenescence, including reduced thymic output, are ameliorated by high levels of physical activity in adulthood. *Aging Cell*. 2018. <https://doi.org/10.1111/acel.12750>.
20. Durstine JL, Moore GE. ACSM's exercise management for persons with chronic diseases and disabilities. 2nd ed. Champaign, IL: Human Kinetics; 2003.
21. Geard D, Rebar AL, Dionigi RA, Reaburn PRJ. Testing a model of successful aging on masters athletes and non-sporting adults. *Res Q Exerc Sport*. 2020; 6:1–10.
22. Zembron-Lacny A, Dziubek W, Wolny-Rokicka E, Dabrowska G, Woźniowski M. The relation of inflammaging with skeletal muscle properties in elderly men. *Am J Mens Health*. 2019. <https://doi.org/10.1177/1557988319841934>.
23. Holland AE, Spruit MA, Troosters T, Puhan MA, Pepin V, Saey D, et al. An official European Respiratory Society/American Thoracic Society technical

- standard: field walking tests in chronic respiratory disease. *Eur Respir J*. 2014; 44:1428–46.
24. Middleton A, Fritz SL, Lusardi M. Walking speed: the functional vital sign. *J Aging Phys Act*. 2015;23:314–22.
 25. Åstrand PO. Human physical fitness with special reference to sex and age. *Physiol Rev*. 1956;36:307–35.
 26. Stewart AL, Mills KM, Sepsis PG, King AC, McLellan BY, Roitz K, Ritter PL. Evaluation of CHAMPS, a physical activity promotion program for older adults. *Ann Behav Med*. 1997;19:353–61.
 27. Hang J, Huang J, Zhou S, Wu L, Zhu Y, Zhu L, et al. The clinical implication of CD45RA⁺ naïve T cells and CD45RO⁺ memory T cells in advanced pancreatic cancer: a proxy for tumor biology and outcome prediction. *Cancer Med*. 2019;8:1326–35.
 28. McBride JA, Striker R. Imbalance in the game of T cells: what can the CD4/CD8 T-cell ratio tell us about HIV and health? *PLoS Pathog*. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006624>.
 29. Strindhall J, Skog M, Ernerudh J, Bengner M, Löfgren S, Matussek A, et al. The inverted CD4/CD8 ratio and associated parameters in 66-year-old individuals: the Swedish HEXA immune study. *Age (Dordr)*. 2012;35:985–91.
 30. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing. Vienna Austria; 2020. <https://www.R-project.org/>
 31. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2nd ed. Hillsdale, NJ: Erlbaum; 1988.
 32. Miles J, Shevlin M. *Applying regression and correlation: a guide for students and researchers*. London: Sage; 2001.
 33. Irwin MR, Olmstead R. Mitigating cellular inflammation in older adults: a randomized controlled trial of tai chi Chih. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2012;20:764–72.
 34. Walsh NP, Gleeson M, Pyne DB, Nieman DC, Dhabhar FS, Shephard RJ, et al. Position statement. Part two: maintaining immune health. *Exerc Immunol Rev*. 2011;17:64–103.
 35. Campbell JP, Turner JE. Debunking the myth of exercise-induced immune suppression: redefining the impact of exercise on immunological health across the lifespan. *Front Immunol*. 2018;9:648.
 36. Dinh HC, Bautmans I, Beyer I, Onyema OO, Liberman K, De Dobbeleer L, et al. Six weeks of strength endurance training decreases circulating senescence-prone T-lymphocytes in cytomegalovirus seropositive but not seronegative older women. *Immun Ageing*. 2019;16:17.
 37. Nieman DC, Henson DA, Gusewitsch G, Warren BJ, Dotson RC, Butterworth DE, et al. Physical activity and immune function in elderly women. *Med Sci Sports Exer*. 1993;25:823–31.
 38. Abd El-Kader SM, Al-Shreef FM. Inflammatory cytokines and immune system modulation by aerobic versus resisted exercise training for elderly. *Afr Health Sci*. 2018;18:120–31.
 39. Apostolopoulos V, Borkoles E, Polman R, Stojanovska L. Physical and immunological aspects of exercise in chronic diseases. *Immunotherapy*. 2014;6:1145–57.
 40. Halaweh H, Dahlin-Ivanoff S, Svantesson U, Willén C. Perspectives of older adults on aging well: a focus group study. *J Aging Res*. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9858252>.
 41. Weyh C, Krüger K, Strasser B. Physical activity and diet shape the immune system during aging. *Nutrients*. 2020;12:622.
 42. Spielmann G, McFarlin BK, O'Connor DP, Smith PJW, Pircher H, Simpson RJ. Aerobic fitness is associated with lower proportions of senescent blood T-cells in man. *Brain Behav Immun*. 2011;25:1521–9.
 43. Pawelec G, McElhaney JE, Aiello AE, Derhovanessian E. The impact of CMV infection on survival in older humans. *Curr Opin Immunol*. 2012;24:507–11.
