

Utjecaj treninga različitog intenziteta na pojavnost upalnih i protuupalnih monocita kod sportaša amatera

Bašić, Vlatka

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, School of Medicine / Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:171:345886>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[MEFST Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
I
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

Vlatka Bašić

**UTJECAJ TRENINGA RAZLIČITOG INTENZITETA NA POJAVNOST UPALNIH I
PROTUUPALNIH MONOCITA KOD SPORTAŠA AMATERA**

Diplomski rad

Akadska godina: 2021./2022.

Mentor:

doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić

Split, listopad 2022.

**SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
I
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET**

Vlatka Bašić

**UTJECAJ TRENINGA RAZLIČITOG INTENZITETA NA POJAVNOST UPALNIH I
PROTUUPALNIH MONOCITA KOD SPORTAŠA AMATERA**

Diplomski rad

Akadska godina: 2021./2022.

Mentor:

doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić

Split, listopad 2022.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA DIPLOMSKI RAD

Kemijsko-tehnološki fakultet i Medicinski fakultet
Integrirani preddiplomski i diplomski studij FARMACIJA
Sveučilište u Splitu, Republika Hrvatska

Znanstveno područje: Biomedicinske znanosti
Znanstveno područje: Farmacija
Nastavni predmet: Medicinska biokemija
Tema rada: prihvaćena je na 74. sjednici Vijeća studija Farmacija te potvrđena na 21. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko-tehnološkog fakulteta i na 14. sjednici Fakultetskog vijeća Medicinskog fakulteta
Mentor: doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić
Pomoć pri izradi: doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić

UTJECAJ TRENINGA RAZLIČITOG INTENZITETA NA POJAVNOST UPALNIH I PROTUUPALNIH MONOCITA KOD SPORTAŠA AMATERA

Vlatka Bašić, broj indeksa 180

Naslov rada: Utjecaj treninga različitog intenziteta na pojavnost upalnih i protuupalnih monocita kod sportaša amatera
Cilj istraživanja: Cilj ovog istraživanja je utvrditi kako trening različitog intenziteta (ispod ili iznad bazalnog metabolizma) utječe na monocitne subpopulacije na uzorku sportaša rekreativaca.
Materijali i metode: Uzorci krvi svih sudionika uzeti su za analizu 30 minuta prije i nakon treninga. Uzorak je tretiran reagensom za blokiranje Fc receptora te je inkubirana 20 minuta u mraku na 25°C s 4 µL anti-humanih CD14s PerCP-Cy5.5 konjugiranih antitijela i 5 µL fikoeritriinom konjugiranih antitijela reaktivnih na ljudski CD16. Nakon lize crvenih krvnih stanica otopinom za lizu, stanice su analizirane na protočnom citometru. Mjereni su također i uzorci neobojanih stanica i obrađeni su kao negativne kontrole. Podaci prikupljeni citometrom analizirani su pomoću softvera FlowLogic.
Rezultati: Kao rezultat istraživanja dobili smo podatak da tjelesna aktivnost ima utjecaj na aktivaciju protuupalne te upalne monocitne skupine. Povećanjem intenziteta tjelesne aktivnosti opažen je porast broja monocitnih skupina. Također rezultati govore da vrijeme uzorkovanja krvi i broj ispitanika utječu na rezultate.
Zaključci: Trening različitog intenziteta kod sportaša rekreativaca (ispod ili iznad bazalnog metabolizma) utječe na porast broja upalnih i protuupalnih monocita, ali je za bolje razumijevanje utjecaja intenziteta potrebno uzeti u obzir vrijeme uzorkovanja krvi i veći uzorak.

Ključne riječi: monociti, CD14, CD16, mišićno oštećenje

Rad sadrži: 48 stranica, 5 tablica, 11 slika i 50 referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav povjerenstva: 1. doc. dr. sc. Ana Šešelja Perišin, predsjednik
2. prof. dr. sc. Ivana Novak Nakir, član
3. doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić, član-mentor

Datum obrane: 28.10.2022.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Medicinskog fakulteta u Splitu, Šoltanska 2

BASIC DOCUMENTATION CARD GRADUATE THESIS

**Faculty of Chemistry and Technology and School of Medicine
Integrated Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy
University of Split, Croatia**

Scientific area: Biomedical sciences
Scientific field: Pharmacy
Course title: Medicinal biochemistry
Thesis subject: was approved by Council Undergraduate and Graduate Study of Pharmacy, no. 74. as well as by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 21. and Faculty Council of School of Medicine, session no. 14.
Mentor: doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić
Technical assistance: doc.dr.sc. Nikolina Režić Mužinić

The influence of training of different intensities on the incidence of inflammatory and anti-inflammatory marker in amateur athletes

Vlatka Bašić, indeks number: 180

Diploma thesis title: The influence of training of different intensities on the incidence of inflammatory and anti-inflammatory marker in amateur athletes

The aim of this study: The aim of this research is to determine how training at different intensities (below or above basal metabolism) affects monocyte subpopulations in a sample of recreational athletes.

Methods: Blood samples of all participants were taken for analysis 30 minutes before and after training. The sample was treated with Fc receptor blocking reagent and incubated for 20 minutes in the dark at 25°C with 4 µL of anti-human CD14s PerCP-Cy5.5 conjugated antibodies and 5 µL of phycoerythrin-conjugated antibodies reactive to human CD16. After the lysis of red blood cells with lysis solution, the cells were analyzed on a flow cytometer. Samples of unstained cells were also measured and processed as negative controls. Data collected by cytometer were analyzed using FlowLogic software.

Results: As a result of the research, we obtained an information that physical activity has an impact on the activation of anti-inflammatory and inflammatory monocyte groups. By increasing the intensity of physical activity, an increase in the number of monocyte groups was observed. The results also tell that the time of blood sampling and the number of subjects have an influence on results.

Conclusion: Training of different intensity in recreational athletes (below or above basal metabolism) affects the increase in the number of inflammatory and anti-inflammatory monocytes, but for a better understanding of intensity influence, it is necessary to take into account the time of blood sampling and a larger sample.

Keywords: monocytes, CD14, CD16, muscle damage

Thesis contain: 48 pages, 5 tables, 11 figures and 50 references

Original in: Croatian

Defence committee: 1.doc. dr. sc. Ana Šešljja Perišin, chair person
2. prof. dr.sc. Ivana Novak Nakir, member
3. doc. dr. sc. Nikolina Režić Mužinić, member-supervisor

Defence date: 28.10.2022.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of School of Medicine Split, Šoltanska 2.

Zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Nikolini Režić-Mužinić na vodstvu i savjetima koji su dali svoj doprinos kvaliteti ovog rada, uloženom vremenu te prijateljskom pristupu.

Hvala također svim dragim ljudima koji su mi bili podrška tijekom ovih sedam godina studiranja.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Kronične bolesti u Hrvatskoj | 2 |
| 1.2. Mišićna oštećenja | 3 |
| 1.2.1. Direktni markeri mišićnog oštećenja | 4 |
| 1.2.2. Indirektni markeri mišićnog oštećenja..... | 6 |
| 1.3. Klasifikacija monocita | 8 |
| 1.4. Subpopulacije monocita..... | 8 |
| 1.5. Ekspresija i funkcija CD14 | 10 |
| 1.6. Ekspresija i funkcija CD16 | 11 |
| 1.7. Utjecaj tjelesne aktivnosti na subpopulacije monocita | 12 |
| 2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA | 13 |
| 2.1. Cilj istraživanja | 14 |
| 2.2. Hipoteza | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE..... | 15 |
| 3.1. Uzorak ispitanika..... | 16 |
| 3.2. Procedura mjerenja i varijable..... | 16 |
| 3.3. Obrada uzorka krvi | 18 |
| 3.4. Protočna citometrija..... | 19 |
| 3.5. Biokemijska analiza..... | 20 |
| 4. REZULTATI | 22 |
| 4.1. Antropometrijski parametri ispitanika..... | 23 |
| 4.2. Razlike u monocitnim podskupinama kod ispitanika pod različitim opterećenjem..... | 23 |
| 5. RASPRAVA | 25 |
| 6. ZAKLJUČAK..... | 28 |
| 7. LITERATURA | 30 |
| 8. SAŽETAK | 36 |
| 9. SUMMARY | 38 |
| 10. ŽIVOTOPIS..... | 40 |

POPIS KRATICA:

- ADAM17: od engl. *A disintegrin and metalloprotease 17*
- ADP: adenzin difosfat (engl. *adenosine diphosphate*)
- ATP: adenzin trifosfat (engl. *adenosine triphosphate*)
- CD14: stanični koreceptor za liposaharide, eksprimiran na makrofagima
- CD16: IgG receptor niskog afiniteta
- CD16b: od engl. *cluster of differentiation 16b*,
- CK-MM: kreatin kinaza skeletnog mišića (engl. *muscle-type creatine kinase*)
- CK-MB: kreatin kinaza srčanog mišića (engl. *heart-type creatine kinase*)
- CK-BB: moždana kreatin kinaza (engl. *brain-type creatine kinase*)
- CK: kreatin kinaza (engl. *creatine kinase*)
- FGF: od engl. *fibroblast growth factor*
- FSC-detektora: od eng. *forward scatter detector*
- GET: individualni aerobni prag
- GPI: glikozil-fosfatidilinozitol (engl. *glycosylphosphatidylinositol*)
- IL-1: interleukin 1 (engl. *interleukin*)
- LBP: LPS vezni protein (engl. *lipopolysaccharide binding protein*)
- LDH: laktat dehidrogenaza (engl. *lactate dehydrogenase*)
- LPS: lipopolisaharid (engl. *lipopolysaccharide*)
- Mb: mioglobin (engl. *myoglobin*)
- NF-κB: nuklearni faktor koji kontrolira transkripciju DNA (engl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)
- NK: stanice prirodne ubojice (engl. *natural killer*)
- PCr: kreatinin fosfat (engl. *phosphocreatine*)
- PDGF: od engl. *platelet-derived growth factor*
- PMN: polimorfonuklearni leukociti (engl. *Polymorphonuclear Leukocytes*)
- ROS: reaktivne vrste kisika (engl. *reactive oxygen species*)
- SSC-detektor: od engl. *side scatter detectot*
- TNF: od engl. *tumor necrosis factor*
- TGF- β: transformirajući faktor rasta-β (engl. *transforming growth factor beta*)
- VO₂ max: maksimalni primitak kisika
- VO₂: volumen kisika
- VCO₂: volumen ugljikovog dioksida

1. UVOD

1.1. Kronične bolesti u Hrvatskoj

U današnje vrijeme kronične bolesti jedan su od glavnih javnozdravstvenih problema u razvijenim zemljama. Povezane su sa životnim stilom modernog doba koji uključuje sjedilački način života i reduciranu tjelesnu aktivnost. Od kroničnih nezaraznih bolesti godišnje u svijetu umre 38 milijuna ljudi što čini 68 % ukupne smrtnosti, dok je taj postotak u Europi 86 %, a u Republici Hrvatskoj čak 93 % (Tablica 1) (1).

Tablica 1. Smrtnost u Hrvatskoj uzrokovana kroničnim nezaraznim bolestima (1)

| TABLICA 1. Rang ljestvica 10 vodećih uzroka smrti u Hrvatskoj 2008. godine | | | | |
|---|--------------------|--|---------------|----------|
| Rang | MKB-X šifra | Dijagnoza | Ukupno | % |
| 1. | I20-I25 | Ishemijska bolest srca | 10.101 | 19,37 |
| 2. | I60-I69 | Cerebrovaskularne bolesti | 8.076 | 15,49 |
| 3. | I50 | Insuficijencija srca | 3.059 | 5,87 |
| 4. | C33-C34 | Zloćudna novotvorina dušnika i pluća | 2.750 | 5,27 |
| 5. | C18-C21 | Zloćudne novotvorine debelog crijeva | 1.855 | 3,56 |
| 6. | K70, K73, K74, K76 | Kronične bolesti jetre, fibroza i ciroza | 1.311 | 2,51 |
| 7. | J40-J46 | Bronhitis, emfizem, astma | 1.303 | 2,50 |
| 8. | E10-E14 | Dijabetes melitus | 1.296 | 2,49 |
| 9. | I70 | Ateroskleroza | 1.058 | 2,03 |
| 10. | I10-I13 | Hipertenzivne bolesti | 1.033 | 1,98 |
| Ukupno 10 uzroka smrti | | | 31.842 | 61,06 |
| Ukupno umrli | | | 52.151 | 100,00 |

Redovna tjelesna aktivnost je odavno prepoznata kao primarna prevencija od oboljenja kod 35 kroničnih nezaraznih bolesti koje obuhvaćaju dijabetes tipa 2, bolest masne jetre,

pretilost, hipertenziju, depresiju, anksioznost, kognitivnu disfunkciju i mnoge druge ali mehanizmi koji dovode do smanjenja rizika od obolijevanja nisu u potpunosti poznati (2).

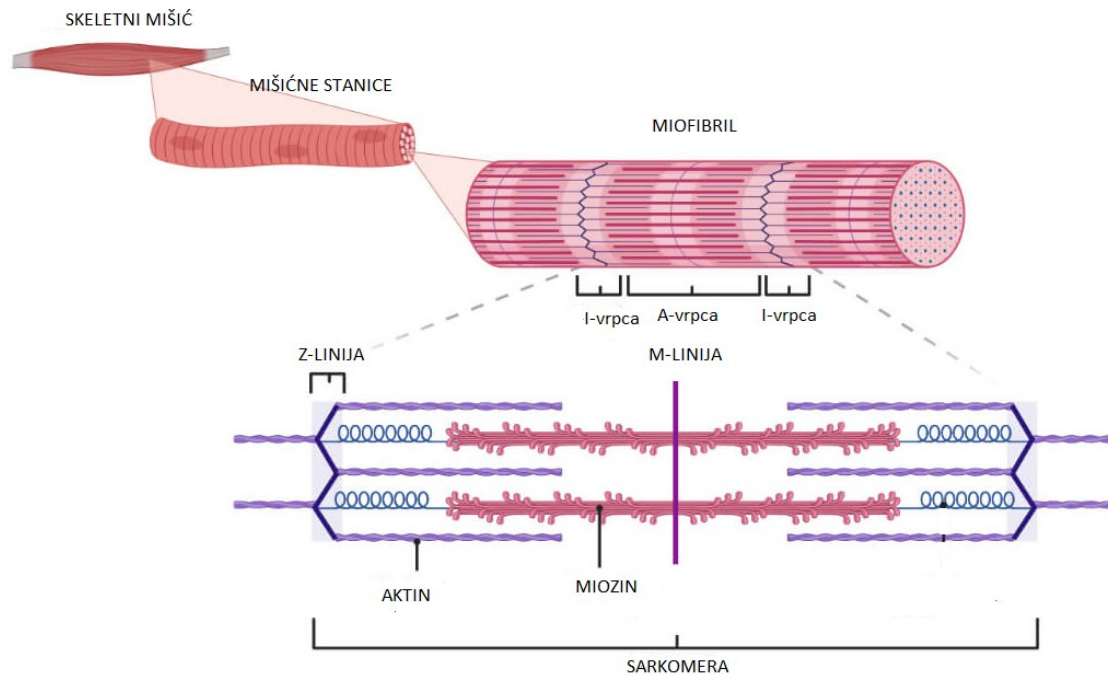
Prema uputama Svjetske zdravstvene organizacije odraslim osobama se savjetuje 150 minuta tjelesne aktivnosti tjedno. Ukoliko su treninzi srednjeg intenziteta potrebno je 5 puta tjedno trenirati 30-60 minuta, a za trening visokog intenziteta 20-60 minuta 3 puta u tjednu (3).

Iako redovito vježbanje donosi brojne dobrobiti za naše zdravlje, redovito i dugotrajno vježbanje te intenzivna tjelesna aktivnost mogu dovest do kroničnog umora, mišićnog oštećenja i pojave upalnog odgovora imunološkog sustava (4).

1.2. Mišićna oštećenja

Ozbiljnost mišićnog oštećenja ovisi o vrsti, intenzitetu i ukupnom trajanju treninga. Intenzivna tjelesna aktivnost može dovesti do oštećenja mišićnih vlakana poprečno-prugastih mišića, najčešće tijekom izvođenja novih vrsta vježbi, a posebno ekscentričnim kontrakcijama u velikom rasponu pokreta (5).

Pokazatelji toga su nam unutarstanični metaboliti u međustaničnom prostoru. Ponovljena elongacija mišićnih vlakana karakterizira ekscentrične aktivnosti te posljedično dovodi do mehaničkih oštećenja na spoju dviju sarkomera, koje nazivamo Z-linija, te nam je to glavni uzročnik otjecanja unutarstaničnih metabolita (Slika 1). To se događa zbog veće sile na manje aktivna vlakna koja su pri opiranju produljenju sklona kidanju (6).



Slika 1. Građa mišićne sarkomere (7)

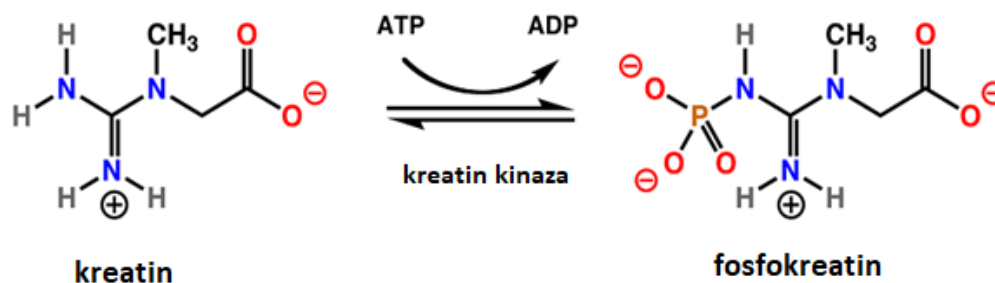
Tijekom metaboličkog poremećaja uslijed fizičke aktivnosti može doći i do smanjenja ATP-a koji nam je dostupan te poremećaja rada Na^+/K^+ i Ca^{2+} pumpe. Ukoliko se to dogodi, izvanstanični Ca^{2+} naglo ulazi u unutarstanični prostor, izaziva niz kaskadnih proteolitičkih reakcija na staničnoj razini i dovodi do povećanja membranske permeabilnosti te u konačnici otpuštanja viška Ca^{2+} iona i ostalih staničnih metabolita u izvanstanične prostore (8). Sam mehanizam metaboličkih i mehaničkih oštećenja za sad je još nejasan te postoji mnogo neslaganja između istraživača s obzirom da je teško izdvojiti mišićno oštećenje uvjetovano treningom od učinka ostalih čimbenika. Također naglašavamo da preveliki stupanj mišićnog oštećenja narušava sposobnost stvaranja sile u mišiću i negativno utječe na oporavak mišića (9).

1.2.1. Direktni markeri mišićnog oštećenja

Direktnim markerima mišićnog oštećenja smatraju se biokemijski markeri poput raznih enzima i proteina čiji je porast u krvnom serumu povezan sa povećanom tjelesnom aktivnosti. Spomenute makromolekule se u pravilu nalaze u staničnoj citoplazmi te nam njihova pojava u međustaničnom prostoru ukazuje na to da je došlo do poremećaja na stanično/tkivnoj razini (10).

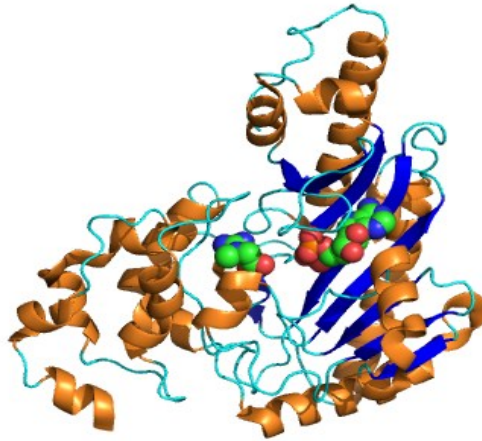
Pri utvrđivanju postojanja mišićnog oštećenja najčešći „cureći“ produkti koji se koriste jesu kreatin kinaza (CK), ona se ujedno smatra zlatnim standardom, te laktat dehidrogenaza (LDH) (11).

Kreatin kinaza je enzim koji ima glavnu ulogu u održavanju energetske ravnoteže stanice, katalizira reverzibilnu reakciju kreatina (Cr) i adenozin trifosfata (ATP) tijekom koje dobivamo energijom bogat kreatin-fosfat (PCr) i adenozin difosfat (ADP) (Slika 2). To je dimerni enzim ukupne mase 86 kDa, a pronalazimo ga u mitohondrijima i citoplazmi stanica koje imaju veliku potrebu za energijom. Kako je riječ o enzimu koji je u najvećoj mjeri zastupljen u poprečno prugastim mišićima, povećana aktivnost CK najčešće je izravan pokazatelj postojanja oštećenja odnosno bolesti skeletnog mišića (12).



Slika 2. Kreatin kinaza katalizira reverzibilnu fosforilaciju kreatina u fosfokreatin pomoću ATP-a (13)

Citoplazmatska CK sastoji se od dva tipa podjedinica: M (*engl. muscle type*) i B (*engl. brain type*). Pomoću njih moguće je povezivanje u tri različita izoenzima: CK-MM (kreatin kinaza skeletnog mišića), CK-MB (kreatin kinaza srčanog mišića), te CK-BB (moždana kreatin kinaza). Kod zdravih osoba ukupna kreatin kinaza mjerena iz krvnog seruma kombinacija je CK-MM (95 %) i CK- MB (5 %) (14).



Slika 3. Struktura CK (15)

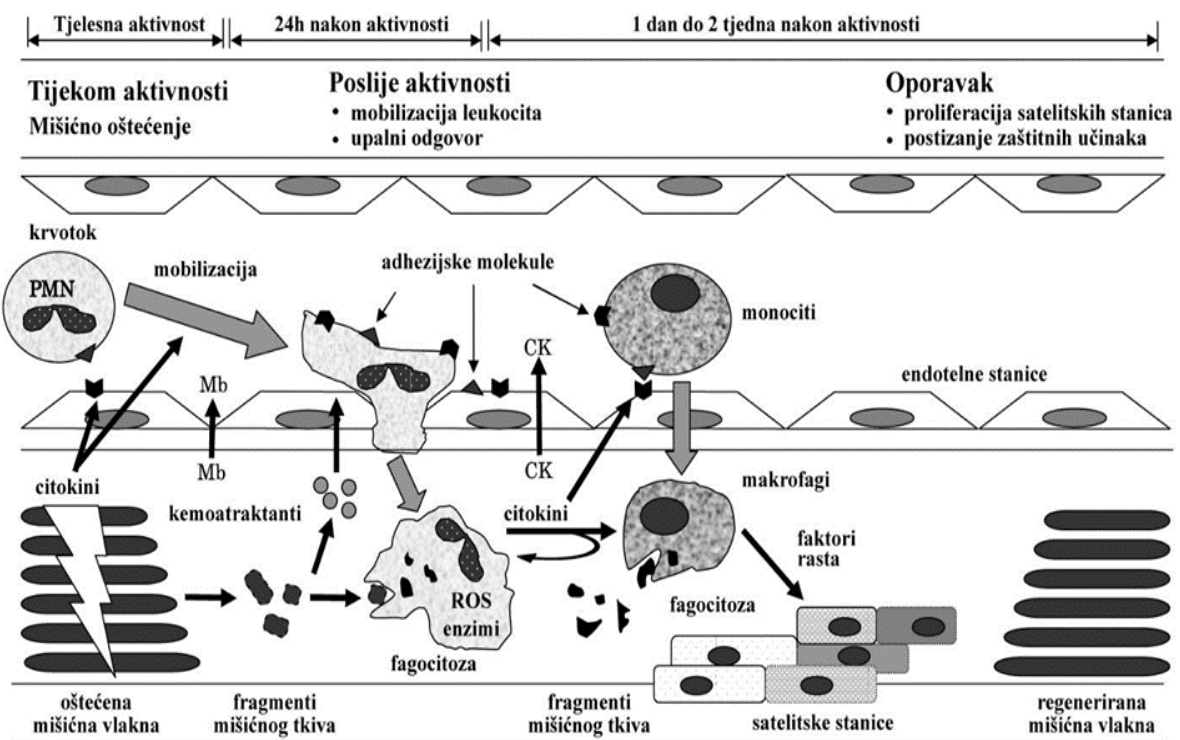
CK-MM izoenzim kemijski je vezan na sarkoplazmatski retikulum u području M – linije miofibrila. Također je pronađen u području sarkomerne I- pruge, gdje se smatra da predstavlja pomoć pri povećanim energetskeim zahtjevima. CK-MM izoenzim nalazi se u staničnoj citoplazmi, a istovremeno i u samoj strukturi miofibrila, pa se s obzirom na tu činjenicu postavlja pitanje da li se CK pojavljuje u međustaničnom prostoru kao znak strukturalnih oštećenja mišićnih vlakana ili je to znak metaboličkih poremećaja čija je posljedica povećanje permeabilnosti staničnih membrana (16).

1.2.2. Indirektni markeri mišićnog oštećenja

Biljezi umora perifernih ljudskih mišića zapravo su markeri staničnog mišićnog oštećenja koji nam pokazuju pojačan imunološki odgovor na mikro oštećenja. Prilikom istraživanja je utvrđeno kako u krvotoku broj leukocita značajno raste tijekom jednokratne aktivnosti. Prisutnost veze između imunološkog odgovora i tjelesne aktivnosti je očita, međutim sami imunološki odgovor te također razne kontradiktornosti poput utjecaja treninga različitog volumena, modaliteta, intenziteta, tjelesne forme ispitanika kao i njegove dobi te spola na imunološki odgovor mogu otežati donošenje zaključaka (17). Sama činjenica da su bazalne vrijednosti upalnih markera ljudi koji su tjelesno aktivni niže od onih koji nisu aktivni, govori nam da mora postojati adaptacija našeg imunološkog odgovora na redovitu tjelesnu aktivnost (18).

Jednokratne tjelesne aktivnosti nam u organizmu stvaraju upalno stanje iako u principu tjelesne aktivnosti na nas utječu protuupalno. U kontekstu medicine, upalom smatramo precizno definirane kemijske procese koji sačinjavaju degeneraciju i regeneraciju vlakana mišića ali i okolnog vezivnog tkiva nakon što oštetimo mišić programiranim tjelesnim vježbanjem (18).

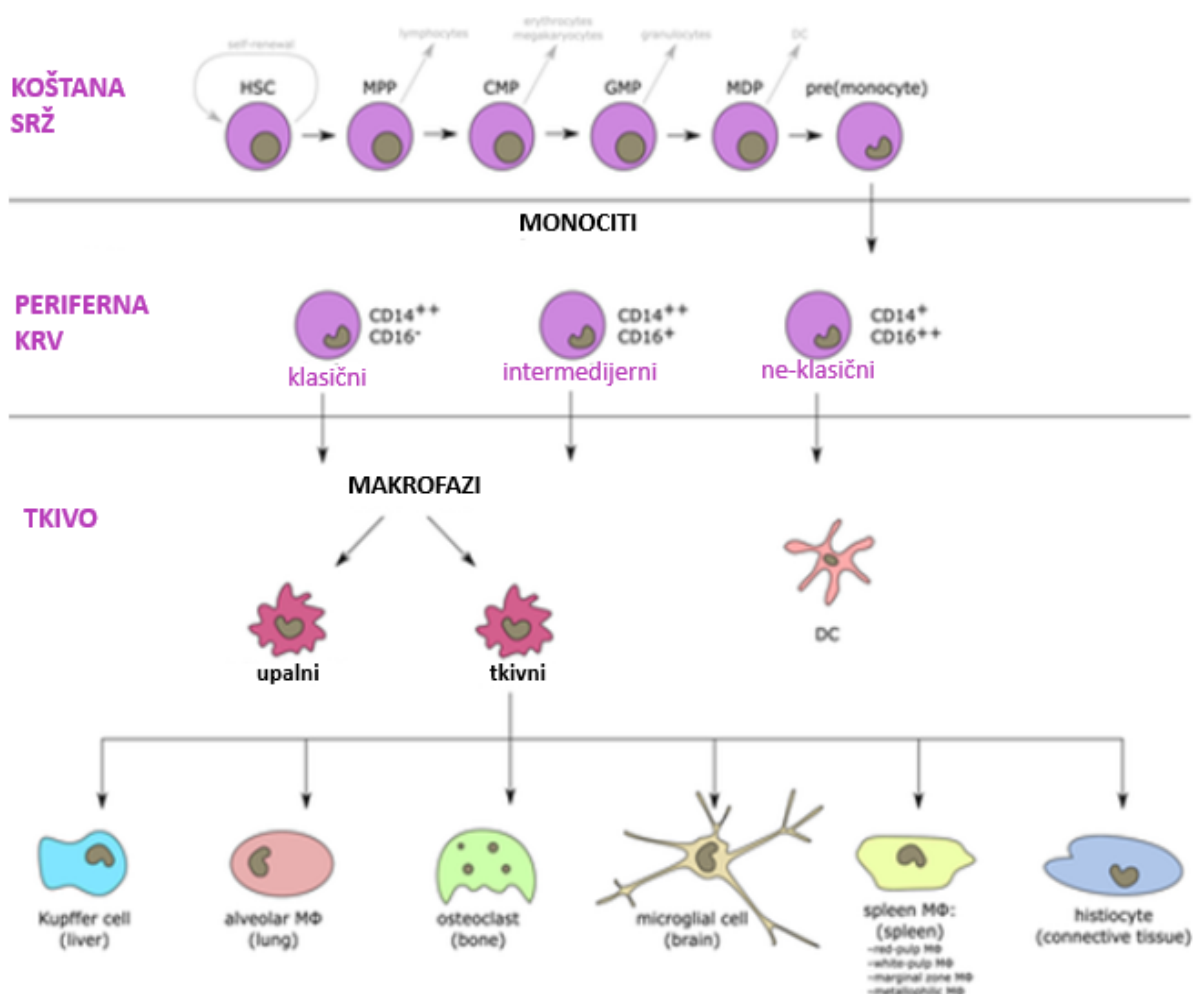
Jači upalni odgovor tj. povećan broj neutrofila i monocita opažen je kod tjelesne aktivnosti većeg intenziteta. Na staničnoj razini nastaju mikrostrukturalne promjene koje tijekom tjelesne aktivnosti uzrokuju brzo premještanje neutrofila koji će migrirati unutar oštećenog tkiva te će tu povećati proizvodnju reaktivnih vrsta kisika (ROS; *engl. reactive oxygen species*), a posljedica toga je još veće mišićno oštećenje. Oni ostaju u mišićnim stanicama tijekom 24 sata te ih zatim zamjenjuju aktivne upalne stanice monociti (makrofazi), koji stvaraju mnogobrojne proupalne citokine. Makrofazi se mogu zadržati unutar stanice i do 14 dana od početka tjelesne aktivnosti (19) (Slika 4).



Slika 4. Imunosni odgovor na mišićno oštećenje uzrokovano tjelesnom aktivnosti. PMN – polimorfonuklearni leukociti; Mb – mioglobin; CK – kreatin-kinaza; ROS – reaktivni kisikovi spojevi (20)

1.3. Klasifikacija monocita

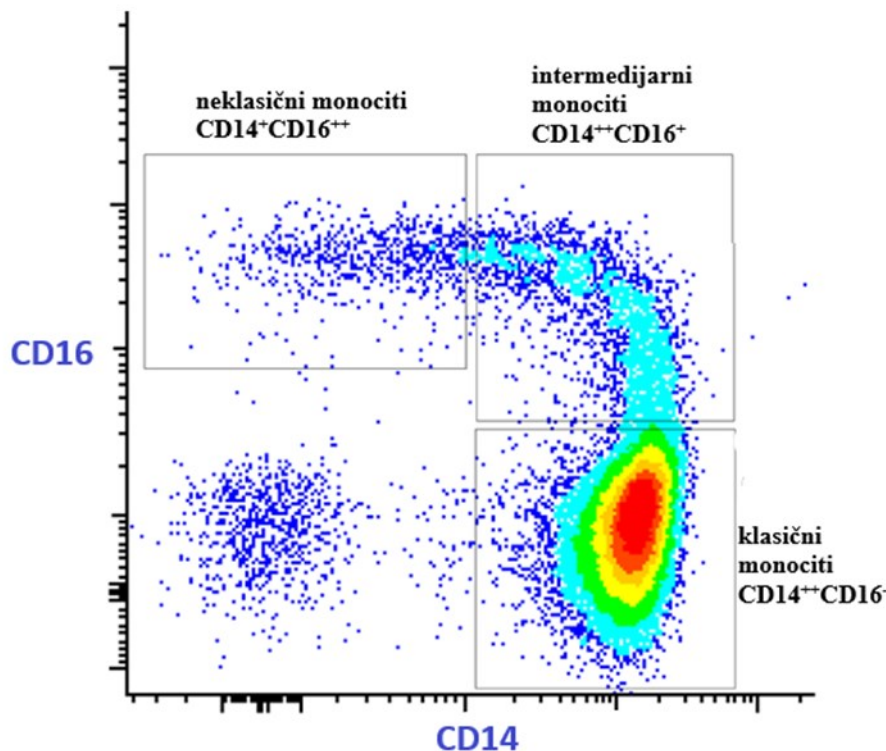
Monocite definiramo kao cirkulirajuće krvne stanice koje čine jednu komponentu „mononuklearnog fagocitnog sustava“ zajedno sa makrofazima i dendritičkim stanicama. Oni nam čine 10% ljudskih i 4% mišjih perifernih leukocita koji se razvijaju iz koštane srži zajedničkog mijeloidnog prekursora kojeg dijele s eritrocitima, granulocitima i dendritičkim stanicama (Slika 5) (21).



Slika 5. Razvoj monocita (22)

1.4. Subpopulacije monocita

Monocite dijelimo na tri tipa s obzirom na ekspresiju CD16 (IgG receptor niskog afiniteta) i CD14 (stanični koreceptor za liposaharide [LPS]).

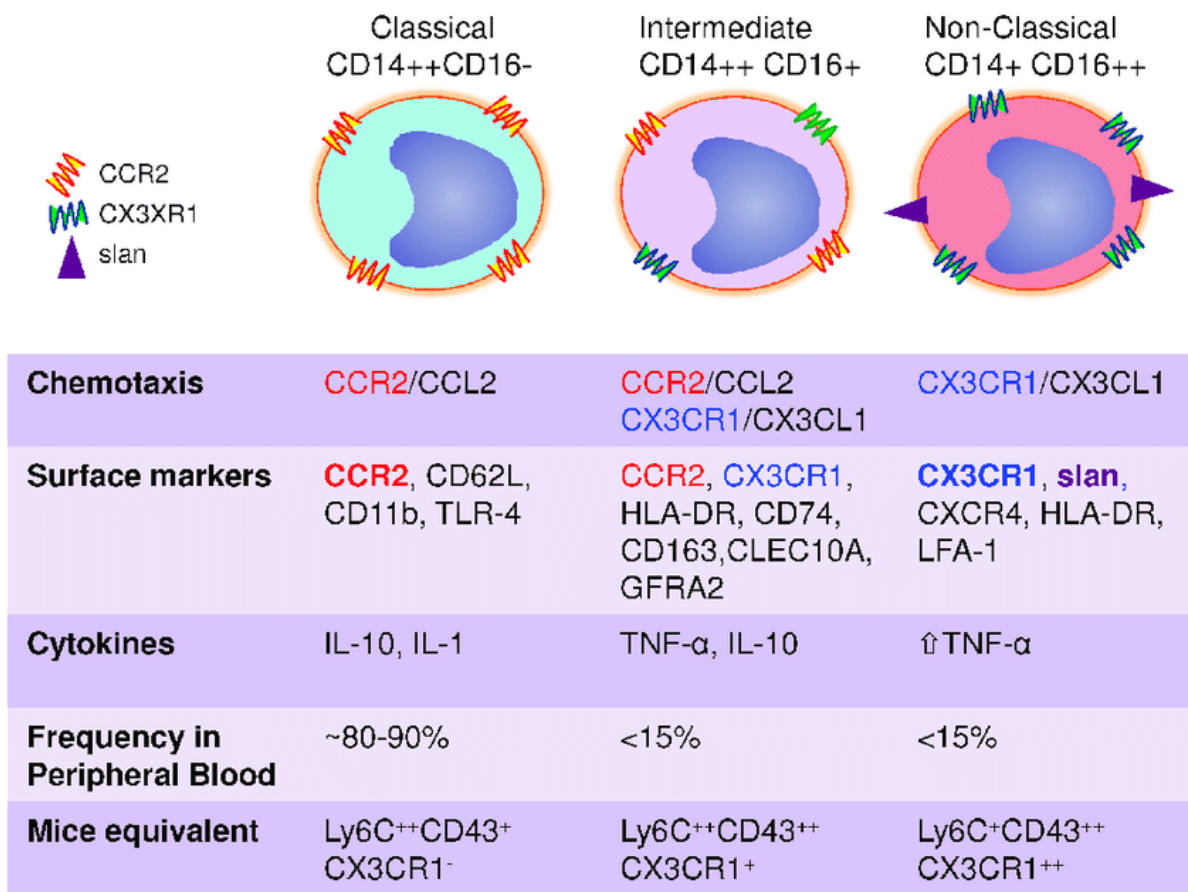


Slika 6. Grafički prikaz monocitne subpopulacije (23)

Subpopulacije:

- a) Klasični monociti Mon1 ($CD14^{++}CD16^{-}$) - smatramo ih prvom linijom obrane te su nam oni zaduženi za fagocitnu aktivnost; čine oko 90% ukupnih monocita; CD14 je jako eksprimiran, dok CD16 nije eksprimiran
- b) Intermedijarni monociti Mon2 ($CD14^{++}CD16^{+}$) - zadatak im je produkcija reaktivnih vrsta kisika te nam pokazuju protuupalnu i proupalnu aktivnost; CD14 je jako eksprimiran, dok je CD16 slabo eksprimiran
- c) Neklasični monociti Mon3 ($CD14^{+}CD16^{++}$) - pokazuju izrazitu protuupalnu aktivnost i njihova glavna uloga je adaptacija imunološkog sustava; CD14 je slabo eksprimiran, CD16 je jako eksprimiran (23).

Do pojave protočne citometrije podrijetlo i podvrste monocita bile su slabo poznate, ali zahvaljujući ovoj tehnologiji omogućena nam je identifikacija progenitora i diferencijacija različitih vrsta stanica (Slika 6) (24).



Slika 7. Subpopulacije monocita (25)

1.5. Ekspresija i funkcija CD14

Gotovo je 10 godina CD14 definiran isključivo na osnovi njegove lokalizacije na mijeloidnim stanicama. Otkriće da može funkcionirati kao receptor za lipopolisaharid (LPS) promijenio je koncept njegove uloga u fiziologiji mijeloidnih stanica (26).

CD14, ranije poznat kao antigen MY23, površinski je antigen i član obitelji glikoproteina na površini stanice. Protein kodiran genom CD14 prvenstveno se eksprimira u monocitima/makrofagima. On je receptor visokog afiniteta za gram-negativni endotoksin lipopolisaharid LPS i komplekse LPS veznog proteina (LBP). CD14 prepoznaje i veže se na LPS, uzrokujući fosforilaciju tirozina, translokaciju nuklearnog faktora NF- κ B, izazivajući oslobađanje citokina i proizvodnju slobodnih radikala kisika, te igra važnu ulogu u nizu reakcija uzrokovanih imunološkim i obrambenim sustavom (27).

CD14 kao receptor za LPS prisutan je u membranskom i topljivom obliku. Membranski CD14 (mCD14) pretežno se eksprimira na monocitima, makrofazima i granulocitima. Izvor topljivog CD14 (sCD14) još je nejasan. Prethodno istraživanje korištenjem monocita pokazalo je da sCD14 može biti izveden ili iz izdvajanja mCD14 ili iz izravne sekrecije monocita. Još je neizvjesno je li monocit jedini ili čak glavni izvor sCD14 (28).

CD14 kao receptor stanične membrane bakterijskog LPS-a, igra ključnu ulogu u nizu patoloških reakcija uzrokovanih imunološkim i obrambenim sustavom.

mCD14: U stanicama s mCD14 kao što su monociti, makrofagi i neutrofilii, mCD14, nakon što je podvrgnut svom ligandu LPS/LBP, može izazvati ciljane stanice da proizvode citokine, potičući tako tijelo da proizvede imunološki odgovor i patološko oštećenje. mCD14 stimulira monocite da luče TNF, IL-1 i druge citokine. mCD14 stimulira makrofage da proizvode FGF, transformirajući faktor rasta- β (TGF- β) i PDGF, od čega svi mogu inducirati rast stanica. Osim što je uključen u aktivaciju stanica kao LPS receptor, CD14 ima i druge funkcije. CD14 je jedan od receptora za prepoznavanje i fagocitozu apoptotskih stanica na makrofazima (29).

sCD14: Topljivi CD14 (sCD14) natječe se sa CD14 stanične membrane za vezanje na LPS i posreduje u odgovoru endotelih stanica i glatkih mišićnih stanica koje ne ekspimiraju CD14 na LPS. Topivi CD14 veže se na LPS i vrši različite fiziološke funkcije pod različitim uvjetima koncentracije. U fiziološkoj koncentraciji, sCD14 djeluje kao LPS agonist, dok u višim koncentracijama, sCD14 djeluje kao LPS antagonist. Naprimjer, povećana koncentracija sCD14 u krvi može smanjiti vezanje LPS/LBP kompleksa na monocite i dodatno smanjiti proizvodnju upalnih citokina, čime se regulira upalni odgovor (29).

1.6. Ekspresija i funkcija CD16

CD16 je Fc receptor imunoglobulina G (IgG) niskog afiniteta koji se eksprimira na prirodnim stanicama ubojicama (NK), granulocitima, aktiviranim makrofagima i nekim T limfocitima (30). NK stanice su veliki granulirani limfociti uključeni u obranu domaćina od tumorskih stanica i stanica zaraženih virusima. Uz prirodnu citotoksičnost, NK stanice mogu

utjecati na citotoksičnost ovisnu o antitijelima posredovanu CD16 receptorom, te nam je zbog toga on od velike važnosti (31). CD16 receptor eksprimira se u dva oblika iz dva različita gena:

- a) FcγRIIIb/CD16b je visoko izražen na neutrofilima
- b) FcγRIIIa/CD16a je izražen na prirodnim stanicama ubojicama (NK)

Ovi se proteini razlikuju po samo četiri aminokiselinska ostatka u zrelih proteinima. N-terminalni signalni peptid ne nalazi se u potpuno obrađenim proteinima. C-terminalni ostaci CD16b cijepaju se prije dodavanja GPI sidra na novootkriveni C-terminalni serin. Oba proteina cijepa ADAM17 i oslobađa ih sa površine stanice nakon aktivacije stanice (32).

1.7. Utjecaj tjelesne aktivnosti na subpopulacije monocita

Odmah nakon aktivnosti dolazi do akutnog porasta CD16⁺ monocita vjerojatno zbog toga što se oni prije tjelesne aktivnosti nalaze u marginalnim krvnim bazenima periferne krvi. Adherani su na krvne žile, zbog čega se ne mogu izmjeriti, ali uslijed stresa kojeg izaziva tjelesna aktivnost CD16⁺ monociti se otpuštaju sa krvnih žila u centralni krvni bazen i mi bilježimo njihov porast u perifernoj krvi (33).

Literatura koja istražuje utjecaj tjelesne aktivnosti na ekspresiju subpopulacija monocita nije česta i uglavnom se bazira na ispitanicima koji su starije životne dobi ili imaju određena kronična oboljenja (34). Kako bi došlo do aktivacija CD16⁺ monocita potrebna je samo jednokratna maksimalna anaerobna aktivnost u trajanju od jedne minute (35). Akutna aktivacija CD16⁺ monocita prijavljena je nakon aerobne tjelesne aktivnosti kod ispitanika s bubrežnim i srčanim oboljenjima ali smo na slične rezultate naišli također i kod zdravih ispitanika. Do sada je jedino istraživanje akutnog utjecaja treninga različitog inteziteta na ekspresiju subpopulacija monocita provedeno pri različitim modalitetima treninga s otporom, te sličnih istraživanja tijekom aerobne tjelesna aktivnosti nema (36).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA I HIPOTEZA

2.1. Cilj istraživanja

Osnovni cilj ovog istraživanja bio je utvrditi kako trening različitog intenziteta (ispod ili iznad bazalnog metabolizma) utječe na monocitne subpopulacije na uzorku sportaša rekreativaca.

2.2. Hipoteza

Sukladno navedenim ciljevima postavljena je sljedeća hipoteza:

- Postoji značajna povezanost između intenziteta tjelesne aktivnosti i ekspresije upalnih CD14⁺⁺CD16⁻ i protuupalnih CD14⁺CD16⁺⁺ monocitnih markera kod sportaša rekreativaca.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorak ispitanika

Uzorak čini 10 rekreativno aktivnih, zdravih ispitanika u dobi od 18 do 35 godina. Rekreativna aktivnost koju prakticiraju je trčanje 3 do 4 puta tjedno u trajanju od 30 do 40 minuta. Svi ispitanici su muškarci kako bi isključili utjecaj hormona na krajnje rezultate. Svi ispitanici su upućeni u oblik i protokol istraživanja te su dali suglasnost za sudjelovanje u istom s mogućnošću izlaska u bilo kojem trenutku. Sedam dana prije početka istraživanja ispitanici nisu smjeli koristiti nikakve antioksidanse, a na dan ispitivanja nikakve supstance sa diuretskim učinkom (čaj, kava) kako im urin ne bi bio razrijeđen. Ispitanicima je također mjeren C reaktivni protein na dan testiranja te u slučaju njegove povišenosti ispitanik nije mogao sudjelovati u istraživanju.

3.2. Procedura mjerenja i varijable

Na prvom dolasku svakom ispitaniku određen je maksimalni primitak kisika (VO_2 max) na trkačkom spiroergometru inkrementalnim testom (Slika 9). Ukoliko se ispitanik prije nije susretao sa trakom za trčanje došao bi na jedan neovisan trening kako bi se upoznao sa načinom testiranja. Protokol testiranja obuhvaćao je dva dijela. U prvom dijelu testa ispitanik bi započeo trčanje brzinom od 5 km/h nakon čega bi se brzina povećavala svake 3 minute za 1 km/h dok se ne dosegne brzinu od 7 km/h te je taj dio služio za zagrijavanje ispitanika. Zatim bi se brzina povećavati za 0.5 km/h svakih 30 sekundi. U trenutku kada ispitanik više ne bi mogao pratiti brzinu pokretne trake dao bi znak da se ispitivanje zaustavi. Ovakav test koristio se za određivanje aerobnog praga svakog ispitanika (37).



Slika 8. Ispitanik na traci za trčanje

Kako su ispitanici rekreativni sportaši bio im je prilagođen intenzitet tjelesne aktivnosti u istraživanju – (aktivnost u zoni aerobnog praga). Zatim im je određen individualni aerobni prag (GET) iz podataka dobivenih VO_2 max testom tzv. V- slope metodom (38). To je metoda korištena za vizualno određivanje prve točke odstupanja od linearnosti izlaza ugljikovog dioksida (VCO_2) isertanog u odnosu na unos kisika (VO_2). Točka u kojoj je VCO_2 odstupio od linije s nagibom jednakim 1,00 vizualno je odabrana kao prag izmjene plina tijekom

inkrementalne vježbe (39). Kako bi se umanjio utjecaj vremenskog odmaka realnog stanja u mišićima s dobivenim podacima iz izdahnutih plinova rezultate koje dobijemo moramo korigirati tj. vratiti unatrag za 30 sekunda (40). Svakom ispitaniku se prvo odredila njegova individualna GET zona te zatim, s obzirom na brzinu trčanja u GET zoni, izračunala brzina trčanja u zoni 10% iznad (GET +10 %) i zoni 10% ispod (GET-10 %) aerobnog praga. Nakon što je VO₂ max test bio odrađen, svaki ispitanik bi odradio tri 20 minutna testiranja u zonama koje smo gore naveli (GET, GET-10 %, GET+10 %).

Svi testovi započinjali su hodanjem u trajanju od 5 minuta na pokretnoj traci pri brzini od 5 km/h, a nakon toga bi slijedilo trčanje pri brzinama individualnim za svakog ispitanika. Kako je u pilot istraživanju utvrđeno da trajanje aktivnosti u zoni GET+10 % može maksimalno biti 20 minuta, jer više od toga izabrani profil ispitanika ne može izdržati, vrijeme trajanja navedenih testova prilagodili smo tome. Testiranja se odrađivalo uvijek u jutarnjim satima, u razmaku od sedam dana. Zbog psihološkog učinka koji bi mogao utjecati na rezultate testova, prije svakog testiranja ispitanici bi izabrali šifriranu karticu koja sa sobom nosi određeni intenzitet aktivnosti za taj dan. Šifre kartica bile su poznate su istraživačima ali ne i ispitanicima.

3.3. Obrada uzorka krvi

Diferencijalnu krvnu sliku određujemo Coulterovom metodom, iz uzorka pune venske krvi, uz pomoć biokemijskog auto-analizatora Beckman Coulter Olympus AU480. Uzorak krvi potreban za protočnu citometriju i biokemijsku analizu prikupljen je od svih ispitanika 30 minuta prije i nakon treninga. Krv se uzorkovala 30 minuta nakon aktivnosti kako bi se umanjila mogućnost utjecanja mijenjanja volumena krvne plazme na rezultate (41). Sto mikrolitara pune krvi je prethodno tretirano reagensom za blokiranje Fc receptora (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka) kako bi se spriječilo nespecifično vezanje. Krv je zatim inkubirana 20 minuta u mraku na 25°C s 4 µL anti-humanih CD14s PerCP-Cy5.5 konjugiranog protutijela (eBioscience, SAD) i 5 µL fikoeritriinom konjugiranih antitijela reaktivnih na ljudski CD16 (eBioscience, SAD). Nakon lize crvenih krvnih stanica otopinom za lizu (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Njemačka), stanice su analizirane na protočnom citometru (BD Accuri C6, BD Biosciences, Belgija) (Slika 10). Mjereni su također i uzorci nebojanih stanica

i obrađeni su kao negativne kontrole za postavljanje odgovarajućih regija. Prikupljali smo 10^6 stanica.

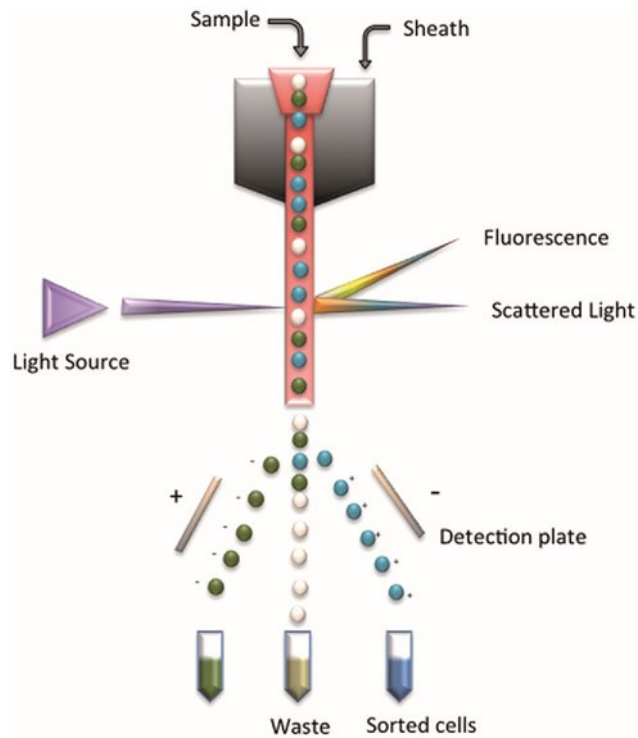


Slika 9. Protočni citometar na kojem je rađeno ispitivanje

3.4. Protočna citometrija

Protočna citometrija popularna je tehnika u hematologiji jer nam omogućava relativno brzu, točnu i osjetljivu analizu velikog broja stanica (42). Protočni citometar sačinjavaju 3 sustava koja su međusobno povezana: protočnog, optičkog i elektronskog. Protočni sustav čine pokretačka tekućina, koja nam služi kako bi nosila staničnu suspenziju, zatim stanična suspenzija i zračni potisak. Stanice iz stanične suspenzije u protočnom sustavu pojedinačno laminarnim protokom kroz sustav uske kapilare dolaze do snopa laserskog svjetla. Ono zajedno sa lećama, filtrima i osjetnicima čine optički sustav. Nakon što se stanice obasjaju laserskim svjetlom, stupanj raspršenja svjetlosti iste valne duljine pokazuje nam fizičke osobine stanice - veličine i zrnatosti (43). Specifične stanične strukture dodatno se obilježavaju fluorescentnim bojama koje mogu biti slobodne ili vezane za monoklonska protutijela. Kada fluorescentne boje (fluorokrome) obasjamo laserskim svjetlom one emitiraju svjetlost veće valne duljine od ulazne svjetlosti. Svjetlost hvataju detektori tj. specifični osjetnici protočnog citometra, kojih ima najmanje 4 dakle hvataju četiri različite boje koje su vezane na četiri različita protutijela (Slika 11). Veličina stanice se može odrediti pomoću FSC-detektora (*engl. forward scatter*), dok se unutarnja struktura stanice može odrediti pomoću SSC-detektora (*engl. side scatter*). Oba

detektora hvataju raspršene zrake svjetlosti te su svi svjetlosni signali pretvoreni u digitalne signale koji se prenose u elektronsko računalo kako bi nam služili za analizu (44).



Slika 10. Razvrstavanje uzorka pomoću skretanja kapljica (45)

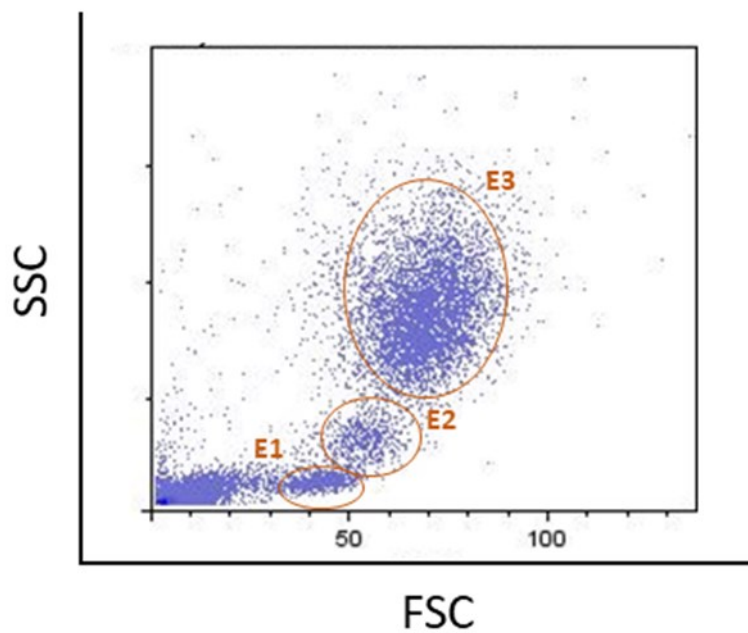
Za definiranje populacija stanice najčešće koristimo citogram veličine i zrnatosti stanica (FSC×SSC) na kojem se postavlja regija (R) analize oko ciljnih stanica. Iz njih će se analizirati specifični fluorescentni signali, što smatramo jednim od najvećih prednosti moderne protočne citometrije, budući da stanice prije analize fizički ne moramo razdvojiti. Velika brzina mjerenja signala (više od 10^3 stanice po sekundi) te mjerenje više parametara u isto vrijeme (i do desetak) također su neke od prednosti modernih citometara (46).

3.5. Biokemijska analiza

Sve uzorke analizirao je iskusan stručnjak biokemičar u jednom laboratoriju (LabPlus) slijedeći isti standardni postupak. Plazmatski nivo C-reaktivnog proteina visoke osjetljivosti bilo je određivan lateks turbidimetrijskom metodom (Abbott Laboratories, Chicago, SAD). Ostale biokemijske analize mjerene su standardnim laboratorijskim metodama.

3.6. Analiza podataka

Podaci prikupljeni citometrom analizirani su pomoću softvera FlowLogic (Inivai Technologies, Mentone Victoria, Australija). Naprijed je prikazana fluorescencija leukocita raspršeni/bočni (FSC/SSC) točkasti dijagrami. FSC parametar označava promjer ćelije i SSC označava zrnatost stanice. Populacija limfocita je označena elipsom E1, monocitna populacija s E2, a populacija granulocita s E3.



Slika 11. Reprezentativan graf za limfocite (E1), monocite (E2), granulocite (E3). (47)

4. REZULTATI

4.1. Antropometrijski parametri ispitanika

Nije postojala značajna razlika između visine, težine, dobi i indeksa tjelesne mase kod ispitanika. Svi ispitanici su bili muškarci, kako hormonski status ne bi utjecao na rezultate, te rekreativni sportaši bez drugih pridruženih bolesti.

Tablica 2. Osnovne karakteristike ispitanika i njihova srednja vrijednost

| karakteristika | srednja vrijednost \pm SD |
|----------------|-----------------------------|
| visina | 185.11 \pm 3.34 |
| težina | 89.72 \pm 7.77 |
| dob | 34.36 \pm 0.924 |
| BMI | 26.13 \pm 0.519 |

SD- standardna devijacija

4.2. Utjecaj treninga različitog intenziteta na CD14⁺⁺CD16⁺ monocitnu podskupinu kod ispitanika amatera

Rezultati su pokazali da tjelesna aktivnost utječe na aktivaciju proupalnih monocita CD14⁺⁺CD16⁺. Trening pri intenzitetu 2 i 3 pokazao je porast proupalnih monocita kod ispitanika, no nije imao statistički značajnu važnost (Tablica 3.).

Tablica 3. Razlike u broju CD14⁺⁺CD16⁺ proupalnih monocita pri intenzitetu 2 i 3

| Varijable | Opisna statistika | | | | | | |
|--|-------------------|---------------------|-----------------|---------------|-------|--------|----------|
| | N | Aritmetička sredina | Conf. - 95.000% | Conf. 95.000% | Min | Max | p* |
| CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ Dogadaj 1 | 9 | 90.44 | 10.20 | 170.69 | 9.00 | 333.00 | |
| CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ Dogadaj 1' | 9 | 100.78 | -8.72 | 210.28 | 16.00 | 435.00 | p > 0.05 |
| CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ Dogadaj 2 | 10 | 46.36 | 8.37 | 78.3523 | 7.00 | 177.00 | |
| CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ Dogadaj 2' | 10 | 54.63 | 19.15 | 96.11 | 7.00 | 196.00 | p > 0.05 |
| CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ Dogadaj 3 | 10 | 64.36 | 14.84 | 105.88 | 7.00 | 251.00 | |
| CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺ Dogadaj 3' | 10 | 80.27 | 25.94 | 122.59 | 10.00 | 244.00 | p > 0.05 |

*analiza varijance (ANOVA)

4.3. Utjecaj treninga različitog intenziteta na CD14⁺⁺CD16⁻ monocitnu podskupinu kod ispitanika amatera

Razlika u broju upalne monocitne populacije također je opažena. Broj upalnih monocita CD14⁺⁺CD16⁻ porastao je, međutim nedovoljno da bi imao statistički značajnu važnost (Tablica 4). Statistički značajnu važnost je pokazala posthoc analiza na CD14⁺⁺CD16⁻ za različite intenzitet treninga (Tablica 4a) ukoliko gledamo ukupan uzorak ispitanika. Naši rezultati također upućuju na to da vrijeme uzimanja krvi i broj testiranih subjekti utječu na rezultate.

Tablica 4. Razlike upalne monocitne populacije kod ispitanika pri različitim intenzitetima opterećenjima

| Varijable | Opisna statistika | | | | | | |
|---|-------------------|---------------------|----------------|---------------|--------|--------|------------|
| | N | Aritmetička sredina | Conf. -95.000% | Conf. 95.000% | Min | Max | <i>p</i> * |
| CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ Dogadaj 1 | 10 | 400.90 | 264.34 | 537.46 | 28.00 | 679.00 | |
| CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ Dogadaj 1' | 10 | 429.50 | 279.40 | 579.59 | 151.00 | 752.00 | 0.646 |
| CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ Dogadaj 2 | 11 | 414.27 | 257.08 | 571.45 | 107.00 | 963.00 | |
| CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ Dogadaj 2' | 11 | 468.09 | 318.79 | 617.39 | 199.00 | 856.00 | 0.162 |
| CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ Dogadaj 3 | 11 | 396.00 | 302.09 | 489.91 | 232.00 | 686.00 | |
| CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ Dogadaj 3' | 11 | 502.36 | 395.38 | 609.34 | 266.00 | 729.00 | 0.139 |

*analiza varijance (ANOVA)

Tablica 4a.

| Učinak | Ponavljana Mjerenja Analize Varijacije sa Učinkom Veličine i Snage (Spreadsheet38) Sigma-ograničena parametrizacija Učinkovita dekompozicija hipoteze | | | | |
|------------------|--|-------------------|--------|----------|-----------------|
| | SS | Stupnjevi slobode | F | p | Učinak veličine |
| OPTERECENJE | 20170 | 2 | 0.2352 | 0.792817 | 0.025466 |
| TRETMAN | 75260 | 1 | 7.1837 | 0.025196 | 0.443886 |
| OPTERECE*TRETMAN | 13453 | 2 | 0.3597 | 0.702808 | 0.038428 |

ANOVA

5. RASPRAVA

Redovita tjelesna aktivnost donosi brojne dobrobiti za naše zdravlje i služi kao prevencija od mnogih nezaraznih bolesti. Također, pri velikom intenzitetu, aktivnost može imati utjecaj na odgovor imunološkog sustava te dovesti do mišićnog oštećenja. Kao produkt tog mišićnog oštećenja imamo direktne i indirektne markere koji ukazuju na oštećenje. Indirektni markeri su upalni i protuupalni monociti čiju smo pojavnost pratili u našem istraživanju te kao konačan rezultat dobili porast upalnih i protuupalnih monocita. To nam govori da bi tjelesna aktivnost mogla utjecati na imunološki sustav kontroliranjem ne samo protuupalnih već i upalnih monocita.

Pedersen i sur. u svom radu prikazuju kako nakon intenzivnog dugotrajnog vježbanja, imunološki sustav karakterizira popratno oštećenje staničnog imunološkog sustava i povećana upala. Stoga se niske koncentracije limfocita, potisnuta prirodna imunost, potisnuta proliferacija limfocita i potisnute razine sekretornog IgA u slini nalaze istovremeno s visokim razinama cirkulirajućih proupalnih i protuupalnih citokina. Temeljni mehanizmi su multifaktorijalni i uključuju neuroendokrinološke i metaboličke čimbenike (48).

Kliničke posljedice imunoloških promjena izazvanih vježbanjem nisu službeno identificirane, ali učinak vježbanja na dinamiku limfocita i imunološku funkciju može biti povezan s učincima vježbanja na otpornost infekcija i malignih bolesti, a odgovor citokina može biti povezan s oštećenjem mišića ili rast stanica (49).

Da redovito vježbanje smanjuje rizik od kroničnih metaboličkih i kardiorespiratornih bolesti govore nam Gleeson i sur., dijelom zato što vježba ima protuupalne učinke. Protuupalni učinci redovitog vježbanja mogu se očitovati i smanjenjem mase visceralne masti i indukcijom protuupalnog okruženja sa svakim ciklusom vježbanja. Različiti mehanizmi mogu pridonijeti stvaranju ovog protuupalnog okruženja, uključujući: povećano oslobađanje kortizola i adrenalina iz nadbubrežne žlijezde; povećana proizvodnja i puštanje IL-6 i drugih miokina iz radnog skeletnog mišića; smanjena ekspresija TLR-a na monocitima i makrofagima (s naknadnom inhibicijom proizvodnog stvaranje proupalnih citokina); inhibicija infiltracije masnog tkiva monocitima i makrofagima; fenotipsko prebacivanje makrofaga unutar masnog tkiva; smanjenje cirkulirajućeg broja proupalnih monocita; i povećanje broja TReg stanica u cirkulaciji. Ovi protuupalni učinci vježbanja također su vjerojatno odgovorni za djelomičnu imunosupresiju koja čini elitne sportaše osjetljivije na uobičajene infekcije (50).

Trenutačno ne znamo relativnu važnost tih različitih upalnih i protuupalnih mehanizama, iako se čini da vjerojatno ovisiti o načinu, učestalosti, intenzitetu i trajanju vježbe koja se izvodi. Istraživanja ovog tipa na uzorku zdravih ljudi koji su uključeni u neki od oblika rekreativne aktivnosti dosta su rijetka. Međutim, naše istraživanje svakako potvrđuje da tjelesna aktivnost utječe na imunološki sustav, no usprkos postojanju veze i brojnim istraživanjima ta veza još nije u potpunosti razjašnjena.

Treba napomenuti i da je glavni ograničavajući faktor kod ovog istraživanja invazivna metoda kojom se procjenjuje postojanja mišićnih oštećenja i markera imunološkog odgovora (uzorkovanje krvi) koji dovodi i do glavnog nedostatka ovog istraživanja. Sam plan istraživanja zahtjeva četiri dolaska u laboratorij, a od toga tri dolaska uključuju uzorkovanje krvi prije i poslije aktivnosti (ukupno 6 uzorkovanja) pa je pronalazak ispitanika koji bi bili zainteresirani za sudjelovanje otežan. Također mogući remeteći čimbenici bi mogli biti i relativno nehomogen uzorak ispitanika (rekreativci) te ne poštivanje preporuka i pravila prije testiranja. U svakom slučaju smatramo da bi povećan broj ispitanika svakako doprinio kvalitetnijem rezultatu.

Daljnjim istraživanjima treba utvrditi način, intenzitet i trajanje vježbanja potrebno za optimiziranje protuupalnih učinaka, a tek tada treba utvrditi je li vježbanje uvijek korisno kao terapija za liječenje bolesnika koji boluju od nekakvih upalnih stanja. Konačno, trebalo bi napomenuti da su potrebna daljnja istraživanja kako bi se jasno pokazali izravni i neizravni molekularni mehanizmi kojim tjelesno vježbanje utječe na imunološku funkciju. Nema sumnje da je redovita tjelovježba korisna za zdravlje, ali veliki je izazov potaknuti veći dio populacije da se uključi (50).

6. ZAKLJUČAK

1. Broj upalnih monocita kod ispitanika tijekom treninga u zonama GET +10% i GET-10% blago je porastao, no taj porast nije imao statistički značajnu važnost. Međutim, ako ispitanike ne gledamo pojedinačno već ih promatramo kao ukupan uzorak, vidimo statistički značajan porast.
2. U broju protuupalnih monocita kod ispitanika tijekom treninga u zonama GET +10% i GET-10% nije došlo je do statistički značajnog porasta.

7. LITERATURA

Literatura:

1. Kralj V, Brkić Biloš I, Ćorić T, Silobrčić Radić M, Šekerija M. Kronične nezarazne bolesti–teret bolesti stanovništva Hrvatske. *Cardiologia Croatica*. 2015;10:167-75.
2. Breda J, Farrugia Sant'Angelo V, Duleva V, Galeone D, Heinen MM, Kelleher CC, Menzano MT, Musić Milanović S, Mitchell L i sur. Mobilizing governments and society to combat obesity: Reflections on how data from the WHO European Childhood Obesity Surveillance Initiative are helping to drive policy progress. *Obesity Reviews*. 2021;22:e13217.
3. Dalbello Tir AM. Učinak redovne tjelesne aktivnosti na kroničnu subkliničku sustavnu upalu [Završni specijalistički]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2017 [pristupljeno 26.10.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:914832>
4. Svilar L, Krakan I, Bagarić Krakan L. Tjelesna aktivnost kao lijek u funkciji zdravlja. *Hrana u zdravlju i bolesti: znanstveno-stručni časopis za nutricionizam i dijetetiku*. 2015;31:19-22.
5. Benko D. Metode vježbanja u bodybuildingu: interval odmora [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Kineziološki fakultet; 2019 [pristupljeno 22.07.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:117:703730>
6. Lasevicius T, Ugrinowitsch C, Schoenfeld BJ, Roschel H, Tavares LD, De Souza EO, Laurentino G, Tricoli V. Effects of different intensities of resistance training with equated volume load on muscle strength and hypertrophy. *European journal of sport science*. 2018;18:772-80.
7. Porter MM, Vandervoort AA, Lexell J. Aging of human muscle: structure, function and adaptability. *Scandinavian journal of medicine & science in sports*. 1995;5:129-42.
8. Poropat K. FIZIOLOGIJA I POSTUPCI RAZVOJA MIŠIĆNE HIPERTROFIJE [Završni rad]. Rijeka: Sveučilište u Rijeci, Fakultet zdravstvenih studija u Rijeci; 2021 [pristupljeno 27.07.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:184:537157>
9. Lasevicius T, Ugrinowitsch C, Schoenfeld BJ, Roschel H, Tavares LD, De Souza EO, Laurentino G, Tricoli V. Effects of different intensities of resistance training with equated volume load on muscle strength and hypertrophy. *European journal of sport science*. 2018;18:772-80.

10. Pinjuh D. Fiziološki učinci oralnog unosa kreatin monohidrata [Završni rad]. Osijek: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju; 2018 [pristupljeno 20.07.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:648601>
11. Stanković M, Radovanović D. Oksidativni stres i fizička aktivnost. *SportLogia*. 2012;8:1-0.
12. Trivić I. Stanja povezana s povišenom aktivnosti kreatin kinaze u djece [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2016 [pristupljeno 18.07.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:851730>
13. Biologydictionary.net Editors. "Creatine Kinase." *Biology Dictionary*, Biologydictionary.net; 2018 [pristupljeno 20.07.2022.] Dostupno na: <https://biologydictionary.net/creatine-kinase/>.
14. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, Nicolay K, Eppenberger HM. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochemical Journal*. 1992;281:21.
15. Fritz-Wolf K, Schnyder T, Wallimann T, Kabsch W. Structure of mitochondrial creatine kinase. *Nature*. 1996;381:341-5.
16. Trivić I. Stanja povezana s povišenom aktivnosti kreatin kinaze u djece [Diplomski rad]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet; 2016 [pristupljeno 20.10.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:851730>
17. Parčetić-Kostelac I, Bešlo D, Šperanda M, Jović T, Đidara M, Kopačin T i sur. OKSIDACIJSKI STRES U UVJETIMA INTENZIVNOG FIZIČKOG NAPORA U LJUDI I ŽIVOTINJA. *Stočarstvo* [Internet]. 2016 [pristupljeno 01.09.2022.];70(2):71-92. Dostupno na: <https://hrcak.srce.hr/183216>
18. Peake JM, Neubauer O, Della Gatta PA, Nosaka K. Muscle damage and inflammation during recovery from exercise. *J Appl Physiol* 2017;122:559–70.
19. Beaton LJ, Tarnopolsky MA, Phillips SM. Contraction-induced muscle damage in humans following calcium channel blocker administration. *J Physiol* 2002;544:849–59.
20. Marijančević D. Učinci trenaznog protokola ponavljanih sprintova na koncentraciju F2t-izoprostana [Disertacija]. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet; 2021 [pristupljeno 26.10.2022.] Dostupno na: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:888391>

21. Williams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity*. 2018;49:595-13.
22. Ożańska A, Szymczak D, Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scandinavian journal of immunology*. 2020;92:e12883.
23. Patnaik MM, Timm MM, Vallapureddy R, Lasho TL, Ketterling RP, Gangat N, Shi M, Tefferi A, Solary E, Reichard KK, Jevremovic D. Flow cytometry based monocyte subset analysis accurately distinguishes chronic myelomonocytic leukemia from myeloproliferative neoplasms with associated monocytosis. *Blood cancer journal*. 2017;7:e584.
24. Timmerman KL, Flynn MG, Coen PM, Markofski MM, Pence BD. Exercise training-induced lowering of inflammatory (CD14⁺ CD16⁺) monocytes: a role in the anti-inflammatory influence of exercise?. *Journal of leukocyte biology*. 2008;84:1271-8.
25. Waeleche VS, Tremblay CL, Routy JP, Ancuta P. The biology of monocytes and dendritic cells: contribution to HIV pathogenesis. *Viruses*. 2018;10:65.
26. Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology today*. 1993;14:121-5.
27. Su GL, Dorko K, Strom SC, Nüssler AK, Wang SC. CD14 expression and production by human hepatocytes. *Journal of hepatology*. 1999;31:435-42.
28. Stelter F. Structure/function relationships of CD14. *Chem Immunol*. 2000;74:25-41.
29. Bazil V, Strominger JL. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *The Journal of Immunology*. 1991;147:1567-74.
30. Hibbs ML, Selvaraj P, Carpen O, Springer TA, Kuster H, Jouvin MH, Kinet JP. Mechanisms for regulating expression of membrane isoforms of Fc γ RIII (CD16). *Science*. 1989;246:1608-11.
31. Romee R, Foley B, Lenvik T, Wang Y, Zhang B, Ankarlo D, Luo X, Cooley S, Verneris M, Walcheck B, Miller J. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013;121:3599-08.
32. Roberts JT, Barb AW. A single amino acid distorts the Fc γ receptor IIIb/CD16b structure upon binding immunoglobulin G1 and reduces affinity relative to CD16a. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293:19899-908.

33. Ziegler-Heitbrock L. The CD14⁺ CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2007;81:584-92.
34. Steppich B, Dayyani F, Gruber R, Lorenz R, Mack M, Ziegler-Heitbrock HL. Selective mobilization of CD14⁺ CD16⁺ monocytes by exercise. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2000. doi:10.1152/ajpcell.2000.279.3.C578.
35. Wise AF, Williams TM, Rudd S, Wells CA, Kerr PG, Ricardo SD. Human mesenchymal stem cells alter the gene profile of monocytes from patients with Type 2 diabetes and end-stage renal disease. *Regenerative Medicine*. 2016;11:145-58.
36. Wells AJ, Hoffman JR, Jatner AR, Varanoske AN, Church DD, Mangine GT. Monocyte recruitment following high-intensity and high-volume resistance exercise. *DigitalCommons@ Kennesaw State University*; 2016;75:567-7.
37. Batinić DR, Rnjak L, Dubravčić K. Protočna citometrija u hematologiji. *Paediatr Croat*. 2006;50:176-82.
38. Loveless DJ, Weber CL, Haseler LJ, Schneider DA. Maximal leg-strength training improves cycling economy in previously untrained men. *Medicine and science in sports and exercise*. 2005;37:1231.
39. Schneider DA, Phillips SE, Stoffolano SH. The simplified V-slope method of detecting the gas exchange threshold. *Medicine and science in sports and exercise*. 1993;25:1180-4.
40. Iannetta D, de Almeida Azevedo R, Keir DA, Murias JM. Establishing the VO₂ versus constant-work-rate relationship from ramp-incremental exercise: Simple strategies for an unsolved problem. *Journal of Applied Physiology*. 2019;127:1519-27.
41. Schneider DA, Phillips SE, Stoffolano SH. The simplified V-slope method of detecting the gas exchange threshold. *Medicine and science in sports and exercise*. 1993;25:1180-4.
42. McAllister MJ, Basham SA, Waldman HS, Smith JW, Mettler JA, Butawan MB, Bloomer RJ. Effects of psychological stress during exercise on markers of oxidative stress in young healthy, trained men. *Physiology & behavior*. 2019 Jan 1;198:90-5.
43. Shapiro HM. *Practical flow cytometry*. John Wiley & Sons; 2005. 648 str.
44. Manohar SM, Shah P, Nair A. Flow cytometry: principles, applications and recent advances. *Bioanalysis*. 2021;13:181-98.

45. Kalina T, Flores-Montero J, Van Der Velden VH, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, Almeida J, Lhermitte L, Asnafi V, Mendonça A, de Tute R. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. 2012;26:1986-2010.
46. McKinnon KM. Flow cytometry: an overview. *Current protocols in immunology*. 2018;120:5-1
47. Sliwinska E. Flow cytometry—a modern method for exploring genome size and nuclear DNA synthesis in horticultural and medicinal plant species. *Folia Horticulturae*. 2018;30:103-28.
48. Franić I, Režić-Mužinić N, Markotić A, Živković PM, Vilović M, Rušić D, Božić J. Expression of CD44 in Leukocyte Subpopulations in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Diagnostics*. 2022;12:2014.
49. Pedersen BK, Toft AD. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. *British journal of sports medicine*. 2000;34:246-51.
50. 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 reviews immunology*. 2011;11:607-15.

8. SAŽETAK

Cilj istraživanja:

Cilj ovog istraživanja je utvrditi kako trening različitog intenziteta (ispod ili iznad bazalnog metabolizma) utječe na monocitne subpopulacije na uzorku sportaša rekreativaca.

Materijali i metode:

Uzorci krvi svih sudionika uzeti su za analizu 30 minuta prije i nakon treninga. Uzorak je tretiran reagensom za blokiranje Fc receptora te je inkubirana 20 minuta u mraku na 25°C s 4 μ L anti-humanih CD14s PerCP-Cy5.5 konjugiranih antitijela i 5 μ L fikoeritriinom konjugiranih antitijela reaktivnih na ljudski CD16. Nakon lize crvenih krvnih stanica otopinom za lizu, stanice su analizirane na protočnom citometru. Mjereni su također i uzorci neobojanih stanica i obrađeni su kao negativne kontrole. Podaci prikupljeni citometrom analizirani su pomoću softvera FlowLogic.

Rezultati:

Kao rezultat istraživanja dobili smo podatak da tjelesna aktivnost ima utjecaj na aktivaciju protuupalne te upalne monocitne skupine. Povećanjem intenziteta tjelesne aktivnosti opažen je porast broja monocitnih skupina. Također rezultati govore da vrijeme uzorkovanja krvi i broj ispitanika utječu na rezultate.

Zaključak:

Trening različitog intenziteta kod sportaša rekreativaca (ispod ili iznad bazalnog metabolizma) utjecao je na porast broja upalnih i protuupalnih monocita, ali je za bolje razumijevanje utjecaja intenziteta potrebno uzeti u obzir vrijeme uzorkovanja krvi i veći uzorak.

9. SUMMARY

The aim of this study:

The aim of this research is to determine how training at different intensities (below or above basal metabolism) affects monocyte subpopulations in a sample of recreational athletes.

Methods:

Blood samples of all participants were taken for analysis 30 minutes before and after training. The sample was treated with Fc receptor blocking reagent and incubated for 20 minutes in the dark at 25°C with 4 µL of anti-human CD14s PerCP-Cy5.5 conjugated antibodies and 5 µL of phycoerythrin-conjugated antibodies reactive to human CD16. After the lysis of red blood cells with lysis solution, the cells were analyzed on a flow cytometer. Samples of unstained cells were also measured and processed as negative controls. Data collected by cytometer were analyzed using FlowLogic software.

Results: As a result of the research, we obtained an information that physical activity has an impact on the activation of anti-inflammatory and inflammatory monocyte groups. By increasing the intensity of physical activity, an increase in the number of monocyte groups was observed. The results also tell that the time of blood sampling and the number of subjects have an influence on results.

Conclusion: Training of different intensity in recreational athletes (below or above basal metabolism) affects the increase in the number of inflammatory and anti-inflammatory monocytes, but for a better understanding of intensity influence, it is necessary to take into account the time of blood sampling and a larger sample.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Vlatka Bašić

Datum rođenja: 18.05.1996.

Državljanstvo: hrvatsko

Adresa: 141. brigade 10, Kaštel Stari

e-mail: vlatka.basic.96@gmail.com

Broj mobitela: +385 92 367 2844

OBRAZOVANJE:

- 2003. – 2011. Osnovna škola Bijaći, Kaštel Novi, Republika Hrvatska
- 2011. – 2015. IV. gimnazija Marko Marulić Split, Republika Hrvatska
- 2015. - 2022. Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet, Kemijsko-tehnološki fakultet, smjer: farmacija

RADNO ISKUSTVO:

III. 2020. – IV. 2020 – Ispomoć u proizvodnji antiseptika za vrijeme pandemije Covid-19

- Galenski laboratorij, Dugopolje

II. 2022. - VIII. 2022. – Stručno osposobljavanje u Ljekarnama Splitsko-dalmatinske županije,

- ljekarna Trogir

POSEBNE VJEŠTINE:

Rad na računalu: MS Office, Eskulap 2000

Strani jezici: engleski jezik B2

Vozačka dozvola: B kategorij