

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MONIKA KORENJAK

**DOLOČANJE IL-6 PRI ŠPORTNIKIH Z MEJNIMI VREDNOSTMI FERITINA**

**DIPLOMSKA NALOGA**

LJUBLJANA, 2008

## VSEBINA

1. Povzetek.....	
2. Seznam okrajšav.....	
3. Uvod.....	
3.1. Splošne značilnosti imunskega sistema.....	
3.2. Interlevkini.....	
3.3. Vnetje.....	
3.4. Imunski odziv organizma na športno aktivnost.....	
3.5. Vpliv športne aktivnosti na vrednosti interlevkina-6.....	
3.6. Vpliv športne aktivnosti na koncentracijo železovih ionov v krvi.....	
3.7. Fiziologija pri veslačih.....	
3.8. Metode določanja interlevkina-6.....	
3.9. Metode določanja feritina.....	
4. Namen dela.....	
5. Materiali in metode.....	
5.1. Določanje interlevkina-6.....	
5.2. Določanje feritina.....	
5.3. Statistična analiza.....	
6. Rezultati.....	
7. Razprava.....	
8. Sklep.....	
9. Literatura.....	

## POVZETEK

Pri profesionalnih športnikih pogosto pride zaradi kroničnih naporov do nenormalne koncentracije železovih ionov v organizmu. To se odraža pogosteje v zelo nizkih, redkeje pa tudi visokih vrednostih feritina. Dokazano je, da pri fizični aktivnosti skeletno-mišična vlakna izločajo velike količine citokina interleukina-6. To v organizmu povzroči stanje, ki je podobno razmeram pri vnetju. Interleukin-6 nato v jetrih sproži izločanje hormona hepcidina, ki inhibira absorpcijo železovih ionov v intestinalnem traktu, prav tako pa onemogoči sproščanje železovih ionov iz makrofagov in posledica je razvoj anemije.

V diplomski nalogi smo preučevali povezavo med železovimi ioni (feritinom) in mediatorjem vnetja interleukinom-6 pri športnikih. Želeli smo ugotoviti kako se spreminjajo njune koncentracije v krvi med naporom. Testirali smo 14 slovenskih profesionalnih veslačev pred in po koncu testa. Vzorce smo vzeli iz ušesne mečice pred ogrevanjem in 5 min po končanem 9 minutnem stopnjevanem kontinuiranem testu na veslaškem ergometru. Vrednosti feritina so se med naporom značilno povečale, pred naporom je bila povprečna vrednost  $49,57\mu\text{g/L}$ , po naporu pa  $64,42\mu\text{g/L}$ . Zvišale so se tudi koncentracije interleukina-6, z začetne povprečne vrednosti  $0,48\text{ng/L}$  v mirovanju na  $0,95\text{ng/L}$  po naporu. Pri feritinu lahko zvišanje vrednosti pripišemo predvsem dejstvu, da med naporom pride do prerazporeditve telesnih tekočin in posledično do hemokonzentracije, medtem ko je povišanje koncentracije interleukina-6 v večjem delu posledica sprememb v mišicah.

Povezave med koncentracijami interleukina-6 in feritina pred in po obremenitvi nismo uspeli dokazati ( $P$  je v obeh primerih  $> 0,05$ ). Mogoče bi se povezavo lažje dokazalo z določanjem vmesnega člena, hormona hepcidina.

## SEZNAM OKRAJŠAV

Ab	.....protitelo
ACTH	.....adenokortikotropni hormon
Ag	.....antigen
AMPK	.....adenozin monofosfat aktivirajoča protein kinaza
APC	.....antigen predstavljajoče celice
ATP	.....adenozin trifosfat
ATPaza	.....adenozin trifosfataza
BSA.....	bovine serum albumin (goveji serumski albumin)
ELISA	.....encimsko imunsko metoda
IFN	.....interferon
IFN ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )	.....interferon alfa, beta, gama
IL.....	interlevkin
IL-(1, 2, ..)	.....interlevkin-1, 2...
IL-(1, 2, 6)R	..... receptor za interlevkin-1, 2, 6
IL-1RA	.....antagonist receptorja za interlevkin-1
IL-1 $\alpha$	.....interlevkin-1 alfa
IL-1 $\beta$	.....interlevkin-1 beta
LGLs	.....veliki granulirani limfociti
LIF.....	levkemijo inhibirajoči dejavnik
MAF	.....makrofage aktivirajoči dejavnik
MCV	..... povprečni volumen eritrocitov
mRNA	.....sporočilna ribonukleinska kislina
NADH	.....nikotinamid dinukleotid
NK	.....celice naravne ubijalke
PHK	.....poglavitni histokompatibilni kompleks
RIA	.....radioimunska metoda
Tc	.....citotoksične celice T
Th	.....celice T pomagalk
TNF	.....tumor nekrozirajoči dejavnik

TNFR .....topni receptorji za tumor nekrozirajoči faktor

VO<sub>2</sub>.....količina O<sub>2</sub>, ki jo organizem porabi v minuti

## UVOD

Povezavo med naporom, imunskim sistemom in vnetjem so odkrili že na začetku 20. stoletja, ko so opazili nenormalno povečanje nevtrofilcev v krvi maratonskih tekačev. Spremembe v beli krvni sliki so bile podobne nekaterim bolezenskim stanjem. Sklepali so, da se napor nad fiziološkimi mejami odraža v levkocitozi, podobno kot pri vnetju. Trideset let kasneje so ugotovili, da mišični napor zmanjša odpornost organizma in je predispozirajoči faktor za infekcijske bolezni (še posebno respiratorne infekcije). Vendar za postavitev teorije o odnosu med naporom in vnetjem še ni bilo dovolj eksperimentalnih podatkov (1).

Danes je znano, da nekajurna izpostavljenost naporu sproži procese naravne in pridobljene imunosti. Hkrati se aktivirajo pro- in anti- inflamatorni citokini, predvsem antagonisti receptorjev IL-6R in IL-1R.

### *Splošne značilnosti imunskega sistema*

Imunski sistem se je razvil kot obramba pred patogenimi elementi (npr. virusi, bakterije, toksini ipd). Njegova prvotna vloga je, da te tujke odstrani, hkrati pa zmanjša nastalo škodo v organizmu. Vsak imunski odziv vključuje najprej prepoznavo patogena oz. tujka, nato pa sledi njegovo uničenje. V grobem imunski odgovor delimo na naravni (prirojen) in specifični (pridobljen). Najpomembnejša razlika med njima je, da je pridobljen imunski odgovor visoko specifičen za točno določen patogen, in da si odgovore zapomni. Tako ob naslednjem stiku lahko prepreči izbruh bolezni.

Najpomembnejše celice imunskega odziva so levkociti, ki se delijo na limfocite, fagocite in pomožne celice (2).

Fagociti sodelujejo pri naravnem imunskem odzivu, mednje pa sodijo monociti, makrofagi in polimorfonuklearni nevtrofilci. Te celice se nespecifično vežejo na tujek in ga nevtralizirajo. Pri vnetju delujejo kot prva obrambna linija (2).

Naslednje pomembne celice levkocitov so limfociti, ki so značilni za pridobljeni imunski odziv. Specifično prepoznajo posamezni tujek. Delimo jih na T limfocite in B limfocite. Ko B limfociti prvič srečajo antigen, ki je specifičen za njihov receptor, se začnejo hitro razmnoževati. Diferencirajo se v mirujoče spominske celice B in efektorske celice B, ki se imenujejo plazmatke. Le-te izločajo v kri in mezgo velike količine protiteles (3). T

limfociti obsegajo širše območje delovanja. Nekateri nadzorujejo razvoj B limfocitov in produkcijo protiteles, drugi pomagajo fagocitom pri uničevanju tujkov. Del T limfocitov prepozna z virusom okužene celice in jih uniči (2).

V praksi pogosto pride do sodelovanja limfocitov in fagocitov. Npr. nekateri fagociti lahko »poberejo« antigeno in jih predstavijo T limfocitom, ki jih prepoznajo. Le-ti sprostijo topne faktorje (citokine), ki aktivirajo fagocite, ki nato uničijo patogen. Večina imunskih reakcij na infekcije je sestavljenih iz naravne in pridobljene imunosti. Na začetku okužbe prevlada naravni imunski odziv, nato pa limfociti začnejo aktivirati pridobljen imunski odgovor. Limfociti si zapomnijo patogen in zato ob naslednjem stiku z njim hitreje in bolj učinkovito odreagirajo (2).

**Citokini** so različne molekule, ki prenašajo signale med limfociti, fagociti in drugimi celicami imunskega sistema. Vežejo se s specifičnimi receptorji na membrani celice tarče in sprožijo signal, ki se prenese v notranjost celice in spremeni izražanje genov v njej. Na splošno se citokini vežejo na receptorje z močno afiniteto, zato lahko tudi posredujejo biološke učinke v pikomolarnih koncentracijah. Delujejo avtokrino in parakrino, redko endokrino (3). Vsi citokini so proteini ali peptidi, nekateri so lahko tudi glikozilirani (glikoproteini). Najpomembnejša lastnost citokinov je pleiotropnost (v različnih celičnih tarčah sproščajo različne biološke učinke). Delujejo lahko sinergistično ali pa antagonistično (3).

Delitev citokinov (3):

- Rastni faktorji
- Interferoni (IFN) so pomembni pri omejevanju širjenja določenih virusnih okužb. Nekateri interferone (IFN $\alpha$  in IFN $\beta$ ) izločajo z virusom okužene celice, medtem ko IFN $\gamma$  izločajo določene aktivirane T celice.
- Kemokini spodbudijo naključno gibanje (kemokinezo) in usmerjajo potovanje levkocitov (kemotakso). So zelo pomembni pri naravni imunosti.
- Interlevkini (IL)

### *Interlevkini*

Predstavljajo veliko skupino citokinov (IL1 – IL17), izločajo jih predvsem T celice, nekaj pa tudi mononuklearni fagociti in tkivne celice. Opravljajo različne naloge, večina pa jih

usmerja druge celice k delitvi in diferenciaciji. Vsak interlevkin deluje specifično na točno določene celice, ki imajo na površini izražen receptor za določen interlevkin (3).

### *Vnetje*

Vnetje je odziv ožiljenega tkiva na poškodbo ali draženje zaradi delovanja eksogenih in endogenih škodljivih dejavnikov (mikrobnih, fizikalnih ali kemičnih). Ne glede na vzrok tkivne okvare ji sledi sosledje tkivnih reakcij, ki na mestu okvare močno okrepijo obrambno zmožnost tkiva. Poveča se prekrvljenost tkiva, povečana prepustnost kapilar pa omogoči prehod zaščitnih makromolekul (protiteles, proteinov komplemента) iz žil v tkivo. Vnetni mediatorji povzročijo kopičenje obrambnih celic in njihovo aktivacijo (2).

Vnetje nadzirajo kemokini, encimski sistemi v plazmi, citokini in produkti mastocitov, trombociti ter levkociti. Ti mediatorji se med seboj ločijo glede na reakcijo, katero nadzirajo. Hitro delujoči mediatorji (npr. vazoaktivni amini) zato uravnavajo takojšnji odgovor. Ko na mesto vnetja prispejo levkociti, sprostijo mediatorje, ki uravnavajo akumulacijo in aktivacijo drugih celic, ki sodelujejo pri imunskem odgovoru (2).

Glede na čas trajanja vnetja ločimo akutno in kronično vnetje. Pri akutnem vnetju se v nekaj minutah po poškodbi tkiva razširijo žile, kar povzroči povečan dotok krvi na poškodovano mesto. Povečan volumen krvi povzroči vročino in rdečino. Poveča se tudi prepustnost žilja, zaradi česar se pojavi oteklina, v nekaterih primerih izstopijo levkociti, to pa povzroči nabrekanje in pordečitev tkiva. Ko tekočina izstopi iz krvnega obtoka, se aktivirajo kininski, strjevalni in fibrinolitični sistemi. Številne spremembe žilja, ki se pojavijo zgodaj pri akutnem vnetju, nastanejo zaradi neposrednega učinka plazemskih encimskih mediatorjev, kot so bradikinin in fibrinopeptidi (3).

Nekaj ur po nastanku teh vaskularnih sprememb se nevtrofilci prilepijo na endotelijske celice in potujejo iz krvi v tkivne prostore. Nevtrofilci fagocitirajo patogene mikrobe in sproščajo mediatorje, ki prispevajo k vnetju. Makrofagi prispejo 5-6 ur potem, ko se začne vnetni proces. Ti makrofagi so aktivirane celice, ki učinkovito fagocitirajo mikrobe, in izločajo mediatorje in citokine, ki sodelujejo pri vnetju (3).

Aktivirani makrofagi izločajo tri citokine (IL-1, IL-6 in TNF- $\alpha$ ), ki povzročijo številne lokalne in sistemske spremembe. Lokalno povečajo prepustnost žil in povzročajo strjevanje. IL-1 in TNF- $\alpha$  delujeta tudi na makrofage in endotelijske celice ter spodbujata



izločanje kemokina IL-8. Ta prispeva k vdoru nevtrofilcev, tako da okrepi njihovo pritrjevanje na žilne endotelijske celice in deluje močno kemotaktično. Tudi IFN- $\gamma$  in TNF- $\alpha$  aktivirata makrofage in nevtrofilce, okrepiata njihovo fagocitno aktivnost in pospešujeta sproščanje litičnih encimov v tkivne prostore (3).

Trajanje in jakost lokalnega vnetja sta skrbno nadzorovana, saj se tako omeji okvara tkiva hkrati pa se omogoči obnova tkiva, ki je bila potrebna, da se rana zaceli. Pri omejevanju vnetja in pri pospeševanju razmnoževanja je zelo učinkovit TNF- $\beta$ . Ta citokin pospešuje odlaganje zunajceličnega matriksa, ki je potreben za končno obnovo tkiva (3).

Kronično vnetje se razvije zaradi dolgotrajne prisotnosti antigena. Nekateri mikroorganizmi imajo npr. komponente celične stene, ki jim omogočajo, da se uprejo fagocitozi. To pa dostikrat povzroči nastanek kroničnega vnetja in obsežno okvaro tkiva. Kronično vnetje nastaja tudi pri številnih avtoimunskih boleznih, kjer lastni antigeni neprestano aktivirajo celice T. Zanj je značilno nakopičenje in aktivacija makrofagov. Citokini, ki jih sproščajo kronično aktivirani makrofagi, spodbujajo tudi razmnoževanje fibroblastov in nastanek kolagena. Na kraju kroničnega vnetja se razvije tudi fibroza, ki je značilna za celjenje ran (3).

Za razvoj kroničnega vnetja sta najpomembnejša citokina IFN- $\gamma$  in TNF- $\alpha$ . IFN- $\gamma$  ima številne pleiotropne aktivnosti, najpomembnejša pa je zmožnost, da aktivira makrofage. Le-ti so zelo učinkoviti pri predstavljanju antigena in pri uničenju znotrajceličnih patogenih mikrobov. Pri kroničnem vnetju nakopičenje aktiviranih makrofagov veliko prispeva k okvari tkiva. Te celice sproščajo hidrolitične encime in reaktivne kisikove in dušikove presnovke, kar povzroči okvaro okolnega tkiva (3).

#### *Imunski odziv organizma na športno aktivnost*

Težek telesni napor sproži tako proinflamatorni kot tudi antiinflamatorni odziv organizma. Kakšen bo odziv levkocitov je odvisno tako od intenzivnosti napora, kot tudi od njegovega trajanja, pri čemer pride do največjega porasta levkocitov pri visoko intenzivnem vzdržljivostnem naporu. Po 2,5 do 3 urah intenzivnega teka naj bi prišlo do zmerne porasta belih krvnih celic, 3 ure po teku naj bi dosegle vrh, nato pa bi se naslednji dan vrnile na normalno vrednost. Vrednost krvnih granulocitov se močno poveča, prav tako vrednost monocitov, medtem ko se število limfocitov zmanjšuje. Zniževanje limfocitov v

krvi traja najmanj 6 ur (predvsem na račun celic T in NK celic, ne pa celic B) (1). Zanimivo je, da so najbolj odgovorne celice za spremembe, ki nastanejo v krvi po naporu, celice naravnega imunskega odgovora, in sicer NK celice in nevtrofilci (1).

Pri naporu pride tudi do sprememb v koncentraciji stresnih hormonov in citokinov, spremeni se telesna temperatura, poveča se pretok krvi in pride do dehidracije. Po dolgotrajnem teku pri visoki intenzivnosti se opazno poveča koncentracija kortizola v krvi. Kortizol je povezan z mnogimi imunosupresivnimi spremembami, do katerih pride med okrevanjem (5). Dokazano je, da glukokortikoidi povzročijo nevtrofilijo, eozinopenijo, limfopenijo in supresijo funkcije NK in T celic. Kortizol ima katabolično delovanje in v adipoznih celicah stimulira lipolizo, poveča degradacijo proteinov ter zmanjša njihovo sintezo v mišicah. To povzroči povečano sproščanje lipidov in aminokislin v krvni obtok (6). Do vseh teh sprememb pride med okrevanjem po dolgi visoko intenzivni kardiorespiratorni vadbi (5).

Takoj po vzdržljivostnem naporu se prične izločati noradrenalin. Čeprav ima pomembno vlogo pri usmerjanju limfocitov v kri pri krajši intenzivni vadbi (manj kot 90 min), se njegov učinek s trajanjem vadbe in naraščanjem koncentracije kortizola zmanjšuje. Po daljšem vzdržljivostnem naporu tako prevladajo učinki kortizola (4). Ugotovili so tudi, da noradrenalin le delno vpliva na povišano koncentracijo IL-6 med vadbo (7).

Nevtrofilci in monociti imajo pomembno vlogo pri naravnem oziroma nespecifičnem imunskem odgovoru. Ti fagociti predstavljajo prvo obrambno linijo pri odstranitvi tujkov in tudi pri vnetjih v mišicah, ki so posledica napora. Funkcija nevtrofilcev in monocitov se lahko meri kot zmožnost odstranitve patogenov (fagocitoza) in sposobnost njihovega uničenja (oksidativni izbruh) (1).

NK celice predstavljajo veliki granulociti, ki uravnavajo citolitične reakcije proti različnim neoplastičnim in z virusom okuženim celicam. Imajo tudi necitolitične funkcije, lahko inhibirajo kolonizacijo mikrobov in rast določenih virusov, bakterij, gliv in parazitov. Pri testiranju maratoncev so opazili, da so bile vrednosti NK celic pred aktivnostjo močno povečane v primerjavi s kontrolno skupino, ki ni bila fizično aktivna, nato pa so se po aktivnosti (tek) zopet vrnile na normalno vrednost (nižjo kot pred aktivnostjo). Padeč vrednosti NK celic v krvi je povezan s prerazporeditvijo teh celic iz krvi v tkiva, kar je posledica vpliva kortizola. Ni še razjasnjeno, kam te celice potujejo in ali je njihovo znižanje pokazatelj dogajanja v drugih limfatičnih tkivih (1).

Bruunsgaard in sod. (8) so preiskovali učinek tekmovanja v triatlonu (srednji čas aktivnosti 6,5 ur) na in vivo celično uravnano imunost. Uporabili so kožni test s štirimi antigeni. Pozna preobčutljivostna reakcija je bila zavrneta (60%) v primerjavi s kontrolno skupino, ki ni bila aktivna, 2 dni po koncu tekmovanja. To je bila prva raziskava, ki je pokazala, da težek telesni napor zmanjša in vivo celično uravnano imunost (7).

Antigeni histokompatibilnega kompleksa (PHK) so nujno potrebni pri reakcijah imunskega prepoznavanja. Antigeni PHK razreda I so pomembni pri samopredstavljanju citotoksičnim celicam T, medtem ko so antigeni PHK razreda II vezani na antigen predstavljajoče celice (makrofagi) in pomagajo pri procesu celično uravnanega imunskega odgovora. Woods in sod. so dokazali, da izčrpljujoča vadba (2-4 ure na dan, 7 dni) signifikantno zavira ekspresijo PHK II na makrofagih, kar je deloma lahko posledica izločenega kortizola (7). Ugotovili so, da težek telesni napor zavira ekspresijo PHK II na makrofagih, negativno vpliva na proces predstavljanja antigena T limfocitom in na njihovo zmožnost, da se odzovejo na antigenski izziv.

Pomembna naloga imunskega sistema je tudi izdelava topnih komponent, še posebno imunoglobulinov. Protitelesa izdelujejo plazmatke in B limfociti kot odziv na antigen. Nekaj raziskovalcev se je ukvarjalo z merjenjem sposobnosti humoralnega imunskega sistema, da izdelata protitelesa kot odgovor na antigen izzvan z napornim treningom, vendar niso našli signifikantne povezave (1). Ugotovili so, da zmanjšanje imunskega odziva po težkem naporu ne vpliva dolgoročno na humoralni imunski sistem.

Težek telesni napor povzroči oteklost in poškodbe mišic. Začne se odziv na poškodbo, za katerega je značilno premik tekočine, plazemskih proteinov in levkocitov na poškodovano območje in v metabolno aktivna tkiva. Med sabo sinergistično sodelujejo tumor nekrozirajoči faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL-1, IL-6 in interferoni. Pretirani vnetni odziv preprečijo različni mehanizmi, med katere sodijo produkcija antiinflamatornih citokinov (IL-1R, IL-4 in IL-10) in nekaterih mediatorjev, npr. prostaglandina E<sub>2</sub>. Proinflamatorni citokini aktivirajo tudi hipotalamus-hipofiza-adrenalno os in simpatoadrenergični sistem, kar izzove močno antiinflamatorno delovanje (1).

Veliko študij (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15) je dokazalo, da intenzivna telesna vadba (1 uro ali več), poveča krvne koncentracije IL-6, IL-1 $\beta$  in TNF- $\alpha$ . Izzove tako pro-, kot antiinflamatorne procese.

Spremembe, ki jih v imunskem sistemu povzroči težek fizičen napor (1):

- Nevtrofilija in limfopenija
- Povišane vrednosti krvnih granulocitov in monocitov (fagocitoza)
- Zmanjšanje oksidativnega izbruha granulocitov
- Zmanjšanje citotoksične aktivnosti NK celic
- Zmanjšana ekspresija PHK II na makrofagih
- Povišane vrednosti pro- in antiinflamatornih citokinov
- Povišana vrednost kortizola
- Zmanjšan odziv pri pozni preobčutljivostni reakciji

#### *Vpliv športne aktivnosti na vrednosti interleukina-6*

Interleukin-6 je multifunkcionalen citokin s širokim spektrom bioloških aktivnosti. Sodeluje pri eritropoezi, uravnava odgovor imunskega sistema in razvoj reakcij akutne faze. Nedavno so dokazali, da ima IL-6 tudi metabolno vlogo pri hormonih, v jetrih uravnava sproščanje glukoze ter pospešuje lipolizo. Učinek IL-6 se pojavi, ko se IL-6 veže na receptor za IL-6 (IL-6R) in je odvisen od števila receptorjev; tako topnih, kot tudi na membrano vezanih IL-6R (15).

Pri telesni aktivnosti eksponentno narastejo plazemske vrednosti IL-6 in so povezane z intenzivnostjo napora, trajanjem, deležem aktivnih mišic in posameznikovo vzdržljivostno kapaciteto (14). Raziskave v zadnjih letih so pokazale, da je ekspresija IL-6 mRNA odvisna od kontrakcije skeletne mišice, in da se transkripcija gena za IL-6 pri naporu močno poveča (11). Protein IL-6 nastaja v kontrakcijskih mišičnih vlaknih, med naporom pa se v velikih količinah izloča v kri.

Manjša kot je koncentracija mišičnega glikogena pred naporom, večja je transkripcijska aktivnost gena za IL-6. Vrednost mišičnega glikogena pred naporom je pomemben modulator ekspresije gena za IL-6 (10,11).

Večina IL-6, ki se izloča med telesnim naporom, nastane v mišičnih vlaknih. Povečana koncentracija kateholaminov, ki se izločijo med naporom, zato ni odgovorna za povišanje koncentracije citokinov (7). H. Bruunsgaard in sod. so tudi dokazali, da ekscentrična vadba, v primerjavi s koncentrično, ni povzročila znatnega povečanja krvnih monocitov in nevtrofilcev. Zato tudi te celice ne morejo biti odgovorne za povišano koncentracijo IL-6 v krvi (9).

Visoko intenzivna ekscentrična vadba povzroči višje plazemske vrednosti IL-6 kot koncentrična vadba, čeprav je pri prvi poraba kisika manjša. To je verjetno posledica mišičnih poškodb in vnetnih reakcij v skeletnih mišicah, ki nastanejo pri ekscentrični vadbi (9).

Med naporom morajo skeletne mišice povečati privzem glukoze in prostih maščobnih kislin, da dobijo dovolj energije in zapolnijo glikogenske zaloge. Kot »energijski senzor« se aktivira IL-6 in mobilizira ekstracelularne substrate. IL-6 pospeši lipolizo in poveča oksidacijo maščob, ne da bi se zvečala vrednost triacilglicerola. Med telesno vadbo uravnava tudi homeostazo glukoze. IL-6 lahko aktivira encim adenozin monofosfat aktivirajočo protein kinazo (AMPK) v mišici in adipoznem tkivu. Rezultat je povečana produkcija ATP, oksidacija maščobnih kislin, transport glukoze in glikoliza (16).

IL-6 je znan kot vnetni citokin, vendar ima tudi protivnetne in imunosupresivne učinke. Stimulira pituitarno-adrenalno os, inhibira sintezo TNF- $\alpha$  in stimulira produkcijo IL-10, IL-1R in topnih receptorjev za TNF (TNFR). Že blaga fizična aktivnost (30 min) uravnava protivnetno delovanje v skeletnih mišicah in v maščobnem tkivu. S tem se zmanjša tveganje za nekatere bolezni, kot so srčno žilne bolezni, sladkorna bolezen tipa II in kronična obstruktivna pljučna bolezen, ki so povezane s kroničnimi vnetji (16). IL-6 inducira protivnetni odgovor in zavira produkcijo tumor nekrozirajočega faktorja  $\alpha$ , zato je pri vnetnih reakcijah kritično razmerje med tema dvema mediatorjema, ki odloča do kakšne stopnje se bo vnetje razvilo.

Za interlevkin-6 je znano, da povzroča rezistenco na inzulin, hkrati pa se med telesno aktivnostjo, ko se izločajo večje količine IL-6 v krvni obtok, poveča občutljivost na inzulin. Izsledki raziskav, ki so se ukvarjale s povezavo IL-6 in občutljivosti na inzulin, so si zelo nasprotujoči. To je verjetno zaradi ravno obratnega učinka IL-6 na celice v jetrih, kot na celice v skeletni mišici. V skeletni mišici IL-6 poveča sintezo glikogena v prisotnosti inzulina ter zmanjša z inzulinom stimulirani privzem glukoze (16).

## *Vpliv športne aktivnosti na koncentracijo železovih ionov v krvi*

Železovi ioni v organizmu so nujno potrebni kot sestavni del hemoglobina in mioglobina, beljakovin, ki prenašata kisik. Prisotni so tudi v drugih encimih, ki vsebujejo hem (del hemoglobina, ki veže kisik), npr. citokromih, katalazah in peroksidazah, ali v nekaterih encimih brez hema, npr. NADH in sukcin dehidrogenazi. Vsi ti encimi so pomembni pri mišičnem metabolizmu. Celotna količina železa v telesu je od 3 do 5 gramov in je izražena v različnih oblikah kot (17):

- Aktivno železo (hemoglobin 67%, mioglobin 3,5%, encimi in proteini 0,2%)
- Transportno železo (transferin 0,08%)
- Zaloge železa (hemosiderin-feritin 27%)
- Labilni del (2,2%)

Železovi ioni se absorbirajo večinoma v dvanajstniku. Količina absorbiranih ionov železa je točno določena s količino zalog v telesu. Ob prehodu skozi intestinalno sluznico se vežejo na protein apoferitin. Nasičenost in koncentracija transferina (prenašalni protein) pogojujeta količino absorbiranih železovih ionov. Absorpcija je odvisna od biološke uporabnosti, oziroma oblike v kateri se nahajajo železovi ioni. Najbolje se absorbira  $Fe^{2+}$  ion v hemu (10% do 37%), ki se nahaja v mesu, medtem ko se  $Fe^{3+}$  ion, ki ga zaužijemo z zelenjavo, absorbira v veliko manjši meri (manj kot 10%). Absorpcija obeh oblik pa je odvisna tudi od drugih prisotnih snovi, npr. fitatov, oksalatov, taninov in karbonatov.

Razvoj pomanjkanja železovih ionov pri športnikih kaže na njihovo negativno bilanco. Leta se lahko razvije kot neravnovesje med vnosom in porabo, zaradi povečanih izgub železovih ionov ali zaradi kombinacije obeh vzrokov (17).

Trening poveča tako število encimov, kot tudi maso v mišicah. Posledično se povečajo zahteve organizma po železovih ionih, še posebno v začetku sezone, med pripravljalnimi obdobjem.

Dokazano je, da je absorpcija železa pri športnikih slabša kot pri ne-športnikih. Do tega naj bi prišlo, ker hrana pri športnikih potuje hitreje skozi gastrointestinalni trakt in zato, ker je nasičenost transferina med obdobji treningov povišana, to pa povzroči počasnejše sproščanje železovih ionov iz mukoznih celic (20).

Izgube železovih ionov so lahko:

- Gastrointestinalne; v fecesu se po daljšem napornem teku lahko pojavi hemoglobin, vendar naj bi na to vplivalo več faktorjev, npr. tudi uporaba nesteroidnih protivnetnih zdravil
- Urinarne; pri napornem teku naj bi prišlo tudi do hematurije (pojav krvi v urinu), do tega lahko pride zaradi renalne ishemije ali povečane filtracije proteinov skozi glomerulno membrano. Lahko se pojavi tudi hemoglobinurija (pojav hemoglobina v urinu), ko je količina hemoglobina, ki se sprosti pri hemolizi, večja od vezalne kapacitete haptoglobina, ki veže sproščeni hemoglobin.
- Perspiratorne; raziskave še niso potrdile, da bi se večje količine železovih ionov izločale s potom. Koncentracija železovih ionov v potu je odvisna od mnogih faktorjev, npr. dela telesa, kjer se je vzel vzorec pota, ali je v potu veliko celic ali ne in od časa med treningom, ko se je vzel vzorec, saj koncentracija železovih ionov med treningom po prvih 30 minutah začne padati. Delež železovih ionov v potu je odvisen tudi od nasičenosti transferina.

Razpoložljivost železovih ionov se pri športnikih lahko zmanjša, kljub temu da so zaloge ostale nespremenjene. Pri vzdržljivostnih športnikih pogosto pride do intravaskularne hemolize, vendar ne v takšni meri da bi se pojavila akutna anemija. Sproščeni hemoglobin se veže na haptoglobin in nastane kompleks hemoglobin-haptoglobin, katerega nato razgradijo hepatociti v jetrih. Nastali hem se zopet porabi pri eritropoezi novonastalih eritrocitov, vendar je ta proces počasnejši kot propadanje eritrocitov. Pri metabolizmu železovih ionov sodelujejo tudi vitamin B12, folati in baker. Ob pomanjkanju bakra se zmanjša koncentracija njegovega prenašalnega proteina ceruloplazmina in posledično se upočasni metabolizem železovih ionov.

Pomanjkanje železovih ionov je veliko bolj izraženo pri ženskih športnicah. To ni posledica zgolj večjih izgub zaradi menstruacijskega cikla, ampak tudi zaradi nezadostnega vnosa. Dnevni vnos kalorij je pogosto manjši od zahtev organizma, pa tudi oblika železovih ionov je pretežno ne-hemska (zelenjava), kar oteži absorpcijo. V primerjavi z moškimi, ženske izločajo večjo količino železovih ionov s potom, medtem ko so njihove zaloge pogosto nižje (18).

Pri vrednotenju koncentracije železovih ionov v telesu merimo vrednosti hemoglobina, MCV (povprečni volumen eritrocitov), celotno serumsko železo, celotno vezavno kapaciteto za železove ione, serumski feritin in protoporfirin. Fizična aktivnost lahko vpliva na te rezultate (pride do hemokoncentracije), zato se izogibamo merjenju takoj po treningu.

Pri homeostazi železa igra ključno vlogo hormon **hepcidin**, ki nastaja v jetrih (20). Nedavne raziskave so pokazale, da hepcidin inhibira intestinalno absorpcijo železovih ionov in sproščanje »recikliranih« železovih ionov iz makrofagov. Prav tako zmanjša dostavo železovih ionov razvijajočim se eritrocitom v kostnem mozgu (21). Nasprotno pa manjša produkcija hepcidina povzroči povečano absorpcijo železovih ionov v intestinalnem traktu (zmanjša se inhibicija), lahko pa pride tudi do hemokromatoze. Dokazali so, da pri transgenih miših preveč izraženi hepcidin-1 blokira transplacentni in intestinalni transport železovih ionov. Te miši bi pri porodu umrle zaradi resnega pomanjkanja železovih ionov, razen če jim ne bi parenteralno dodali njihov nadomestek (21).

### *Fiziologija pri veslačih*

Veslanje je šport pri katerem je udeleženo celo telo. Zavesljaj je odvisen od močne ekstenzije nog, nato trupa in na koncu rok. Pri rokah ni bistvena moč temveč tehnika stika vesla z vodo. Pospeševanje čolna je odvisno od moči in frekvence zavesljajev (23).

Profesionalni veslači so v primerjavi z drugimi vztrajnostnimi športniki bolj visoki in težji. Imajo dolge ude, še posebno zgornje okončine. Po podatkih iz leta 1992 naj bi povprečen veslač na olimpijadi tehtal 88kg in bil visok 1,92m z 8,7% telesne maščobe.

Nekaj podatkov, ključnih za razumevanje fiziologije pri veslačih je navedenih v razpredelnici 2 (23).



Razpredelnica 2: simuliran kompetitivni test 2000m na ergometru, podatki ameriške olimpijske veslaške ekipe leta 1992 (23).

Število oseb	Moč (watt)	Utrip/min	VO <sub>2</sub> (L/min)	VO <sub>2</sub> (ml/kg/min)	Laktat(mmol/L)
35	467	189	6.25	70.9	17.4

Pri treniranih veslačih je maksimalna aerobna kapaciteta približno 1,75- krat višja kot pri netreniranih vrstnikih. V primerjavi z vrhunskimi smučarskimi tekači (VO<sub>2</sub> 86,7 (ml/kg/min)) pa najboljši veslač dosega 8-10% nižje vrednosti v maksimalni aerobni kapaciteti. Približno 85% vložene energije med tekmo (2000m) se porabi aerobno, ostali del pa anaerobno. Aerobna kapaciteta je odvisna od funkcije dihalnega in srčno-žilnega sistema, sestave krvi, kapilarizacije mišic in sposobnosti mišičnih celic za privzem in izrabo kisika. Težava aerobnega pridobivanja energije je njegova počasnost med visoko intenzivnostjo. Med vsemi načini pridobivanja energije v telesu v določenem časovnem intervalu proizvede najmanj energije. Zato se ob povečani intenzivnosti veslanja vklopijo anaerobni mehanizmi (anaerobna glikoliza) (23).

Tako kot pri drugih vztrajnostnih športnikih (tekačih, smučarskih tekačih in kolesarjih) tudi pri veslačih v mišicah nog prevladujejo mišična vlakna tipa I (počasna mišična vlakna). Le-ta potrebujejo po aktivaciji relativno daljši čas za doseg maksimalne napetosti (cca. 80ms) v primerjavi s 30 ms, ki so potrebne za razvoj maksimalne sile po aktivaciji tipa II vlaken. Ta razlika naj bi bila posledica relativno nizke aktivnosti miozin ATPaze, ki katalizira odcep zadnjega fosfata iz molekule ATP, manjše kalcijeve aktivnosti regulatornega proteina troponina in počasnejšega privzemanja kalcija v sarkoplazemski retikulum. Posledica tega je večja odpornost tipa I mišičnih vlaken na utrujanje. Biokemične razlike dveh osnovnih tipov vlaken grede predvsem na račun razlik v njihovi kapaciteti za oksidativne in glikolitične aktivnosti. 40-50% veslačev naj bi imelo okoli 70% mišičnih vlaken tipa I, nekateri uspešnejši celo do 85%. Preostala vlakna so večinoma tipa IIa, medtem ko vlaken tipa IIb skoraj ni. Prisotnost večjega števila vlaken tipa IIb (hitra vlakna z malo mitohondrijev) naj bi bila pokazatelj nezadostnih let treninga ali nezadostne intenzivnosti treningov. Z leti intenzivnega treninga se hitra IIb vlakna spremenijo v hitra IIa vlakna, ki so bolj odporna na težje napore (23).

Pri vrhunskih veslačih je gostota mitohondrijev povišana, izražena je kot razmerje mitohondrijev na površino mišičnih vlaken. Ta prilagojenost je opažena tako pri počasnih

kot pri hitrih mišičnih vlaknih. Meritve oksidativne encimske aktivnosti so pokazale visoke koncentracije teh encimov v aktivnih mišicah veslačev. Čeprav pa se koncentracija encima laktat dehidrogenaza, ki označuje glikolitično aktivnost (faktor pri anaerobni kapaciteti), med skupinami veslačev ne razlikuje. Gostota kapilar v mišici je pri veslačih 2-krat višja kot pri netreniranih vrstnikih. Vse te značilnosti prispevajo k večji delovni kapaciteti in manjšem nastajanju laktata med visoko intenzivnostjo. Večja gostota kapilar tudi poveča odstranjevanje nastalega laktata v aktivnih mišicah (23).

#### *Metode določanja interleukina-6*

Analizne metode določanja interleukina-6 temeljijo na vezavi protitelesa (Ab) z antigenom (Ag) in jih imenujemo imunokemijske metode. Pri vezavi pride do različnih nekovalentnih interakcij med antigensko determinanto in variabilno regijo protitelesne molekule. Visoka specifičnost teh reakcij je omogočila razvoj različnih imunskih preskusov, ki jih lahko uporabimo za določevanje navzočnosti protiteles ali antigena. Za določevanje IL-6 se najpogosteje uporabljajo tri metode z različnimi označevalci:

1. izotop – radioimunski test (RIA)
2. encim – encimsko imunski test (ELISA)
3. izoluminol – kemiluminiscenčni test

#### *Metode določanja feritina*

Določanje feritina poteka z imunoturbidimetrično metodo za kvantitativno določanje feritina v serumu na analizatorju OLYMPUS OSR6150. Feritin v serumu je občutljiv indikator zaloga železa v telesu. Uporaben je za razlikovanje pomanjkanja železa in anemije zaradi kroničnih bolezni, ker je pri slednjem njegova vrednost povečana. Vrednost serumskega feritina manj kot 10 µg/l skoraj vedno indicira pomanjkanje železa. Serumski feritin je tudi povečan pri ostalih anemijah, vključno z aplastično anemijo, sideroblastno anemijo in kronično hemolitično anemijo. Pri idiopatični hemokromatozi in pri bolnikih, ki so prestali večkratno transfuzijo so lahko vrednosti serumskega feritina ekstremno povišane.

## NAMEN DELA

V diplomski nalogi bomo poskušali ugotoviti povezavo med koncentracijo feritina in koncentracijo interlevkina-6 v mirovanju in po naporu. Glede na to, da pri visoki fizični aktivnosti pride v organizmu do vnetnih sprememb, in da sta tako feritin kot IL-6 z njimi povezana, pričakujemo med koncentracijama feritina in IL-6 določeno povezavo. Če IL-6 stimulira izločanje hepcidina, le-ta pa zavira absorpcijo železovih ionov iz prebavil, pričakujemo negativno povezavo.

Prav tako bomo poskušali ugotoviti, kako sama fizična aktivnost vpliva na koncentraciji feritina in interlevkina-6. Kot je predstavljeno že v uvodu, med aktivnostjo v mišičnih vlaknih nastaja IL-6, zato pričakujemo zvišanje koncentracije IL-6 v krvi po naporu.

Testirali bomo krvne vzorce profesionalnih športnikov pred naporom in po njem ter statistično analizirali rezultate.

## MATERIALI IN METODE

**Testni protokol:** vsi merjenci so po začetnem 15 minutnem ogrevanju nizke intenzivnosti (hitrost na veslaškem ergometru nižja od začetne hitrosti pri testu) opravili 9 minutni stopnjevani kontinuirani test na veslaškem ergometru, ki je bil prilagojen posameznikovim sposobnostim. Intenzivnost obremenitev je bila določena s predhodnimi testiranjmi, s katerimi se je določil povprečni čas na 500 m, pri katerem vrednosti laktata v veslačevi krvi dosežejo 4 mmol (AP). Veslač v prvih treh minutah testa vozi s hitrostjo, ki ustreza določenemu času za 4 mmol laktata v krvi + 9 sekund (AP+9s), naslednje 3 minute z AP+6 sekund, nato dve minuti na AP+3 sekunde, v zadnji minuti pa s hitrostjo AP. Fiziološke spremenljivke so bile izmerjene z Oxyconom Beta ter EKG aparatom, kjer so se vrednosti beležile ves čas testa ter prvih 8 minut po končanem testu. Kri za analizo je bila odvzeta iz ušesne mečice pred začetkom ogrevanja in 5 minut po koncu obremenitve.

### *Določanje interleukina-6*

#### **Radioimunski test**

Sodi med najbolj vsestranske in najbolj občutljive teste za merjenje antigenov in haptenov. Izmerimo lahko izredno majhne količine do  $10^{-12}$ g, zato je ta tehnika primerna za kvantitativno določevanje hormonov, serumskih proteinov, zdravil in vitaminov. Pri njem uporabljamo radioaktivno zaznamovane antigene in haptene (2).

Načelo RIA je tekmovanje radioaktivno zaznamovanega antigena ( $Ag^+$ ) in nezaznamovanega antigena ( $Ag$ ) za določeno količino močno afinitetnih protiteles.  $Ag^+$  zmešamo s protitelesi, nato dodajamo čedalje večje količine nezaznamovanega antigena neznane koncentracije. Protitelo ne loči med zaznamovanim in nezaznamovanim antigenom. Tako obe vrsti antigena tekmujeta za razpoložljiva vezišča na protitelesih. Naraščajoče koncentracije  $Ag$  izrinejo vedno več zaznamovanega antigena z vezišč. Z merjenjem količine prostega  $Ag^+$  v raztopini lahko določimo koncentracijo  $Ag$ . Čim več radioaktivno zaznamovanega antigena se veže s protitelesi, tem manjša je količina antigena v preiskovanem vzorcu (2).

Ena najpomembnejših stopenj pri radioimunskem testu je ločitev vezanega in nevezanega (prostega) antigena. Razvili so različne metode s katerimi odstranimo kompleks, nato pa izmerimo količino prostega zaznamovanega antigena v supernatantni tekočini.

Umeritveno krivuljo naredimo z nanašanjem odstotkov vezanega zaznamovanega antigena nasproti znanim koncentracijam nezaznamovanega antigena. Iz nje lahko določimo koncentracijo neznanega (preiskovanega) antigena.

Razvili so več metod, imenovanih RIA trdne faze, kjer je ločevanje kompleksa Ag-Ab od nevezanega antigena lažje. Pri eni metodi se veže protitelo kovalentno na delce, sefaroze. Količino radioaktivno zaznamovanega antigena, vezanega na delce, lahko kvantitativno izmerimo, ko delce centrifugiramo in speremo.

Pri drugem načinu imobiliziramo protitelo na polistiren ali polivinilklorid in izmerimo količino prostega zaznamovanega antigena v števcu gama. Protitelesa lahko imobiliziramo na stene mikrotitrskih jamic. Ta postopek je zelo primeren za določevanje koncentracij določenega antigena v številnih vzorcih in se veliko uporablja kot presejalni test glede na navzočnost virusa hepatitis B (2).

### **Encimsko imunski test (ELISA)**

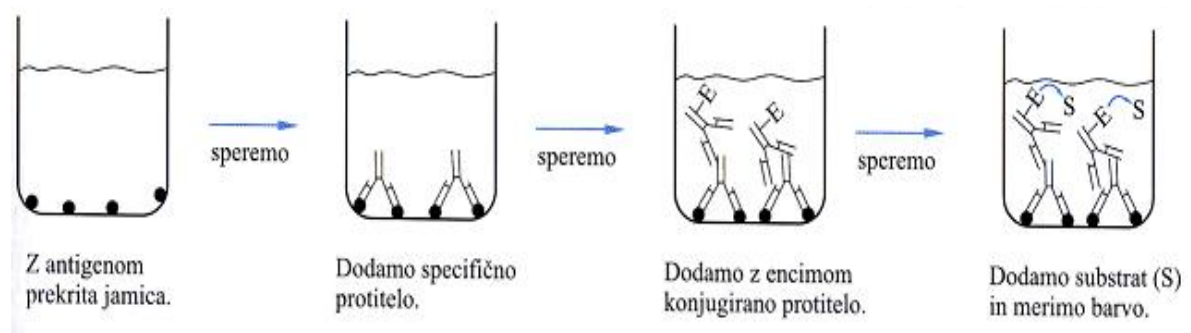
Za analizo vzorca z IL-6 smo uporabili encimsko imunski test (ELISA). Načelo encimsko imunskega testa, imenovanega ELISA je podobno načelu RIA z razliko, da tu uporabimo encim namesto radioaktivne oznake. Encim, konjugiran s protitelesom, reagira z brezbarvnim substratom, pri čemer nastane obarvan produkt. Pri ELISA uporabljamo različne encime, npr. alkalno fosfatazo, peroksidazo in p-nitrofenil fosfatazo. Če te encime pomešamo s primernim substratom, dobimo obarvan reakcijski produkt. Testi ELISA so približno enako občutljivi kot RIA in imajo prednost, da so varnejši in cenejši (2).

Razvili so številne variante ELISA, s katerimi lahko kvalitativno in kvantitativno določimo protitelesa ali antigene. Pripravimo umeritveno krivuljo z znanimi koncentracijami protiteles ali antigena, iz katere lahko razberemo neznano koncentracijo v vzorcu.

Protitelesa lahko odkrijemo in kvantitativno določimo z indirektnim ELISA. Serum ali kak drugi vzorec, v katerem je primarno protitelo, damo v mikrotitrsko jamico, prekrito z antigenom, in pustimo, da reagira z vezanim antigenom. Ko speremo nevezana protitelesa, določimo vezana protitelesa z dodajanjem z encimom konjugiranega sekundarnega antiizotipskega protitelesa (Ab<sub>2</sub>), ki se veže s primarnim protitelesom. Prosta Ab<sub>2</sub> speremo in dodamo substrat za encim. Obarvani produkt reakcije merimo v posebnem, v ta namen

pripravljenem spektrofotometru za merjenje v mikrotitrskih ploščicah, ki lahko izmeri absorbanco 96 jamic v manj kot eni minuti. Indirektno ELISA so izbrali za ugotavljanje serumskih protiteles proti človeškemu virusu imunske pomanjkljivosti (HIV), povzročitelju AIDS-a (2).

Antigene, ki imajo več epitopov, lahko določimo kvantitativno s sendvič ELISA. Pri tej tehniki imobiliziramo v mikrotitrski jamici protitelo, ne antigena. Dodamo vzorec, ki vsebuje antigen, in pustimo, da reagira z vezanimi protitelesi. Ko speremo jamico, dodamo drugo z encimom vezano protitelo, specifično za drug epitop na antigenu, in pustimo, da reagira z vezanim antigenom. S spiranjem nato odstranimo prosto drugo protitelo, dodamo substrat in izmerimo obarvan produkt reakcije (2) (slika 3).



Slika 3: Določevanje protiteles z indirektnimi ELISA (2).

**Reagenti:**

- mikrotitrski ploščica z monoklonskimi protitelesi za IL-6 (murin)
- biotin-konjugat (anti-IL-6 monoklonsko protitelo)
- IL-6 standard, liofiliziran (prilagojen mednarodnim standardom (NBSB 88/514))
- streptavidin-HRP
- kontrola z nizko koncentracijo humanega IL-6
- kontrola z visoko koncentracijo humanega IL-6
- pufer za spiranje, 20x koncentrat (PBS z 1% Tween 20)
- pufer za analizo, 20x koncentrat (PBS z 1% Tween 20 in 10% BSA)
- raztopina substrata
- stop raztopina (1M fosforna kislina)
- barvila (Blue-Dye, Green-Dye, Red-Dye)

**Pogoji shranjevanja:**

Vsi reagenti razen kontrol se shranjujejo pri temperaturi 2-8°C. Takoj po končani analizi jih je potrebno vrniti na prvotno temperaturo.

**Materiali:**

- 5 ml in 10 ml polnilne pipete
- 10 µl do 1,000 µl merilne mikropipete
- 50 µl do 300 µl merilne mikropipete
- primerna aparatura (Personal LAB ADALTIS)

**Aparatura:**

- Personal LAB ADALTIS

**Priprava reagentov:****1. Pufer za spiranje**

Če so v koncentratu za pripravo pufera za spiranje nastali kristali, jih je potrebno rahlo segreti, dokler se popolnoma ne raztopijo.

Celotno vsebino koncentrata (50mL) zlijemo v 1000 mL posodo, nato z destilirano ali deionizirano vodo dopolnimo do oznake. Počasi premešamo, da se izognemo penjenju. pH končne raztopine moramo uravnati na 7,4.

Vsebino prelijemo v čisto steklenico in shranimo pri 2°-25°C. Tako pripravljen pufer za spiranje je stabilen 30 dni. Pred uporabo ga razredčimo glede na število mikrotitrskih jamic.

Razpredelnica 3: Priprava pufera za spiranje.

Število mikrotitrskih jamic	Koncentrat pufera za spiranje (mL)	Destilirana voda (mL)
1-6	25	475
1-12	50	950

## 2. Puffer za analizo

Dobro zmešamo vsebino koncentrata (PBS z 1% Tween 20 in 10% BSA) , 5mL, nato jo dodamo k 95 mL deionizirane vode in previdno zmešamo, da se izognemo penjenju. Shranimo pri 2-8°C največ 30 dni. Pred uporabo ga razredčimo glede na število mikrotitrskih jamic.

Razpredelnica 4: Priprava pufra za analizo.

Število mikrotitrskih jamic	Koncentrat pufra za analizo (mL)	Destilirana voda (mL)
1-6	2,5	47,5
1-12	5,0	95,0

## 3. Priprava biotin-konjugata

Biotin-konjugat zmešamo s pufrom za analizo glede na potrebe.

Razpredelnica 5: Priprava biotin konjugata.

Število mikrotitrskih jamic	Biotin-konjugat (mL)	Pufer za analizo (mL)
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

## 4. Priprava streptavidin-HRP

Raztopino koncentrata razredčimo v razmerju 1:200 glede na naslednjo razpredelnico.

Razpredelnica 6: Priprava streptavidin-HRP

Število mikrotitrskih jamic	Streptavidin-HRP (mL)	Pufer za analizo (mL)
1-6	0,03	5,97
1-12	0,06	11,94

## 5. Priprava IL-6 standarda

Standard pripravimo z dodatkom destilirane vode v skladu z navedeno količino na viali, nato previdno zmešamo, da zagotovimo popolno in homogeno raztapljanje.



## 6. Priprava kontrol

V vsako vialo z oznako IL-6 kontrola dodamo 300  $\mu$ L destilirane vode in previdno zmešamo, da dobimo popolno in homogeno raztopino. Nato ravnamo s kontrolami enako kot z vzorci za analizo.

### ***Omejitve analize:***

- delovni pogoji se lahko razlikujejo od analize do analize, zato moramo vsakič narediti novo standardno krivuljo
- na rezultat lahko vpliva bakterijska ali glivična kontaminacija vzorcev ali reagentov, ali navzkrižna kontaminacija med reagenti
- ves material, ki se uporablja pri analizi mora biti steril
- neprimerno oziroma nezadostno spiranje na katerikoli stopnji lahko pokaže lažno pozitiven ali lažno negativen rezultat
- uporaba imunoterapije je močno povečala število pacientov s protitelesi HAMA (Human anti-mouse IgG antibody), ki lahko vplivajo na razpoložljivost murinskih monoklonskih protiteles in dajo lažen pozitiven ali lažen negativen rezultat analize

### ***Občutljivost analizne metode:***

Limita detekcije IL-6 je definirana kot koncentracija analita, katerega absorpcija je signifikantno večja kot absorpcija razredčene raztopine. Limita detekcije znaša 0,92 pg/mL, kar je povprečje meritev koncentracij šestih neodvisnih analiz.

### ***Ponovljivost metode***

#### 1. Znotraj analize:

Ponovljivost znotraj analize je bila ocenjena glede na dva neodvisna eksperimenta. Vsaka analiza se je izvedla s šestimi ponovitvami osmih vzorcev, ki so vsebovali različno koncentracijo IL-6. Podatki v razpredelnici 7 kažejo povprečno koncentracijo IL-6 in koeficient variacije za vsak vzorec (celokupen koeficient variacije med analizo je 3,4%).

Razpredelnica 7: Povprečna koncentracija in koeficient variacije za vsak vzorec.

Pozitivni vzorec	Eksperiment	Koncentracija IL-6 (pg/mL)	Koeficient variacije (%)
1	1; 2	40,7; 42,2	7,8; 1,6

2	1; 2	40,1; 40,1	4,1; 2,6
3	1; 2	43,2; 41,7	1,1; 3,5
4	1; 2	65,6; 65,4	2,3; 4,6
5	1; 2	47,2; 48,0	1,6; 2,1
6	1; 2	34,1; 37,8	2,5; 5,4
7	1; 2	27,3; 35,2	0,2; 7,7
8	1; 2	37,8; 42,6	4,1; 2,4

## 2. Med analizami:

Ponovljivost med posameznimi analizami v enem laboratoriju so določili na podlagi dveh neodvisnih eksperimentov, katere so izvedle tri osebe. Vsako analizo je sestavljalo šest ponovitev osmih vzorcev z različnimi koncentracijami IL-6. Celokupen koeficient variacije med posameznimi analizami je 5,2%.

Razpredelnica 8: Koncentracija IL-6 in koeficient variacije.

Vzorec	Koncentracija IL-6 (pg/mL)	Koeficient variacije (%)
1	41,5	2,6
2	40,1	0
3	42,5	4,4
4	65,5	0,2
5	47,6	1,2
6	35,9	7,3
7	31,3	17,8
8	40,2	8,4

### ***Postopek analize:***

- mikrotitrne jamice speremo s pufrom
- dodamo 50 µl pufru za analizo
- pripravimo standard in kontrolo
- dodamo 50 µl vzorca
- 50 µl biotin-konjugata
- inkubiramo 2 uri v stesalniku pri sobni temperaturi

- dodamo 100 µl streptavidin-HRP
- inkubiramo 1 uro v stresalniku pri sobni temperaturi
- dodamo 100 µl substrata
- inkubiramo 10 min
- dodamo 100 µl stop raztopine
- določimo absorbanco

### *Določanje feritina*

#### *Vzorec:*

Za analizo se priporoča serumski vzorec. Stabilnost vzorca je pri temperaturi od 2°C do 8°C do 7 dni in pri temperaturi -20°C do 6 mesecev.

#### *Princip metode:*

Humani feritin reagira z antiferitinskimi protitelesi, s katerimi so prekriti lateks delci, kar vodi do tvorbe netopnih agregatov. Imunski kompleksi razpršujejo svetlobo proporcionalno glede na velikost, obliko in koncentracijo kompleksov. V pogojih presežka protiteles povečana količina antigena povzroči večjo razpršenost. Turbidimetri merijo zmanjšanje svetlobe zaradi refleksije, absorpcije ali razpršenosti.

Pri postopku z analizatorjem OLYMPUS se meri zmanjšanje intenzitete transmitirane svetlobe (poveča se absorbanca) skozi suspendirane delce v raztopini kot rezultat formiranja kompleksov med reakcijo antigen-protitelo. OLYMPUS feritin reagent je suspenzija polistirenskih lateksovih delcev, ki so enotne velikosti in so prekriti z zajčjimi poliklonalnimi anti-feritinskimi protitelesi. Ko se serum, ki vsebuje feritin, pomeša z OLYMPUS feritin reagentom pride do aglutinacije, kar merimo spektrofotometrično na analizatorju OLYMPUS.

#### *Reagenti:*

R1=Tris pufer (konc. 88mmol/l) in R2=latex delci prekriti z zajčjim antihuman feritinom, konzervans.

R1 je pripravljen za takojšnjo uporabo. R2 raztopino je potrebno premešati (5-10-krat obrnemo preden vstavimo v aparat in vsak dan pred začetkom dela). Obstočnost neuporabljenih reagentov je pri temperaturi od 2°C do 8°C določena z rokom uporabnosti. Že odprti reagenti, ki so že vstavljeni v analizatorju, so obstojni 30 dni.

### *Kalibracija:*

OLYMPUS Ferritin calibrator ODR 3020 (kalibrator je umerjen na NIBSC standard (WHO) 80/578 za feritin. Kalibriramo po potrebi (kalibracija velja največ 14 dni) ali OLYMPUS Serum Protein Multi-Calibrator ODR 3021. Kalibriramo najmanj v časovnem obdobju, ki ga priporoča proizvajalec, ob vsaki menjavi reagenta oziroma po potrebi.

### *Kontrola kakovosti:*

Kontrola: Olympus control level 1 ODC 0003. Analiziramo pred začetkom dela in po končanem delu oziroma po potrebi.

Olympus ITA Control Sera ODC 0014, ODC 0015, ODC 0016. Vsak laboratorij naj uvede svojo frekvenco kontrole, ne glede na to dobra praksa predpisuje, da se kontrola izvaja vsak dan, kadar se analizirajo vzorci in vsakič kadar se izvaja kalibracija.

### *Izračun:*

Analizator Olympus avtomatično izračuna koncentracijo feritina v vsakem vzorcu.

### *Referenčni intervali:*

Serum: novorojenčki: 25-200 $\mu$ g/l; 6 mesecev do 15 let: 7-142 $\mu$ g/l; odrasli moški: 20-300 $\mu$ g/l; odrasle ženske: 10-120 $\mu$ g/l.

Pričakovane vrednosti lahko variirajo z leti, spolom, tipom vzorca, prehrano in geografsko lokacijo, Vsak laboratorij naj potrdi prenosljivost pričakovanih vrednosti na svojo populacijo, in če jo potrebno naj določi svoj referenčni interval v skladu z določili dobre laboratorijske prakse. Za diagnostične namene je potrebno rezultate oceniti v kombinaciji z bolnikovo medicinsko zgodovino, kliničnim pregledom in ostalimi preiskavami.

### *Občutljivost metode:*

Najnižja detektirana vrednost v serumu je 6,4  $\mu$ g/l.

### *Moteče snovi:*

- lipemične snovi (motnja manj kot 10% do 400 ml/dl Intralipida)
- trigliceridi (motnja manj kot 10% do 1500 mg/dl trigliceridov)
- hemoliza (motnja manj kot 10% do 5g/l hemoglobina)
- ikterus (motnja manj kot 5% do 40 mg/dl ali 684  $\mu$ mol/l bilirubina)
- revmatoidni faktor (motnja manj kot 5% do 500 IU/ml revmatoidnega faktorja)

## Statistična analiza

Pri analizi podatkov interlevkina-6 pred in po naporu ter feritina pred naporom in po njem sem uporabila t test za odvisne vzorce. S t testom testiramo razlike med aritmetičnimi sredinami dveh vzorcev, pri tem pa predpostavljamo, da sta varianci v populaciji enaki. Pogoj je tudi, da je odvisna spremenljivka numerična in porazdeljena (vsaj približno) normalno. Obstajata dve vrsti t testa:

- t test za neodvisne vzorce
- t test za odvisne vzorce

V obeh primerih je pogoj, da so enote izbrane slučajno (vsaj če želimo rezultate posplošiti na celotno populacijo).

T test za odvisne vzorce:

- isti merjenci so testirani v začetnem in končnem stanju
- za vsakega merjenca izračunamo razliko med začetnim in končnim stanjem ( $d_i$ )
- izračunamo povprečje ( $D$ ) in standardno napako  $d_i(sD/\sqrt{N})$
- $t = D / (sD/\sqrt{N})$
- rezultat primerjamo s kritično vrednostjo in sprejmemo ali zavrnemo ničelno hipotezo
- pri tem  $t_{P=\alpha; df=n-2}$  pomeni kritično vrednost porazdelitve za površino P pri  $df=n-2$  stopnjah prostosti in stopnji tveganja  $\alpha$
- Z  $\alpha$  je označena stopnja tveganja, tj. še sprejemljiva verjetnost, da bomo zavrnili ničelno hipotezo, čeprav je ta pravilna.

Za analizo podatkov IL-6 pred naporom in feritina pred naporom, ter IL-6 po naporu in feritina po naporu sem uporabila analizo variance (ANOVA).

## REZULTATI

Koncentracija IL-6 v krvi se je po naporu značilno zvišala, srednja vrednost pred naporom je bila 0,482 ng/L, po naporu pa 0,955ng/L ( $P<0,05$ ) (slika 3, razpredelnica 9). Prav tako se je med naporom zvišala koncentracija feritina, srednja vrednost pred naporom je bila 49,57  $\mu\text{g/L}$ , po njem pa 64,428  $\mu\text{g/L}$  ( $P<0,05$ ) (slika 4). Z analizo variance nismo uspeli dokazati značilne povezave med koncentracijama IL-6 in feritina pred naporom ( $P>0,05$ ) (slika 5, graf 3), niti po naporu ( $P>0,05$ ) (slika 6, graf 4).

Razpredelnica 9: Vrednosti IL-6 (ng/L) pred in po naporu ter vrednosti feritina ( $\mu\text{g/L}$ ) pred naporom in po njem.

številka vzorca	IL-6 pred (ng/L)	IL-6 po (ng/L)	feritin pred ( $\mu\text{g/L}$ )	feritin po ( $\mu\text{g/L}$ )
1	0,036	1,106	121	135
2	0,362	0,454	30	29
3	0	1,668	80	101
4	0,874	0,734	37	41
5	0,686	1,014	34	45
6	0,084	0	76	121
7	0,268	1,622	49	63
8	0,734	1,2	40	57
9	0,686	1,06	46	66
10	0,362	0,594	23	24
11	1,014	1,2	39	59
12	0,268	1,434	23	32
13	1,106	0,548	48	61
14	0,268	0,734	48	68

t-Test: Paired Two Sample for Means

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	0,482	0,955
Variance	0,133	0,223
Observations	14	14
Pearson Correlation	-0,107	
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	13	
t Stat	-2,823	
P(T<=t) one-tail	0,007	
t Critical one-tail	1,771	
P(T<=t) two-tail	0,014	
t Critical two-tail	2,160	

Slika 3: Izpis analize iz programa SPSS, parni t-test za vrednosti IL-6 pred in po naporu

t-Test: Paired Two Sample for Means

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mean	49,571	64,428
Variance	703,341	1115,341
Observations	14	14
Pearson Correlation	0,955	
Hypothesized Mean Difference	0	
Df	13	
t Stat	-4,941	
P(T<=t) one-tail	0,000135	
t Critical one-tail	1,771	
P(T<=t) two-tail	0,00027	
t Critical two-tail	2,160	

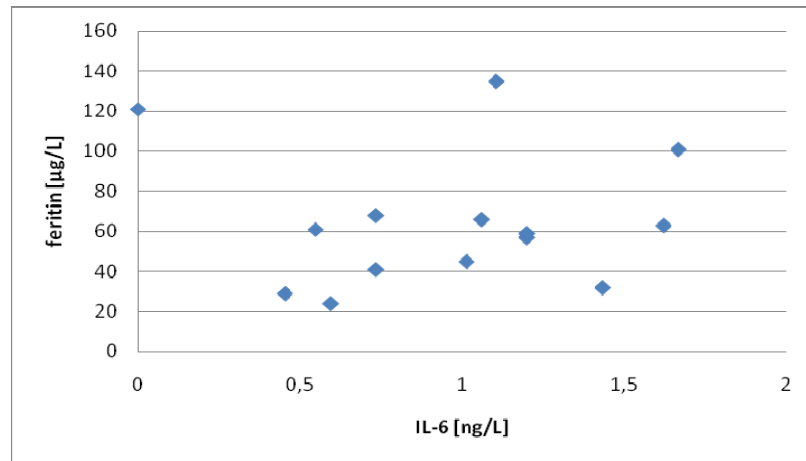
Slika 4: Izpis analize iz programa SPSS, parni t-test za vrednosti feritina pred in po naporu





Intercept	0,825	0,191	4,31	0,001	0,408	1,242	0,408	1,242
X Variable 1	-0,007	0,003	2,015	0,067	-0,014	6E-04	-0,01	6E-04

Slika5: Izpis analize iz programa SPSS, ANOVA, primerjava vrednosti IL-6 in feritina pred naporom.



Graf4: Graf prikazuje odnos med feritinom in IL-6 po aktivnosti.

#### SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0,955
R Square	0,912
Adjusted R Square	0,905
Standard Error	8,167
Observations	14

#### ANOVA

	<i>Df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	8343	8343	125,08	1,06E-07

Residual	12	800,44	66,703
Total	13	9143,4	

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	0,699	4,885	0,143	0,889	-9,944	11,342	-9,94	11,342
X Variable 1	0,759	0,068	11,184	1E-07	0,611	0,906	0,611	0,906

Slika6: Izpis analize iz programa SPSS, ANOVA, primerjava vrednosti IL-6 in feritina po naporu.

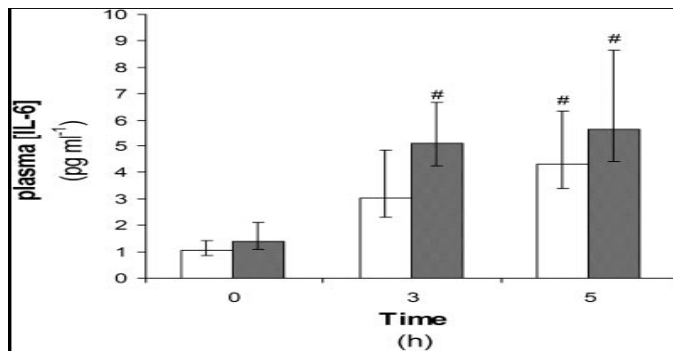
## RAZPRAVA

Tako kot že nekaj raziskav, ki so se ukvarjale s povezavo med IL-6 in fizičnim naporom (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15), smo tudi mi dokazali, da se vrednosti IL-6 po naporu značilno povečajo ( $P=0,014$ ), za 98%. Do tega naj bi prišlo zaradi več razlogov. Najpomembnejši je verjetno ta, da IL-6 nastaja med kontrakcijo mišičnih vlaken in se nato izloča v krvni obtok. Pri visoko intenzivni ekscentrični vadbi pride do ultrastrukturnih poškodb mišičnih vlaken in akutnega protivnetnega odziva, kar vodi do edemov, infiltracije vnetnih celic in zateklosti mišice. Raziskovalci, ki so se ukvarjali s povezavo med mišičnimi poškodbami in vrednostjo IL-6, so ugotovili, da trening zmanjša zateklost mišic kot odziv na intenzivno ekscentrično vadbo. Takojšen velik porast IL-6 po naporni vadbi je neodvisen od poškodb mišice, medtem ko se v sami mišici sprožijo regenerativni mehanizmi, ki vključujejo invazijo makrofagov na mesto poškodbe in s tem tudi produkcijo IL-6. Povišanje vrednosti IL-6 v povezavi s poškodbami mišic je manj izrazito kot povišanje zaradi kontrakcije mišičnih vlaken (24).

Kinetika odziva IL-6 se razlikuje glede na vrsto napora. Koncentrična mišična kontrakcija izzove drugačen odziv kot ekscentričen napor, pri katerem pride do mišičnih poškodb (9). Pri koncentričnem naporu je povišanje vrednosti IL-6 povezano s trajanjem napora, med njima naj bi obstajala celo logaritmična povezava (24). Vrednosti IL-6 po takšnem naporu padajo in dosežejo začetne vrednosti pred naporom že v nekaj urah. Drugače pa je pri ekscentričnem naporu, kjer vrednosti IL-6 v plazmi po naporu le rahlo naraščajo, vrh pa dosežejo kasneje (24). Po ekcentrični vadbi naj bi vrednosti IL-6 dosegle najvišjo koncentracijo po 2h urah po naporu, povišale naj bi se tudi za več kot 4-krat (9). Bruunsgaard in sod. so dokazali, da vrednosti IL-6 po ekscentričnem naporu ostanejo povišane še najmanj en teden, preden se vrnejo na normalno vrednost. Njihove raziskave so temeljile na netreniranih osebah, ki pred testom niso bile posebno aktivne. V našem primeru smo testirali profesionalne športnike, ki imajo organizem prilagojen na vsakdanji napor.

Reden trening poviša glikogenske zaloge, ki bistveno vplivajo na koncentracijo IL-6 (10, 11). Dokazano je, da nizke vrednosti glikogena v skeletni mišici inducirajo transkripcijo gena za IL-6. C.P.Fisher in sod. (11) so postavili hipotezo, da če upoštevamo dejstvo, da je

ekspresija gena za IL-6 povečana ob manjši vrednosti mišičnega glikogena pred vadbo, in če sproščeni IL-6 poveča lipolizo, potem redna vzdržljivostna vadba, ki zveča glikogenske zaloge in poveča aktivnost mitohondrijskih encimov, vodi k manj izraženemu povečanju IL-6 mRNA v delujoči mišici. Merili so vrednosti IL-6 mRNA v skeletni mišici v mirovanju in kot odgovor na akutni napor pred in po 10 tednih vzdržljivostnega treninga (11) (graf 1).



Graf1: Koncentracija IL-6 pred, takoj po (po treh urah) in dve uri po končanem testu (po petih urah), test merjenja moči iztegovalk spodnjih okončin. Prazni stolpci prikazujejo vrednosti pred 10 dnevnim intenzivnim treningom, polni pa po njem (11).

Ugotovili so, da redna telesna vadba uravnava ekspresijo gena za IL-6 v skeletni mišici in dokazali, da se po 10-dnevnem vzdržljivostnem treningu odgovor IL-6 mRNA na vadbo znatno zmanjša. S treningom se je povečala koncentracija mišičnega glikogena v mirovanju, vendar je njena vrednost takoj po aktivnosti (po 2 urah) zopet padla. C.P.Fisher in sod. so zaključili, da je koncentracija glikogena v skeletni mišici pred telesno aktivnostjo ključnega pomena za ekspresijo IL-6 mRNA (14). IL-6 je tako lahko pokazatelj nizke koncentracije glikogena v skeletni mišici med telesnim naporom (10).

Dejstvo, da se IL-6 sprosti že 10 min po vadbi, kaže na to, da je vrednost IL-6 odvisna od glikogenskih zalog v mišici, ne pa od njegove sposobnosti za transkripcijo gena, ki se inducira z naporom. Torej sledi, da je naraščanje vrednosti IL-6 med naporom odvisno od glikogenskih zalog v mišici pred aktivnostjo. Pri veslačih so se vrednosti IL-6 povečale za skoraj 2-krat. To je tudi posledica vzorčenja takoj po testu (5 min po naporu), ko v telesu še vedno potekajo vnetne reakcije, vrednosti IL-6 pa naraščajo. Če bi vzorce jemali eno uro kasneje, bi bile vrednosti verjetno še precej višje.

H končni vrednosti povišanega IL-6 doprinese tudi dejstvo, da med visoko intenzivnim naporom pride do hemokoncentracije, ko se tekočine v telesu prerazporedijo. Večja količina vode se skoncentrira v mišici, kar tudi pripomore k njenem zatekanju.

Dokazali smo tudi, da se med naporom značilno povečajo vrednosti feritina v serumu ( $P < 0,05$ ). Med naporom je verjetno prišlo do mikropoškodb v mišičnih vlaknih, zaradi česar se sprostijo železovi ioni. Zvišanje vrednosti feritina bi bila lahko posledica tudi akutnega vnetja, ki se razvije med samim naporom.

Vrednost serumskega feritina je neposredno povezana z zalogami železovih ionov v telesu. Kakršnokoli kronično vnetje poveča vrednosti feritina, lahko se zviša tudi po treningu zaradi hemokoncentracije, ali pa zaradi napora samega, ki povzroči akutno vnetje in lahko traja 2 do 3 dni. Na nizko vrednost feritina ne vpliva samo pomanjkanje železovih ionov. Pri treningu se na primer poveča volumen plazme, kar zniža koncentracijo. Drug primer je močna hemoliza, kjer je presežena zmogljivost hepatocitov. Le-ti sproščajo hem počasneje, kot je potrebno in zato je manj železovih ionov na razpolago. Vse to pa povzroči nižje vrednosti feritina (18).

Kar nekaj raziskav se je ukvarjalo z vprašanjem, ali lahko na fizični napor vpliva že samo pomanjkanje železa, brez spremljajoče anemije (19). Do poslabšanja rezultatov fizičnega napora naj bi prišlo zaradi pomanjkanja količine in aktivnosti encimov, odvisnih od mioglobina in železa. Najpomembnejši klinični znaki so pospešeno nastajanje in kopičenje mlečne kisline, glavobol, mišični krči in vazomotorične motnje. Ko se nivo železovih ionov močno zniža in pride do anemije, pa to privede do sprememb pri fizični aktivnosti. Zmanjša se tako dostava kisika, kot odstranjevanje ogljikovega dioksida v tkivih. Manjši dovod kisika se zato uravnava z večjim delovanjem srca, ki mora prečrpati večjo količino krvi. Vse te spremembe so izražene le med naporom. Opazni znaki so povišan srčni utrip, povečano izločanje mlečne kisline in daljši čas okrevanja. Dokazano je, da obstaja tesna povezava med krvno vrednostjo hemoglobina in fizično sposobnostjo. Infuzija s hemoglobinom naj bi znatno izboljšala fizično aktivnost (19).

Odnosa med feritinom in interleukinom nam ni uspelo dokazati, verjetno bi s pomočjo hepcidina lažje razložili povezavo. IL-6 uravnava hipoferemijo, ki je posledica vnetja, z indukcijo sinteze hormona hepcidina, ki uravnava stanje železa v krvi. Izločanje hepcidina iz jeter je indirektno uravnava tako z vnetjem kot s količino železovih ionov v telesu. Pri infekciji patogeni delujejo na imunski sistem, predvsem na makrofage, ki začnejo izločati

citokin IL-6, le-ta pa spodbudi podvajanje mRNA hepcidina v hepatocitih. Sposobnost hepcidina, da preko zaviranja absorpcije železovih ionov zmanjša nastajanje eritrocitov, vodi v anemijo. Nemeth in sod. so dokazali 100-kratno povečanje koncentracije hepcidina v urinu pri pacientih z vnetno anemijo, kot posledico kronične infekcije (22). Manjše povečanje v koncentraciji hepcidina so opazili pri pacientih z manj resnim vnetnim stanjem. Stokrat se je povečala tudi njegova koncentracija v primeru presežka železovih ionov, če so osebe prejele transfuzijo (npr. pri mielodisplaziji) (22).

Izločanje hepcidina je v tesni povezavi s koncentracijo transferina, tudi ta se namreč poveča ob vnetju ali povečani koncentraciji železovih ionov.

Na presnovo železovih ionov vplivata tudi anemija in hipoksija. Ta dva stimulusa zmanjšata izločanje hepcidina in s tem inhibitorni učinek na absorpcijo železovih ionov in njihovo sproščanje iz makrofagov, tako da lahko pride do kompenzatorne eritropoeze (22). Pomembna je ugotovitev, da je močnejši učinek pri zaviranju izločanja hepcidina, ki ga sproži anemija, kot učinek pri stimulaciji hepcidina, ki nastane zaradi povečane koncentracije železovih ionov. S to hierarhijo procesov bi lahko razložili, zakaj se ob presežku železovih ionov pogosto razvijejo določene hemolitične motnje (22).

Mehanizem po katerem povečana koncentracija železovih ionov pri miših sproži povečanje mRNA hepcidina v jetrih in pri človeku povzroči zvečano izločanje hepcidina z urinom, še ni pojasnjen (22). Neposredna izpostavljenost humanih hepatocitov železovim ionom ali transferinu nasičenem z železovimi ioni, ni izzvala povišanja mRNA hepcidina, železovi ioni so jo celo zavrli. Iz tega se sklepa, da so za odziv na železove ione potrebne druge celice. Makrofagi med infekcijo sproščajo IL-6, ki inducira izločanje hepcidina, za sporazumevanje med celicami v jetrih pa naj bi sodelovale tudi Kupfferjeve in sinusoidne celice (22).

E. Nemeth in sod. so pri preučevanju humane kulture hepatocitov dokazali, da hepcidin inducira IL-6, ne pa IL-1 ali TNF $\alpha$ . To naj bi bila posledica odziva druge faze akutnega vnetja. Ugotovili so tudi, da je IL-6 potreben za indukcijo hepcidina in hipoferemijo, ki se razvije med vnetjem (21).

V našem primeru z analizo variance nismo uspeli dokazati povezave med IL-6 in feritinom pred začetkom testiranja ( $P > 0,05$ ), niti po končanem testu ( $P > 0,05$ ). Dokazali pa smo, da sta se obe količini po naporu značilno povečali.

Velik delež tkiva pri ljudeh predstavljajo mišice, ki lahko med aktivnostjo povečajo stopnjo metabolizma tudi do 100-krat. Pri napornem kolesarjenju se povečajo zahteve po

cirkulaciji, minutni volumen srca se poveča tudi na 20-40L/min. P. Andersen in sod. so preučevali, kako se spremeni pretok krvi v skeletni mišici med naporom. Ugotovili so, da se poveča linearno z vloženim delom na povprečno 2,5L/minkg (25); običajen pretok krvi pred naporom je bil 0,6 – 1,0 L/minkg. Pretok se preusmeri predvsem na aktivne mišice, srce in pljuča, medtem ko se v prebavilih in ledvicah pretok krvi zmanjša.

Prerazporedijo se tudi volumni telesnih tekočin. R.J. Marshal in J.T. Shepherd sta se ukvarjala s spremembami v osrednjem krvnem obtoku med naporom. Merila sta centralni krvni volumen (CKV) v mirovanju, po treh minutah napora (obremenitev ekstenzorja noge), zopet mirovanju in nato po treh minutah napora. Vzorce sta vzela iz desne radialne arterije. CKV v mirovanju je bil približno 1500ml/m<sup>2</sup>, med prvo obremenitvijo 2000ml/m<sup>2</sup> in med drugim naporom 1100ml/m<sup>2</sup>, 400 ml manj kot na začetku. Skoraj neverjetno je, da bi zmanjšanje perifernega krvnega tlaka spremenilo volumen krvi v srcu in pljučih, zato je to znižanje volumna krvi za 900ml posledica spremembe v arterijski komponenti volumna. Med prvim naporom se je pritok krvi v spodnjo polovico telesa povečal. Kri se je preusmerila iz notranjih organov v aktivne mišice. Volumen krvi se je začasno povečal. V mišicah se je povečala metabolna presnova tkiva in zahteve po kisiku, verjetno je prišlo tudi do akutnega vnetja. Arteriole so se razširile in povečala se je njihova prepustnost. Posledično se je zmanjšal celotni volumen krvi (26).

Dejstvo, kako se spremenijo telesne tekočine med naporom, je zelo pomembno pri interpretaciji rezultatov, saj moramo upoštevati višje vrednosti zaradi skoncentriranja krvi. Vrednost feritina se je povišala za 30%, medtem ko se je vrednost interleukina-6 dvignila kar za 98%. Pri feritinu gre verjetno večji delež zvišanja na račun hemokoncentracije, medtem ko je pri IL-6 v ospredju prizadetost oziroma aktivnost tkiva.

## SKLEP

V diplomski nalogi smo dokazali, da pride med intenzivnim naporom do velikih sprememb v koncentraciji vnetnega mediatorja interlevkina-6; z začetne vrednosti 0,48ng/L, je narasla na 0,95ng/L. To dokazuje, da v aktivnih mišicah med naporom zaradi različnih dejavnikov pospešeno nastaja interlevkin-6, ki se nato sprošča v krvni obtok. Potrdili smo tudi povišanje koncentracije feritina po naporu, iz vrednosti 49,57μg/L se je dvignila na 64,42μg/L. Pri obeh parametrih smo dokazali, da se med aktivnostjo prerazporedijo telesne tekočine, ki povzročijo hemokonzentracijo.

Žal nam ni uspelo dokazati povezave med interlevkinom-6 in feritinom, niti pred niti po naporu. Verjetno bi imeli več možnosti, če bi dokazovali tudi prisotnost hormona hepcidina, ki predstavlja vmesno povezavo med feritinom in interlevkinom-6.



## LITERATURA

1. Nieman D C, Immune response to heavy exertion, The American Physiological Society, North Carolina, 1997: 1385-1394
2. Roitt, Brostoff, Male: Immunology, fifth edition, Mosby, London, 1998: 1-12
3. Vozelj M, Temelji imunologije, DZS, Ljubljana, 2000; 8: 107-113, 240-260, 345-352
4. Burmester, Pezzutto, Color Atlas of Immunology, Thieme, 2003; 3: 278-286
5. Cupps, T.R., Fauci A S: Corticosteroid-mediated immunoregulation in man, Immunological Reviews 1982; 65: 133-155
6. Kraemer W J, Ratamess N A: Hormonal Responses and Adaptations to Resistance Exercise and Training, Sports Medicine, 2005; 35: 339-361
7. Steensberg A, Toft A D, Schjerling P, Halkjaer-Kristensen J, Pedersen B K: Plasma interleukin-6 during strenuous exercise: role of epinefrine, Am J Physiol Cell Physiology, 2001; 281: C1001-C1004
8. Bruusgaard H, Hartkopp H A, Mohr T, Konradsen H, Heron I, Mordhorst C H in Pedersen B K: Decreased in vivo cell-mediated immunity, but normal vaccination response following intense, long-term exercise, Medical Science 1998; 162: 325-332
9. Bruunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen T L, MacLean D A in Pedersen B K: Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage, Journal of Physiology, 1997; 499: 833-841
10. MacDonald C, Wojtaszewski F P J, Pedersen B K, Kiens B in Richter K A: Interleukin-6 release from human skeletal muscle during exercise: relation to AMPK activity, Appl Physiol, 2003; 95: 2273-2277
11. Fisher C P, Plomgaard P, Hansen A K, Pilegaard H, Saltin B in Pedersen B K: Endurance training reduces the contraction-induced interleukin-6 mRNA expression in human skeletal muscle, Physiol Endocrinol Metab, 2004; 287: 1189-1194

12. Penkowa M, Keller C, Keller P, Jauffred S in Pedersen B K; Immunohistochemical detection of interleukin-6 in human skeletal muscle fibers following exercise, The FASEB Journal express article, 2003, published online
13. Pool E J, Robson P J, Smith C, van Hyk J H, Myburgh K H: In vitro interleukin-6 release in whole blood cultures in samples taken at rest from triathletes and professional rugby players, *Appl Physiol*, 2002; 87: 233-237
14. Petersen A M W, Pedersen B K: The anti-inflammatory effect of exercise, *Appl Physiol*, 2005; 98: 1154-1162
15. Robson P J: Elucidating the unexplained underperformance syndrome in endurance athletes, The interleukin-6 hypothesis, *Sports Medicine*, 2003; 33: 771-781
16. Bruunsgaard H: Physical activity and modulation of systemic low-level inflammation, *Journal of Leukocyte Biology*, 2005; 78: 819-835
17. Newhouse I J in Clement D B: Iron status in athletes, *Sports med*, 1988; 5: 337-352
18. Hemmingson P, Bauer M, Birgegard G: Iron status in elite skiers, *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 1991; 1: 174-179
19. Clement D B in Sawchuck L L: Iron status and sport performance, *Sports med*, 1984; 1: 65-74
20. Hershko C: Regulating the master iron regulator hepcidin, *Blood*, Red cells, 2006: 3204
21. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen B K, Ganz T: IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin, *The Journal of Clinical Investigation*, 2004; 113: 1271-1276
22. Ganz T: Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation, *Blood*, 2003; 102: 783-788
23. Seiler S: Physiology of the elite rower, 2005; 5.10.2007  
<http://home.hia.no/~stephens/rowphys.htm>
24. Pedersen B K, Steensberg A, Schjerling P: Muscle-derived interleukin-6: possible biological effects, *Journal of Physiology*, 2001; 536.2: 329-337

25. Andersen P, Saltin B: Maximal perfusion of skeletal muscle in man, *Journal of Physiology*, 1985; 366: 233-249
26. Marshall R J, Shepherd J T: Interpretation of changes in central blood volume and stroke volume during exercise in man, *The Journal of Clinical Investigation*, 1961; 40 (2): 375-385