 44. Merani S, Pawelec G, Kuchel GA, McElhaney JE. Impact of aging and Cytomegalovirus on immunological response to influenza vaccination and infection. *Front Immunol*. 2017;8:784.
 45. Adriaenssens W, Derhovanessian E, Vaes B, Van Pottelbergh G, Degryse JM, Pawelec G, et al. CD4:8 ratio > 5 is associated with a dominant naïve T-cell phenotype and impaired physical functioning in CMV – seropositive very elderly people: results from the BELFRAIL study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2015;70:143–54.
 46. Vasson MP, Farges MC, Goncalves-Mendes N, Talvas J, Ribalta J, Winkhofer-Roob B, et al. Does aging affect the immune status? A comparative analysis in 300 healthy volunteers from France, Austria and Spain. *Immun Ageing*. 2013;10:38.
 47. Antony AK, Lian Z, Wu H. T cells in adipose tissue in aging. *Front Immunol*. 2018;9:2945.
 48. Ramírez Torres M, Ruiz Valenzuela RE, Esparza-Romero J, López Teros MT, Alemán-Mateo H. The fat mass index, not the fat-free mass index, is associated with impaired physical performance in older adult subjects: evidence from a cross-sectional study. *Clin Nutr*. 2019;38:877–82.
 49. Kim S, Leng XI, Kritchevsky SB. Body composition and physical function in older adults with various comorbidities. *Innov Aging*. 2017. <https://doi.org/10.1093/geroni/igx008>.
 50. Alwarawrah Y, Kiernan K, Maciver NJ. Changes in nutritional status impact immune cell metabolism and function. *Front Immunol*. 2018;9:1055.
 51. van der Weerd K, Dik WA, Schrijver B, Schweitzer DH, Langerak AW, Drexhage HA, et al. Morbidly obese human subjects have increased peripheral blood CD4⁺ T cells with skewing toward a treg- and Th2-dominated phenotype. *Diabetes*. 2012;61:401–8.
 52. Womack J, Tien PC, Feldman J, Shin JH, Fennie K, Anastos K, et al. Obesity and immune cell counts in women. *Metabolism*. 2007;56:998–1004.
 53. Tanaka S, Isoda F, Ishihara Y, Kimura M, Yamakawa T. T lymphopenia in relation to body mass index and TNF-alpha in human obesity: adequate weight reduction can be corrective. *Clin Endocrinol*. 2001;54:347–54.
 54. O'Rourke RW, Kay T, Scholz MH, Diggs B, Jobe BA, Lewinsohn DM, Bakke AC. Alterations in T-cell subset frequency in peripheral blood in obesity. *Obes Surg*. 2005;15:1463–8.
 55. Francisco V, Pino J, Campos-Cabaleiro V, Ruiz-Fernández C, Mera A, Gonzalez-Gay, et al. Obesity, fat mass and immune system: role for leptin. *Front Physiol*. 2018;9:640.
 56. Bouassida A, Zalleg D, Bouassida S, Zaouali M, Feki Y, Zbidi A, Tabka Z. Leptin, its implication in physical exercise and training: a short review. *J Sports Sci Med*. 2006;5:172–81.
 57. Aguilar EG, Murphy WJ. Obesity induced T cell dysfunction and implications for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2018;51:181–6.
 58. Pearce EL, Walsh MC, Cejas PJ, Harms GM, Shen H, Wang LS, et al. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature*. 2009;460:103–7.
 59. Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Rood J, Kumar KG, Butler AA, Dixit VD. Obesity accelerates thymic aging. *Blood*. 2009;114:3803–12.
 60. Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Ravussin A, Gimble JM, Greenway F, et al. Obesity increases the production of proinflammatory mediators from adipose tissue T cells and compromises TCR repertoire diversity: implications for systemic inflammation and insulin resistance. *J Immunol*. 2010;185:1836–45.
 61. Senchina DS, Kohut ML. Immunological outcomes of exercise in older adults. *Clin Interv Aging*. 2007;2:3–16.
 62. Sellami M, Gasmi M, Denham J, Hayes JD, Stratton D, Padulo J, Bragazzi N. Effects of acute and chronic exercise on immunological parameters in the elderly aged: can physical activity counteract the effects of aging? *Front Immunol*. 2018;9:2187.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



VII. Opinia Komisji Bioetycznej

KOMISJA BIOETYCZNA
przy Okręgowej Radzie Lekarskiej
Oli w Zielonej Górze
65-735 Zielona Góra, ul. Batorego 71
tel. (068) 320 79 00, fax (068) 320 78 15

Komisja Bioetyczna
przy Okręgowej Radzie Lekarskiej w Zielonej Górze
65-735 Zielona Góra, ul. Batorego 71
tel. (068) 320 79 00, fax (068) 320 78 15

Uchwała Komisji Bioetycznej Nr 21/103/2018

z dnia 18 czerwca 2018 r.

w sprawie wydania opinii o badaniu naukowym pt.: „Immunologiczne zmiany u kobiet i mężczyzn po 60 r.ż. w zależności od współistniejących jednostek chorobowych; wpływ aktywności fizycznej na poprawienie parametrów immunologicznych”.

Opinia wydana jest na podstawie art. 29 ust. 2 ustawy z dnia 16 grudnia 2016 r. o zawodach lekarza i lekarza dentyisty (Dz.U. z 2017 poz. 125), rozporządzenia MZiOS z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47, poz. 480 z 1999 r.) oraz uchwały nr 59/VII/2014 Okręgowej Rady Lekarskiej w Zielonej Górze z dnia 15 maja 2014 r. w sprawie powołania Komisji Bioetycznej.

Komisja Bioetyczna przy Okręgowej Radzie Lekarskiej w Zielonej Górze na posiedzeniu w dniu 18 czerwca 2018 r. zapoznała się ze zgłoszeniem badania naukowego zatytułowanego „Immunologiczne zmiany u kobiet i mężczyzn po 60 r.ż. w zależności od współistniejących jednostek chorobowych; wpływ aktywności fizycznej na poprawienie parametrów immunologicznych”.

Głównym wykonawcą badania jest lekarz mgr Anna Tytulka. Badanie będzie prowadzone w Uniwersytecie Zielonogórskim w Zielonej Górze, ul. Licealna 9. Kierownikiem naukowym badania jest dr hab. n. med. Agata Matejuk, prof. Uniwersytetu Zielonogórskiego.

Do wniosku dołączono następujące dokumenty:

1. Protokół badania.
2. Informację dla uczestnika badania.
3. Formularz świadomej zgody uczestnika badania.
4. Oświadczenie uczestnika badania.
5. Zyciorys naukowy badacza.
6. Piśmiennictwo.

W wyniku tajnego głosowania Komisja Bioetyczna wyraża zgodę na przeprowadzenie badania zatytułowanego: „Immunologiczne zmiany u kobiet i mężczyzn po 60 r.ż. w zależności od współistniejących jednostek chorobowych; wpływ aktywności fizycznej na poprawienie parametrów immunologicznych”.

Komisja zastrzega sobie prawo do uzyskiwania informacji o powikłaniach i efektach niepożądanych oraz do uzyskania raportu końcowego. Komisja Bioetyczna przy Okręgowej Radzie Lekarskiej w Zielonej Górze działa zgodnie z zasadami Good Clinical Practice (ICH-GCP) oraz przestrzega Deklaracji Helsińskiej i Tekijskiej. Do opinii załączono wykaz osób biorących udział w głosowaniu.

PRZEWODNICZĄCY KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy Okręgowej Radzie Lekarskiej
Oli w Zielonej Górze

lek. Dariusz Kamiński

Komisja Bioetyczna
przy Okręgowej Radzie Lekarskiej w Zielonej Górze
65-735 Zielona Góra, ul. Batorego 71
tel. (068) 320 79 00, fax (068) 3207815

Uchwała Komisji Bioetycznej Nr 01/66/2017

z dnia 23 stycznia 2017 r.

w sprawie wydania zgody na badanie pt.: „**Apoptotyczne mechanizmy starzenia się mięśni szkieletowych; zapobieganie poprzez wysilek fizyczny**”

Opinia wydana jest na podstawie art. 29 ust. 2 ustawy z dnia 16 grudnia 2016 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (Dz.U. z 2017 poz. 125), rozporządzenia MZiOS z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47, poz. 480 z 1999 r.) oraz uchwały nr 59/VII/2014 Okręgowej Rady Lekarskiej w Zielonej Górze z dnia 15 maja 2014 r. w sprawie powołania Komisji Bioetycznej.

Komisja Bioetyczna przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Zielonej Górze na posiedzeniu w dniu 23 stycznia 2017 r. zapoznała się ze zgłoszeniem badania zatytułowanego „**Apoptotyczne mechanizmy starzenia się mięśni szkieletowych; zapobieganie poprzez wysilek fizyczny**”.

Głównym wykonawcą badania jest mgr Barbara Morawin. Badanie będzie prowadzone w Uniwersytecie Zielonogórskim przy ul. Licealnej 9, 65-714 Zielona Góra. Kierownikiem badania jest mgr Barbara Morawin.

Do wniosku dołączono następujące dokumenty:

1. Zgłoszenie badania.
2. Protokół badania.
3. Informację dla uczestnika badania o celach i zasadach przeprowadzenia eksperymentu medycznego.
4. Formularz świadomej zgody uczestnika badania.
5. Wzór oświadczenia składnego przez osobę poddaną eksperymentowi medycznemu.
6. Piśmiennictwo.
7. Życiorys naukowy badacza.

W wyniku tajnego głosowania Komisja Bioetyczna wyraża zgodę na przeprowadzenie badania zatytułowanego: „Apoptotyczne mechanizmy starzenia się mięśni szkieletowych; zapobieganie poprzez wysilek fizyczny”.

Komisja zastrzega sobie prawo do uzyskiwania informacji o powikłaniach i efektach niepożądanych oraz do uzyskania raportu końcowego. Komisja Bioetyczna przy Okręgowej Radzie Lekarskiej w Zielonej Górze działa zgodnie z zasadami Good Clinical Practice (ICH-GCP) oraz przestrzega Deklaracji Helsińskiej i Tokijskiej. Do opinii załączono wykaz osób biorących udział w głosowaniu.

PRZEWODNICZĄCY KOMISJI BIOETYCZNEJ
przy Okręgowej Radzie Lekarskiej
OIL w Zielonej Górze
lek. hab. dr. med. J. Kosiński

VIII. Oświadczenia współautorów prac

Warszawa, dnia 20.12.2021
(miejsowość, data)

Agnieszka Zembroń-Łacny

.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Immunological aging and clinical consequences. Postepy Hig Med Dosw 2020; 74: 260-271. doi: 10.5604/01.3001.0014.3054**, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: koncepcja pracy, opracowywanie i weryfikacja tekstu publikacji.

.....
Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 30%.

.....
Wkład Anny Tylutkiej w powstawanie publikacji określam jako 70%, obejmował on: przygotowanie koncepcji, przegląd piśmiennictwa, edycja tekstu, przygotowanie tabel i rycin, korekta manuskryptu, rejestracja manuskryptu w wydawnictwie (autor korespondencyjny).

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

łk/mgr Anny Tylutkiej

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



.....
(podpis oświadczającego)

Warszawa, dnia 20.12.2021
(miejsowość, data)

Agnieszka Zembroń-Lacny

.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Tylutka A, Morawin B, Gramacki A, Zembron-Lacny A. Lifestyle exercise attenuates immunosenescence; flow cytometry analysis. BMC Geriatr 2021; 21: 200. doi: 10.1186/s12877-021-02128-7**, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przygotowaniu koncepcji pracy badawczej, wsparcie podczas uzyskiwania i analizy wyników, opracowanie i weryfikacji tekstu publikacji

.....
Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10%.

.....
Wkład Anny Tylutkiej w powstawanie publikacji określam jako 70%, obejmował on: przygotowanie koncepcji, przegląd piśmiennictwa, edycja tekstu, przygotowanie tabel i rycin, korekta manuskryptu, rejestracja manuskryptu w wydawnictwie (autor korekpondencyjny).

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej
lek/mgr Anny Tylutkiej

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



.....
(podpis oświadczającego)

Warszawa, dnia 20.12.2021
(miejsowość, data)

Artur Gramacki

.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Tylutka A, Morawin B, Gramacki A, Zembron-Lacny A. Lifestyleexerciseattenuates immunosenescence; flowcytometryanalysis. BMC Geriatr 2021; 21: 200. doi: 10.1186/s12877-021-02128-7**, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: analizy statystyczne, weryfikacja końcowej wersji manuskryptu

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10%.

.....
Wkład Anny Tylutkiej w powstawanie publikacji określam jako 70%, obejmował on: przygotowanie koncepcji, przegląd piśmiennictwa, edycja tekstu, przygotowanie tabel i rycin, korekta manuskryptu, rejestracja manuskryptu w wydawnictwie (autor korespondencyjny)

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

~~lek~~/mgr Anny Tylutkiej

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Warszawa, dnia 20.12.2021
(miejsowość, data)

Barbara Morawin

.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. **Tylutka A, Morawin B, Gramacki A, Zembron-Lacny A. Lifestyle exercise attenuates immunosenescence; flow cytometry analysis. BMC Geriatr 2021; 21: 200. doi: 10.1186/s12877-021-02128-7**, oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: zbieranie materiału i wykonywanie analiz laboratoryjnych, udział w przygotowaniu i redagowaniu pracy.
Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10%.

.....
Wkład Anny Tylutkiej w powstawanie publikacji określam jako 70%, obejmował on: przygotowanie koncepcji, przegląd piśmiennictwa, edycja tekstu, przygotowanie tabel i rycin, korekta manuskryptu, rejestracja manuskryptu w wydawnictwie (autor korespondencyjny)
(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji) *

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej

lek/mgr Anny Tylutkiej

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Barbara Morawin

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników