

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2009

Helena Bočínská

Univerzita Karlova v Praze

2. lékařská fakulta

VLIV EXTRÉMNÍ FYZICKÉ ZÁTĚŽE NA ZASTOUPENÍ SUBPOPULACÍ
DENDRITICKÝCH BUNĚK V PERIFERNÍ KRVI U VRCHOLOVÝCH SPORTOVců

Diplomová práce

Autor: Bc. Helena Bočínská, obor fyzioterapie

Vedoucí práce: doc. PaedDr. Pavel Kolář

Praha 2009

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora: Bc. Helena Bočínská

Název diplomové práce: Vliv extrémní fyzické zátěže na zastoupení subpopulací dendritických buněk v periferní krvi u vrcholových sportovců

Pracoviště: Klinika rehabilitace a tělovýchovného lékařství

Vedoucí diplomové práce: doc. PaedDr. Pavel Kolář, PhD.

Rok obhajoby diplomové práce: 2009

Abstrakt: Cílem studie je popsat změny v zastoupení jednotlivých subpopulací dendritických buněk (myeloidních a plasmocytoidních) v periferní krvi po intenzivní fyzické zátěži a zhodnotit jejich aktivační stav. Časné změny počtu a funkce základních složek buněčné imunity po sportovní zátěži byly již popsány, ale chování cirkulujících dendritických zatím studováno nebylo. Analýzou krevních vzorků odebraných před a po zátěži bylo stanoveno zastoupení a stadium diferenciací dendritických buněk. Odpovědí na extrémní fyzickou zátěž podle výsledků této studie je zvýšení hladin dendritických buněk současně se snížením exprese kostimulačních molekul, tedy snížením jejich aktivace. Sledované změny přispívají k názoru, že fyzická zátěž iniciuje reakci na nebezpečí poškození organismu.

Klíčová slova: dendritické buňky, fyzická zátěž, imunitní funkce

Souhlasím s půjčováním diplomové práce v rámci knihovních služeb.

Bibliografická identifikace v angličtině

Author's first name and surname: Helena Bočínková, BA.

Title of the master thesis: The influence of extreme physical exercise on representation of dendritic cells subpopulation in peripheral blood in elite sportsmen

Department: Department of Rehabilitation and Exercise Medicine

Supervisor: doc. PaedDr. Pavel Kolář, PhD.

The year of presentation: 2009

Abstract: The main goal of this thesis is to describe changes in representation of various subpopulations dendritic cells (myelogenic and plasmocytogenic) in peripheral blood after intense physical stress and to review their activation status. Early count changes and changes of function of basic elements of cellular immunity after a sport load was described, whereas a behaviour of circulating dendritic cells hasn't been studied yet. The amount and the stage of differentiation of dendritic cells was specified by analysis of blood samples taken before and after the load. According to the result of the thesis the reaction to extreme physical load had two effects. The amount of dendritic cells was increased, whilst the expression of kostimulative molecules (their activation) was decreased. Described changes support an opinion, that physical load initates reaction to a danger of body damage.

Keywords: dendritic cells, physical exercise, immune functions

I agree the thesis paper to be lent within the library service.

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením doc. PaedDr. Pavla Koláře, uvedla všechny použité literární a odborné zdroje a dodržovala zásady vědecké etiky.

V Praze dne 24. 4. 2009

.....

Poděkování autora

Děkuji doc. PaedDr. Pavlu Kolářovi za možnost účasti na výzkumném projektu, za cenné rady a návrhy při vedení a zpracování diplomové práce. V tomto ohledu děkuji také prof. MUDr. Jiřině Bartůňkové, DrSc., Mgr. Vítu Budinskému z Ústavu imunologie. Dále děkuji MUC. Ondřeji Suchánkovi za spolupráci při realizaci studie a pomoc při statistickém zpracování dat a výsledků diplomové práce.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÝ ÚVOD	9
2.1 Imunitní systém	9
2.1.1 Nespecifická imunita	10
2.1.2 Specifická imunita	11
2.1.2.1 Specifická buněčná imunita	12
2.1.2.2 Specifická humorální imunita	13
2.2 Dendritické buňky	14
2.2.1 Kostimulační molekuly	19
2.2.2 Mechanismus působení dendritických buněk	20
2.3 Vliv fyzické zátěže na imunitu	25
2.3.1 Vliv fyzické zátěže na změnu počtu cirkulujících dendritických buněk	33
2.3.2 Přehled akutních vlivů cvičení na imunitní funkce	35
3 CÍLE A HYPOTÉZY	39
4 METODIKA VÝZKUMU	40
4.1 Stanovení fyzické zátěže	41
4.1.1 Popis sporttesteru	41
4.2 Imunologická část studie	42
4.2.1 Průtoková cytometrie	42
5 VÝSLEDKY	45
6 DISKUZE	49
7 ZÁVĚR	54
8 SOUHRN	56
9 SUMMARY	57
10 REFERENČNÍ SEZNAM	58
11 PŘÍLOHY	61

1 ÚVOD

Základem pro tuto diplomovou práci byla nabídka spolupráce na studii prováděné ve spolupráci Kliniky rehabilitace a tělovýchovného lékařství Fakultní nemocnice v Motole (FN Motol) a Ústavu imunologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy (2.LF UK) v Praze. Tento výzkumný záměr měl za cíl zjistit změny hladiny populací dendritických buněk v periferní krvi u vrcholových sportovců.

Existuje řada studií, které sledují vliv fyzické aktivity na imunitní systém. Řadu let jsou známy například změny v hladinách imunoglobulinů ve slinách u profesionálních plavců. Již dlouho je prokázána souvislost mezi imunitou a vrcholovým sportem. Bylo zjištěno, že tato cílová skupina se chová prokazatelně jinak než běžná populace. Protože vysoká úroveň fyzické aktivity snižuje imunitní funkce a tím může být ovlivněna výkonnost vrcholových sportovců, je tato skupina vyhledávaným předmětem studií.

Ideou projektu realizovaného Klinikou rehabilitace a tělovýchovného lékařství tak bylo doplnit dnešní znalosti vlivu extrémní fyzické zátěže na imunitní systém. V minulosti již byla zjištěna řada změn imunitních funkcí souvisejících s fyzickou zátěží. Jsou známy jak pozitivní, tak negativní vlivy. Přínosem je cvičení s rozumným fyzickým zatížením. Je známo, že extrémní fyzická zátěž, kterou podstupují vrcholoví sportovci již působí na organismus imunodeficientně. Popsány byly i změny týkající se hladin dendritických buněk před a po zátěži. Jednou z otázek, kterou měla studie zodpovědět, tedy bylo – pokud dojde ke změnám hladin dendritických buněk, jak velká bude diference v jejich počtu před a po zátěži.

Již v přípravných fázích studie vyvstalo mnoho zajímavých otázek, což podnítilo můj zájem o dané téma a vedlo mě k jeho zpracování do diplomové práce.

2 TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 Imunitní systém

Lidský organismus je vybaven nespecifickou, vrozenou a specifickou, získanou neboli adaptivní imunitou proti mikroorganismům a proti cizorodým makromolekulám. Obě komponenty imunitního systému jsou spolu propojeny. Části choroboplodných mikroorganismů (bakterií, virů, hub, parazitů) a makromolekulární cizorodé látky jsou antigeny, na které reaguje specifický imunitní systém aktivací a množením T- a B-lymfocytů. B-buňky se přitom dále diferencují na plazmatické buňky, které produkují protilátky (imunoglobuliny, Ig), jejichž úkolem je antigeny neutralizovat a opsonizovat a aktivovat komplementový systém. Specifické mechanismy imunity rozpoznávají daný antigen a ten je pak relativně nespecificky eliminován. Kromě toho mají T-, resp. B-buňky funkci buněk paměťových, prostřednictvím kterých je antigen uchován v imunologické paměti.

Repertoár různých typů monospecifických lymfocytů se vytváří z lymfoidních prekurzorových buněk v thymu a kostní dřeni. Tyto, ještě „naivní“ lymfocyty, cirkulují v organismu (krev → periferní lymfatické tkáně → lymfa → krev). V okamžiku, kdy se potkají se „svým“ antigenem, začínají se množit (klonální selekce a proliferace) a vzniká velký počet monospecifických dceřiných buněk. Nakonec dochází k jejich další diferenciaci na efektorové T-buňky nebo plazmatické buňky, které zajistí eliminaci antigenu.

Nespecifický imunitní systém nemůže při prvním kontaktu s infekcí zabránit rozmnožení a šíření virů, tudíž postižený jedinec onemocní. Specifická imunita s buňkami typu T-killers a imunoglobuliny nastupují do imunitní odpovědi a aktivují se pomalu (primární odpověď nebo senzibilizace), pak ale přece původce choroby zneškodní, organismus se vyléčí. Při druhém setkání s toutéž infekcí nastoupí produkce protilátek

(zejména IgG) okamžitě (sekundární imunitní odpověď), viry jsou eliminovány ihned na počátku onemocnění a infekce se nerozvine.

2.1.1 Nespecifická imunita

Nespecifická imunita využívá v plazmě rozpuštěné obranné látky jako je lysozym a faktory komplementu, NK-buňky (Natural Killer, přirozené zabíječské), fagocyty (zejm. makrofágy, které vznikají ve tkáních z monocytů, a neutrofilní granulocyty). Monocyty a neutrofilní stejně jako eosinofilní granulocyty se tvoří v kostní dřeni a cirkulují tělem. V případě výskytu infekce jsou přilákány chemokiny, které vznikají v místě, kde se objeví choroboplodné mikroorganismy, do místa infekce. Zde spouštějí uvolněním mediátorů proces zánětu. Prostřednictvím selektinů přilnou k endotelu, prostoupí jím a fagocytují cizorodé částice. Fagocyty likvidují pohlcené mikroorganismy lysozymem, oxidanty (peroxidem vodíku, kyslíkovými radikály), oxidem dusnatým a „stráví“ je svými lyzomálními enzymy.

Fagocytózu, tj. pohlcování mikroorganismů různými typy granulocytů, makrofágů a dendritických buněk, zesiluje pokrytí povrchu antigenu protilátkami IgM nebo IgG nebo složkami komplementu, tzv. opsonizace, pro niž jsou fagocyty vybaveny receptory pro imunoglobuliny a složky komplementu. Tímto dějem se z nespecifické fagocytózy stává součást specifické imunity. „Fagocyty ale mohou mikroorganismy rozeznávat i přímo, pomocí svých povrchových receptorů. Mezi nejdůležitější z nich patří tzv. „Toll-like“ receptory.“ (Hořejší, Bartůňková, 2002).

Patogenní mikroorganismu opsonizované (tzv. klasická cesta), ale i neopsonizované spouštějí komplementová kaskádu, na jejímž konci se vytvoří komplex napadající

membránu, který perforuje stěnu bakterií a usmrcuje je. Na enzymatickém odbourávání stěny bakterií se vedle toho podílí ještě lysozym (→ cytolýza).

Na nespecifickou obranu jsou specializovány přirozené zabíječské buňky (natural killers, NK-buňky). Infikované buňky poznají podle „cizího“ povrchu a spojují se svými receptory s povrchovými opsonizovanými antigeny těchto buněk. NK-buňky proděraví membránu infikovaných buněk a ty hynou procesem cytolýzy, tudíž pak jsou patogeny přístupnější dalším komponentám imunitního systému. NK-buňky jsou aktivovány interferony, které jsou mimo jiné uvolňovány z leukocytů a fibroblastů (IFN- α a IFN- β) a aktivovaných T-lymfocytů i samotných NK-buněk (IFN- γ).

Poslední složka nespecifické imunity, makrofágy, vznikají z monocytů. Makrofágy relativně nespecificky rozpoznávají sacharidové složky na povrchu bakterií a následně je fagocytují. Zničení pohlcených částic přežívajících ve fagosomech, vyžaduje aktivaci makrofágů, kterou zajišťují složky specifické imunity (pomocné T-lymfocyty typu 1).

2.1.2 Specifická imunita

Specifická imunita, také zvaná adaptivní nebo získaná, chrání organismus v prvních hodinách a dnech po vniknutí infekce do organismu. Tato část imunitního systému účinkuje cíleně a přesně proti jednotlivým konkrétním patogenům. Mechanismy specifické imunity disponují imunologickou pamětí. Po rozpoznání antigenu následují děje přirozené (nespecifické) imunity a začíná vzájemná kooperace obou složek imunitního systému. Jako efektorovou buňku specifické imunity můžeme označit lymfocyt. Látka, která je schopná vyvolat imunologickou odpověď se označuje jako antigen.

Specifická imunita se dělí na buňkami zprostředkovanou a látkovou (humorální). Na buněčné imunitě se podílí T-lymfocyty, na humorální pak participují B-lymfocyty.

2.1.2.1 Specifická buněčná imunita

Specifickou buněčnou imunitu zprostředkovávají T-lymfocyty, které jsou aktivovány relativně pomalu (jedná se o dny, proto se jejich reakce označuje termínem oddálená imunitní odpověď). T-lymfocyty neprodukují protilátky, ale po styku s antigenem se diferencují ve vysoce specializované efektorové buňky. Upravený antigen, resp. antigen rozštěpený na peptidové fragmenty, je prostřednictvím antigen-prezentujících buněk předkládán naivním T-lymfocytům. Antigen je zabudován do molekulární „kapsy“ individuálně specifických proteinů monohistokompatibilního komplexu (MHC) I. a II. třídy, u člověka nazývaného HLA (human leukocyte antigens, lidské leukocytární antigeny) I., resp. II. třídy. „Jako antigen prezentující buňky se uplatňují především viry infikované dendritické buňky, které sídlí převážně v lymfatické tkáni.“ (Silbernagel, Lang, 2001 et. Despopoulos, 2004). Teprve komplex antigenu s molekulami HLA je rozpoznán T-lymfocytem a stává se ligandem pro jeho receptory. Pokud je T-buňka pro antigen specifická, vazba antigen prezentující buňky a T-lymfocytu se zesílí a dojde k aktivaci dvojím signálem. První složkou tohoto signálu je rozpoznání antigenu receptory T-buněk, druhou částí je kostimulační signál. Bez kostimulace je lymfocyt inaktivován, dochází k anergii (periferní imunotolerance). Dvojí signál od antigen-prezentující buňky spouští expresi interleukinu-2 (IL-2), jež je signálem pro klonální expanzi, při které se diferencují subtypy T-buněk – cytotoxické T-buňky (T-killer), zánětlivé T-buňky (T_H1) a pomocné T-buňky (T_H2). Tyto subpopulace T-lymfocytů již nepotřebují kostimulaci, exprimují adhezivní molekuly a pomocí nich adherují přímo v zanícené tkáni.

Cytotoxické T-lymfocyty vznikají z naivních T-buněk po prezentaci antigenu asociovaného na HLA I. třídy. Hlavním úkolem cytotoxických T-lymfocytů je prověřovat buňky organismu, nejsou-li infikovány virem, nedochází-li k jejich přeměně v buňky nádorové, nevyvíjí-li se abnormálně. Cytotoxické T-lymfocyty také dokáží ničit bakterie a některé parazity.

Naivní T-lymfocyty se po prezentaci antigenu asociovaného s HLA II. třídy přeměňují na nezralé efektorové buňky, které se dále diferencují do dvou skupin pomocných T-lymfocytů. Patří sem prozánětlivé, pomocné T-lymfocyty typu 1, aktivující prostřednictvím interferonu- γ (INF- γ) mikrořg a pomocné T-lymfocyty typu 2, které jsou potřebné pro aktivaci B-buněk, tedy humorální části specifické imunity. Pomocné T-lymfocyty typu 1 a typu 2 se vzájemně ovlivňují, takže může převládnout jen jeden z obou typů.

2.1.2.2 Specifická humorální imunita

Výchozími buňkami pro specifickou humorální imunitu jsou B-lymfocyty, které mají na svém povrchu zakotveny imunoglobuliny IgD a monomery imunoglobulinu IgM, z nichž se jich hned několik váže na příslušný antigen. Tím dojde k zesílení protilátek, což v B-buňkách navozuje internalizaci a zpracování komplexu antigen-protilátka. K aktivaci B-buňky je však potřebný ještě druhý signál, který může pocházet u tzv. na thymu nezávislých od samotného antigenu, u antigenů na thymu závislých od pomocných T-buněk typu 2 (T_H2). Pomocná T-buňka secernuje interleukin-4 (IL-4). Interleukin-4 spouští klonální selekci B-buňky, sekreci IgM a diferenciaci na plazmatické buňky. Plazmatické buňky produkují podle překódování imunoglobulin IgA, IgG nebo IgE. Imunoglobuliny, pocházející z jednoho klonu B-buňky, jsou specifické pro stejný antigen. U některých B-

lymfocytů nedojde k přeměně v plazmatickou buňku, ale množí se a diferencují v množství paměťových buněk, které jakmile se pak setkají s tímtož antigenem reagují rychlou produkcí velkého množství protilátek (tzv. sekundární odpověď).

2.2 Dendritické buňky

„Dendritické buňky jsou v současné době uznávány jako klíčové buňky regulující imunitní odpověď. Tuto složitou funkci vykonávají díky flexibilitě a výjimečným vlastnostem, které jim umožňují řídit toleranci imunitního systému vůči vlastním složkám a zároveň určit charakter reakce imunitního systému vůči škodlivým podnětům. Dendritické buňky vykonávají své funkce v celém organismu, ale rozhodující je jejich úloha na rozhraní organismu a prostředí, tedy hlavně na kůži a sliznicích. Podle současných znalostí stojí dendritické buňky na počátku každé imunitní reakce, která vede ke klasickému rozvoji imunitní odpovědi aktivací nespecifické a posléze specifické větve imunity. Dendritické buňky stojí také v centru neustále probíhajících imunitních reakcí, které zabezpečují toleranci neškodných podnětů a integritu organismu. Jejich soustavné a přesné fungování má stěžejní význam pro udržení homeostázy a zdraví.

Dendritické buňky vznikají v kostní dřeni a fungují jako antigen prezentující buňky (APC). Dendritické buňky patří do myeloidní vývojové řady kmenových buněk a společně s dalšími druhy myeloidních buněk (monocyty a granulocyty) tvoří základ nespecifické části imunitního systému. Z dřevých progenitorů se vyvinou tkáňové dendritické buňky, které efektivně pohlcují antigeny. Ve skutečnosti jsou dendritické buňky mnohem účinnějšími antigen prezentujícími buňkami než makrofágy. „Jako hlavní antigen

prezentující buňky představují spojující článek mezi rychlou antigenně nespecifickou a pomalu se rozvíjející (4-7 dní po infekci) antigenně specifickou částí imunitního systému.“ (Hořejší, Bartůňková, 2005).

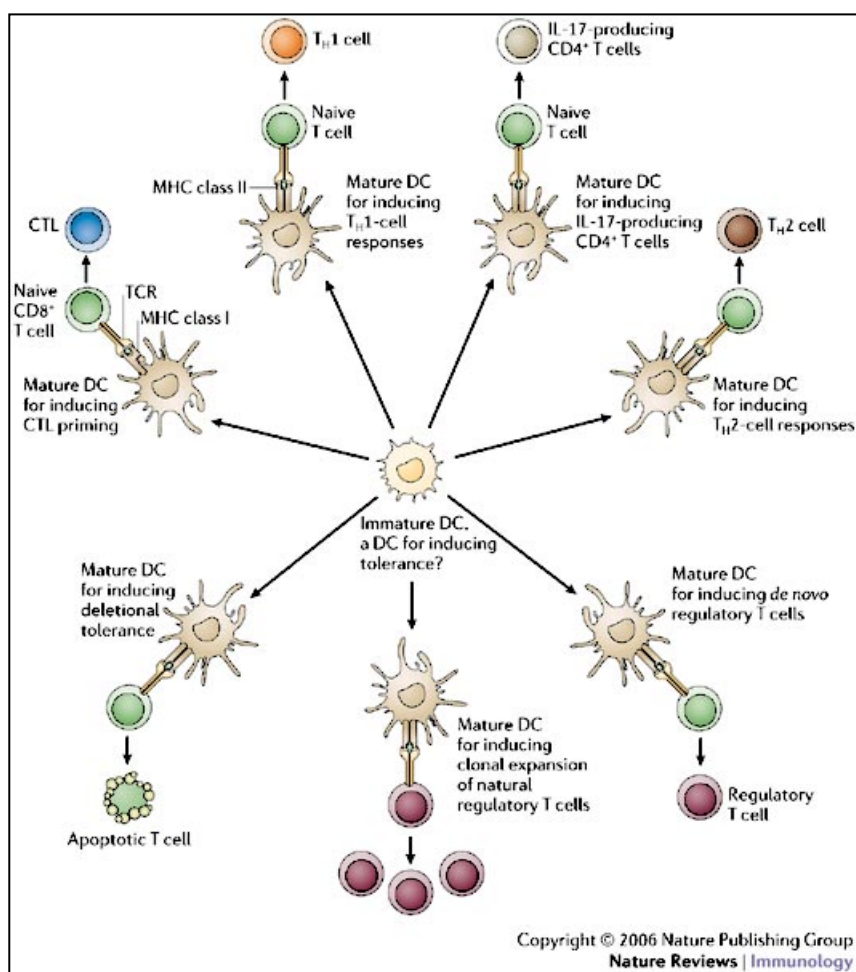
„Dendritické buňky mají všechny vlastnosti, které jsou nutné k zabezpečení rozpoznání, zpracování a prezentace antigenu a následné indukci imunitní reakce. Jsou strategicky rozmístěny v celém těle s maximem jejich výskytu na místech exponovaných antigenům (na rozhraní organismu a okolního prostředí), jako jsou slizniční povrchy, slezina a další tkáně a orgány.“ (Šedivá, 2006). Obvykle se nalézají ve strukturách lymfatických orgánů jako je thymus, lymfatické uzliny a slezina. „Nejvíce nezralých dendritických buněk se nalézají v kůži a ve sliznicích dýchacího a trávicího traktu, kde tvoří 1-2% celkového počtu buněk. Dendritické buňky jsou zastoupeny téměř ve všech orgánech a tkáních a dynamicky cestují mezi krví a lymfou.“ (Hořejší, Bartůňková, 2005). „V klidovém stadiu jsou dendritické buňky ve stavu „nezralosti“, který je charakteristický jejich schopností pohlcovat a neustále zpracovávat antigeny, ale zároveň neschopností účinně stimulovat T-buněčnou odpověď.“ (Šedivá, 2006). Nezralé dendritické buňky průběžně pohlcují odumřelé buňky zdravých tkání a molekuly rozpuštěné v mezibuněčné tekutině. Tělu vlastní molekuly zpracují a jejich fragmenty vystaví v komplexu s MHC (major histocompatibility complex) proteiny, resp. HLA proteiny. Specifické T-lymfocyty tyto autoantigeny rozpoznají a nejsou jimi aktivovány, ale jsou buď zcela utlumeny nebo se z nich tvoří tzv. regulační T-lymfocyty. Nezralé dendritické buňky proto mají nezastupitelný vliv na zachování tolerance vůči vlastním tkáním.

Dendritická buňka zahajuje významnou a dramatickou přeměnu svého nezralého stavu a postupně prochází procesem maturace (diferenciace), který vyústí ve zralou dendritickou buňku, za situace, že je expozice dendritické buňky antigenu provázena některým ze signálů nebezpečí pro imunitní systém. V takovém případě přestává dendritická buňka

pohlcovat a zpracovávat okolní antigeny a naopak začíná na svém povrchu tyto antigeny vystavovat ve spojení s HLA molekulami v procesu prezentace antigenu. Aktivace dendritické buňky je vyvolána prostřednictvím různých receptorů, které rozpoznávají nebezpečné podněty, zejm. molekulární struktury spojené s patogeny. „Dendritická buňka ve svém zralém stavu exprimuje HLA molekuly I. a II. třídy, kostimulační molekuly (CD80, CD86) a další znaky charakteristické pro dendritické buňky a zaměřené na následnou stimulaci T-lymfocytů. Současně zralé dendritické buňky cestují do lymfatických uzlin.“ (Šedivá, 2006). Má se za to, že v lymfatických orgánech zachycují a zpracovávají antigeny, a tamtéž je zahájena imunologická reakce procesem aktivace a polarizace T-buněčné odpovědi. Optimální stimulace specifických efektorových T-lymfocytů je zaručena cytokiny produkovanými dendritickými buňkami (např. IL-1, IL-6, TNF a IL-12). Naivní T-lymfocyty dokáže aktivovat pouze zralá dendritická buňka. Zralosti dosáhne dendritická buňka přibližně během 48 hodin. Proces zrání je ireverzibilní a ve zralém stavu dendritická buňka vydrží asi 2-3 dny.

Nezralé dendritické buňky mohou dát vzniknout mnoha typům „efektorových“ dendritických buněk, které určují odlišný osud T-lymfocytů, zahrnujíc imunitu (obranyschopnost), toleranci i imunitní odchylky. Maturace se týká změn, které doprovází přeměnu nezralých dendritických buněk do určeného efektorového stavu v rámci odpovědi na signály z okolního prostředí buď exogenního (např. mikrobiálního) nebo endogenního (např. cytokiny, hormony a odumřelé buňky) původu. Kvalita těchto signálů velkou měrou určuje výběr efektorové dendritické buňky, třebaže roli může hrát taktéž ontogeneze a určité podtypy dendritických buněk tudíž mohou být predisponovány ke vzniku specifického efektorového stavu nebo mají pouze omezený repertoár efektorových funkcí. Aktivace dendritické buňky může také nastat spontánně, což se děje při absenci signálů z okolního prostředí, automaticky podporovaná přeměna dendritické buňky k dosažení

efektorového stavu po určitém časovém období. Tento model přeměny se liší od toho konvenčního předpokladem, že dendritické buňky schopné vytvářet imunologickou toleranci jsou typem zralých dendritických buněk. Jinými slovy, některé signály zrání mohou podporovat tvorbu dendritických buněk se schopností imunologické tolerance. To nepopírá možnost, že některé nezralé dendritické buňky mají vlastní schopnost vytváření imunologické tolerance.



Obrázek 1 – Zobrazení funkce dendritických buněk: CTL = cytotoxické T-lymfocyty; IL-17 = interleukin 17; TCR = receptor T-lymfocytu; T_H = pomocné T-lymfocyty (převzato z Nature Reviews Immunology)

V lidském organismu je celá škála různých populací DC. Výše zmiňované dendritické buňky jsou označovány jako myeloidní (mDC). Vedle nich existují ještě tzv.

plazmocytoïdní, morfologicky i funkčně odlišné. Myeloidní dendritické buňky exprimují většinu „Toll-like“ receptorů a jejich hlavní funkcí je ve zralém stadiu stimulovat antigenně specifické T-lymfocyty. Plazmocytoïdní dendritické buňky exprimují hlavně receptory nukleových kyselin (TLR-7 a TLR-9), a proto po setkání s virem, kdy jsou tyto receptory velmi účinně stimulovány, produkují velké množství interferonu (INF - α). „Produkce interferonu α je kromě toho důležitá i pro funkci NK -buněk.“ (Hořejší, Bartůňková, 2005). Také u plazmocytoïdních dendritických buněk platí, že po jejich stimulaci dochází k maturaci, tedy přeměně v účinné antigen prezentující buňky pro antigenně specifické T-lymfocyty.

Dendritické buňky exprimují rozmanité receptory, rozeznávající mikrobiální produkty. Mezi ně patří „Toll-like“ receptory (TLR, jejichž název je odvozen od receptoru Toll popsaného poprvé v roce 1985 u mušky octomilky – *Drosophila*). „Toll-like“ receptory jsou druhem proteinů, jež hrají klíčovou roli v systému vrozené imunity. Jedná se o samostatné membránové nekatalytické receptory, odhalující a rozpoznávající molekuly odvozené z mikrobů. Kromě toho mohou být aktivovány endogenními signály značícími nebezpečí poškození tkáně. Jakmile mikroby poruší tělesnou bariéru jako je kůže nebo sliznice intestinálního traktu, jsou rozpoznány „Toll-like“ receptory, které aktivují odpověď imunitních buněk. „Toll-like“ receptory, jak se ukazuje od devadesátých let minulého století, hrají mimořádně důležitou roli v aktivaci dendritických buněk indukované patogeny. Aktivace dendritických buněk zprostředkovaná „Toll-like“ receptory nepůsobí pouze na vrozené imunitní odpovědi, ale rovněž na následující reakce získané/adaptivní imunity. „Toll-like“ receptory zahajují antigenně specifickou fázi imunitní odpovědi.

Některé z těchto receptorů mohou být stimulovány endogenními ligandy, tzn. molekulami organismu vlastními, které se uvolňují například při stresovém nebo nekrotickém poškození tkáně a slouží jako „signály nebezpečí“. „Toll-like“ receptory

mohou být lokalizovány na povrchu buněk nebo v intracelulárních membránách. Jejich aktivací se spouští exprese prozánětlivých cytokinů (např. IL-1, IL-6, TNF, IL-8) a některých adhezivních a kostimulačních molekul/receptorů na povrchu antigen prezentujících buněk.

„Navázání určitých patogenních molekul na „Toll-like“ receptory vede k aktivaci antigen prezentující buňky a následné aktivaci T-lymfocyty. Antigen prezentující buňka pohltí antigen endocytózou a zpracuje (znehodnotí) jej na peptidy schopné indukovat imunitní odpověď, které jsou předloženy receptorům T-lymfocytů (TCR) v polymorfní molekulární „kapse“ velkého histokompatibilního komplexu (MHC) II. třídy po jejich objevení se na buněčném povrchu (což je up-regulováno aktivací „Toll-like“ receptorů). Interakce mezi antigen prezentující buňkou a T-lymfocytem (zahrnujíc expresi kostimulačních molekul jako například CD80 a CD86 na buněčném povrchu, které jsou rovněž up-regulovány aktivací „Toll-like“ receptorů) má obvykle za následek buněčnou aktivaci a diferenciaci. Cytokiny produkované antigen prezentujícími buňkami (stimulované aktivací „Toll-like“ receptorů) a T-lymfocyty mají za následek zánět a aktivaci dalších komponent imunitního systému.“ (Gleeson, 2007).

2.2.1 Kostimulační molekuly

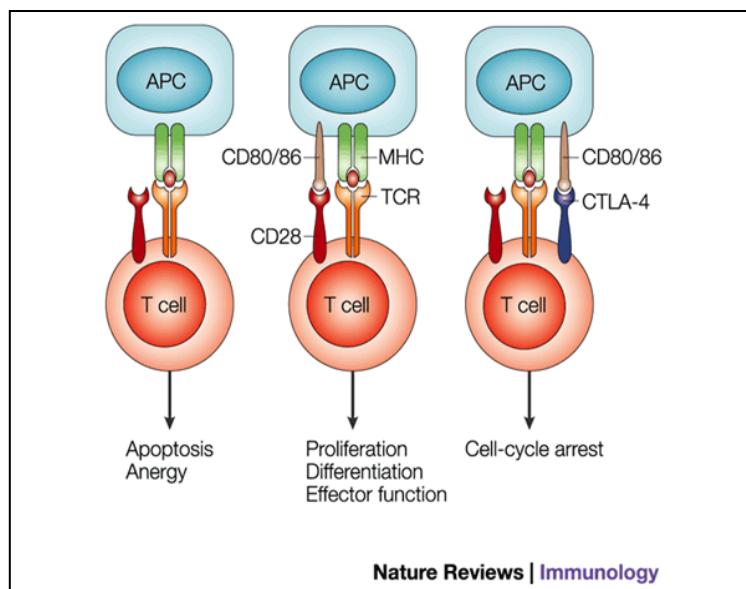
Pro identifikaci a výzkum kostimulačních molekul, molekul přítomných na buněčném povrchu leukocytů, je používán protokolárně cluster of differentiation (klastr specifikace, často zkrácený na CD). CD molekuly mohou působit mnoha způsoby, často jako receptory nebo ligandy (molekuly, které aktivují receptory) důležité pro buňku. Signalizační kaskáda je obvykle zahájena prováděním změn v chování buněk.

Protein CD80 (Cluster of Differentiation 80) je molekula nalézaná na aktivovaných B-buňkách a monocytech, která poskytuje kostimulační signál nezbytný pro aktivaci a přežití T-buněk. Také je znám jako B7.1. Protein CD86 (Cluster of Differentiation 86) je molekula exprimovaná na antigen-prezentujících buňkách, která obstarává kostimulační signály důležité pro aktivaci a další existenci T-buněk. Jde o ligand pro dva proteiny na povrchu T-buněk, CD28 antigen a cytotoxický T-lymfocyt associated protein 4 (CTLA-4). CD86 je také označován B7.2. Hlavní způsob působení CD86 je v navázání se na protein CD28. Společně s CD80 obstarává kostimulační molekula CD86 nezbytné podněty pro primární (naivní) T-lymfocyty proti antigenům prezentovaným antigen-prezentujícími buňkami.

2.2.2 Mechanismus působení dendritických buněk

Antigenní částice (mikroorganismy resp. jejich fragmenty) jsou nejprve pohlceny tkáňovými dendritickými buňkami. Dendritické buňky jsou pak stimulovány, hlavně prostřednictvím lektinových a „Toll-like“ receptorů a pomocí zánětlivých cytokinů, k migraci do nejbližší lymfatické uzliny a k přeměně ve zralé dendritické buňky, které fungují jako tzv. profesionální buňky prezentující antigen (APC, antigen prezentující buňky). Takové zralé dendritické buňky mají na svém povrchu velké množství MHC, resp. HLA, proteinů, které „vystavují“ fragmenty mikrobiálních antigenů. Na povrchu zralých dendritických buněk (antigen prezentujících buněk) se objevuje také několik tzv. kostimulačních molekul (např. CD80, CD86, CD40) a tyto buňky produkují i řadu membránových a rozpustných cytokinů, jakýchsi imunitních hormonů. Fragmenty antigenů navázané na MHC (HLA) proteiny jsou pak rozeznány T-lymfocyty, které mají na svém povrchu „správné“ T-receptory. Signály, které dostane T-lymfocyt od antigen prezentující buňky přes svůj T-receptory, jakož i přes receptory pro kostimulační molekuly (CD28, CD40L, ICOS) a

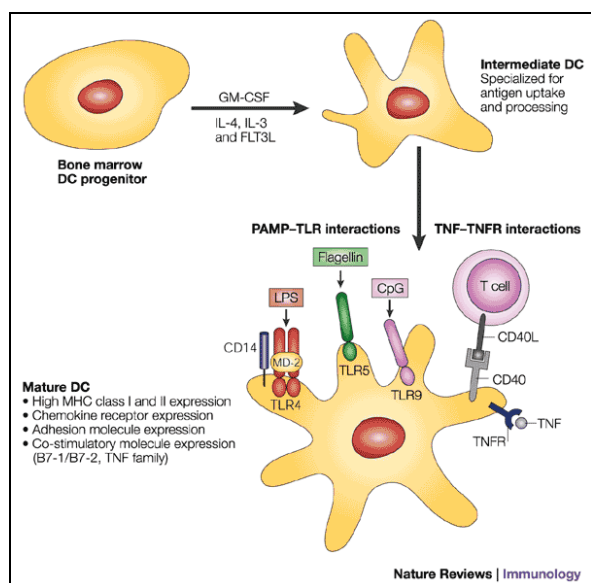
receptory pro cytokiny (např. IL-1, IL-4, IL-12) pak vyvolají pomnožení příslušného klonu T-lymfocyту a diferenciaci na zralé, efektorové buňky. Je třeba poznamenat, že interakce mezi antigen prezentující buňkou (APC) a T-lymfocytem není tak zcela jednostranná (APC pouze jako pasivní předkladatel a stimulátor), nýbrž že aktivovaný T-lymfocyt také stimuluje zralou dendritickou buňku a dále zlepšuje jejich schopnosti prezentovat antigeny a stimulovat jiné T-lymfocyty. Další dosud ne zcela dořešenou komplikací je to, že zřejmě existuje několik typů (snad jen diferenciačních stádií) dendritických buněk, které mají velmi rozdílné stimulační vlastnosti – některé preferenčně stimuluji diferenciaci pomocných T-lymfocytů typu 1 (T_H1) a cytotoxických T-lymfocytů (T_c), jiné pomocných T-lymfocytů typu 2 (T_H2) či tzv. regulačních buněk. Pokud antigen prezentující buňka nemá dostatek kostimulačních molekul, vede stimulace přes T-receptory k apoptotické smrti T-lymfocyту nebo k jeho útlumu (anergie). Důležitou regulační úlohu hrají „negativní kostimulační receptory“ (např. CTLA-4), které potlačují příliš silnou kostimulaci.



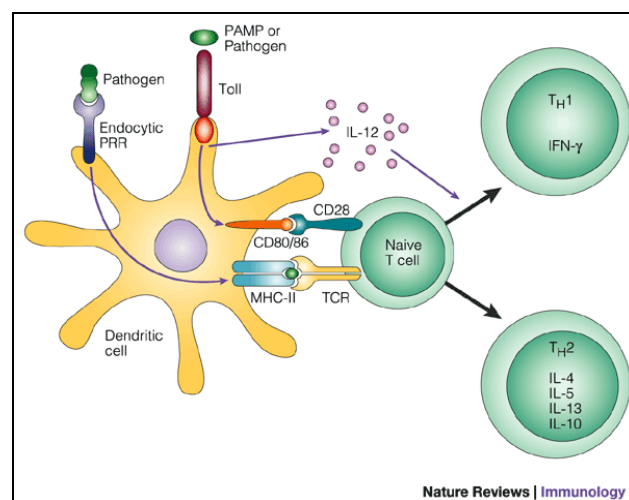
Obrázek 2 – Osud T lymfocytů po kontaktu s buňkami prezentujícími antigen (převzato z Nature Reviews Immunology)

Souhrnem lze říci, že pokud dojde k optimální interakci (signály přes T-receptor a kostimulační receptor CD28), T lymfocyt proliferuje a diferencuje se na příslušnou efektorovou buňku (T_c , T_H). Pokud APC nemá kostimulační ligandy, samotný signál přes T-receptor vede k apoptose nebo útlumu (anergii). Pokud převáží kostimulační signály od negativních regulátorů (CTLA-4), dělení a diferenciace se zastaví (obrázek 2).

Dendritické buňky jsou zásadně důležitým spojovacím článkem mezi adaptivní a antigenně-specifickou částí imunitního systému. Jak již bylo řečeno, tkáňové nezralé dendritické buňky musí být nejprve stimulovány k maturaci, aby se z nich staly účinné buňky prezentující antigen (APC). Tento děj je považován za klíč k fungování antigenně specifických mechanismů (obrázek 3a, 3b). Na této úrovni se zřejmě primárně rozhoduje,



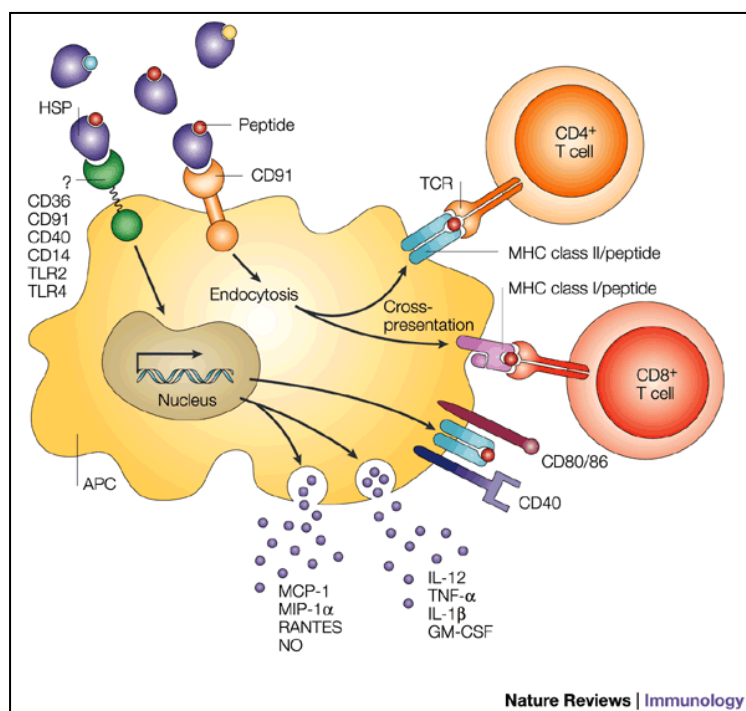
Obrázek 3a – Maturace a stimulace dendritické buňky (převzato z Nature Reviews Immunology)



Obrázek 3b – Maturace dendritické buňky a její stimulace diferenciace efektorových T-lymfocytů (převzato z Nature Reviews Immunology)

proti kterým cizorodým strukturám bude imunitní odpověď vůbec zahájena. Je totiž známo, že k iniciaci intenzivních imunitních reakcí obvykle nestačí, aby daná struktura byla cizorodá, ale aby byla rozpoznána jako „nebezpečná“, tj. aby současně dostal imunitní

system nějaký „signál nebezpečí“. Po stimulaci signály „nebezpečí“ („Toll-like“ receptorů, receptorů zánětlivých cytokinů) a další stimulaci přes receptor CD40 dojde k maturaci dendritické buňky a přeměně v optimální antigen prezentující buňku (APC) stimulující diferenciaci efektorových T lymfocytů. Tyto signály nebezpečí mohou být dvojího druhu – exogenní a endogenní. Jako silné exogenní signály nebezpečí působí struktury široce asociované s patogenními mikroorganismu, tedy stejné struktury, které aktivují neadaptivní imunitní mechanismy (lipopolysacharidy, prokaryotická DNA, dvojvláknová RNA). Jako endogenní signály nebezpečí působí některé vnitrobuněčné molekuly, zvláště stresové proteiny, které se uvolní z buňky umírající nefyziologickým způsobem, tj. nekroticky (obrázek 4). Exogenní či endogenní indikátory nebezpečí se váží na receptory



Obrázek 4 – Stimulace buňky prezentující antigen pomocí „endogenních signálů nebezpečí“, stresových proteinů (převzato z Nature Reviews Immunology)

dendritických buněk (TLR receptory, lektinové receptory, receptory stresových proteinů) a vyvolávající signály vedoucí k diferenciaci na zralé dendritické buňky. Z poškozených nekrotických buněk se uvolňují stresové proteiny, jež nesou různé peptidové fragmenty jiných proteinů (podobně jako MHC molekuly) a váží se na signalizační a endocytické receptory. Výsledkem těchto vazeb je maturace antigen prezentující buňky, produkce stimulačních cytokinů, exprese kostimulačních molekul a účinná stimulace diferenciaci efektorových T-lymfocytů. Teprve zralé dendritické buňky jsou totiž schopné účinně stimulovat diferenciaci antigenně specifických T lymfocytů.

Dojde-li k poškození tkání traumatem nebo infekcí nebo pokud jsou tkáně pozměněny maligní transformací, následuje uvolnění zánětlivých cytokinů a dalších buněčných produktů. Tyto stimuly, ať již z tkání (endogenní) nebo jako mikrobiální produkty (exogenní), aktivují místní dendritické buňky a také podporují získávání dendritických buněk cirkulujících v oběhu do tohoto místa. Cirkulující dendritické buňky jsou vzácné a představují méně než 1% mononukleárních buněk v periferní krvi. Dendritické buňky aktivně zachycují a zpracovávají antigeny a pak migrují lymfatickými cestami do drenážních uzlin. „V lymfatických uzlinách prezentují zpracované antigeny T- a B-lymfocytům, aby iniciovaly primární nebo stimulovaly sekundární imunitní odpověď. Jako takové hrají centrální roli v imunitním dozoru, podstatné části obrany a protektivních mechanismů proti infekcím a malignitě.“ (Ho, López, Vuckovic, Pyke, Hockey, Hart, 2001).

„Dendritické buňky nejsou zásadními aktéry pouze ve vytváření účinné imunitní odpovědi, ale také v indukci tolerance. Oba typy dendritických buněk, nezralé i zralé, navozují klonální expanzi, ale v různých stádiích zrání fungují různě. Zralé dendritické buňky způsobují odpověď pomocných T-lymfocytů typu 2 (T_H2), nezralé dendritické buňky vyvolávají buď regulační T-buněčnou odpověď nebo reakci pomocných T-lymfocytů typu 1

(T_H1), což závisí na vlastnosti antigenu a přítomnosti nebo absenci IL-10.“ (Bharadwaj, Bewtra, Agrawal, 2007).

2.3 Vliv fyzické zátěže na imunitu

Cvičení může mít jak pozitivní, tak negativní účinky na imunitní systém. Což se projevuje jako zvýšení odolnosti nebo naopak náchylnosti k méně významným infekcím, jako je nachlazení nebo virové (chřipkové) onemocnění. „Vztah mezi cvičení a přecitlivělostí k infekcím je modelován křivkou tvaru „J“. Takový model naznačuje, že zatímco zařazení rozumné fyzické aktivity může zvýšit imunitní funkce nad úroveň při sedavém způsobu života, nadměrné množství dlouhotrvajícího a vysoce intenzivního cvičení může imunitní funkce porušit.“ (Gleeson, 2007). I když je k dispozici relativně málo důkazů, které by naznačovaly, že existují nějaké klinicky signifikantní rozdíly v imunitních funkcích mezi osobami se sedavým způsobem života a rozumně cvičícími, jsou známa dosti přesvědčivá epidemiologická data, že mírná habituální fyzická zátěž je spojena s poklesem incidence infektů. V kontrastu s tímto je udáváno 100-500% zvýšení rizika onemocnění v několika týdnech (cca 3 týdnech) následujících po extrémním vytrvalostním závodu (např. maratónu). „Pravidelné mírné/rozumné cvičení je, v porovnání se zcela sedavým způsobem života, spojeno s redukcí incidence infektů. Nicméně prolongované periody usilovného/namáhavého cvičení způsobují přechodné snížení různých aspektů imunitních funkcí (např. vyplavení neutrofilů v dýchacím ústrojí, proliferaci lymfocytů, prezentaci antigenu), které obvykle trvá přibližně 3 až 24 hodin po cvičení a závisí na intenzitě a trvání cvičební jednotky.“ (Gleeson, 2007).

Mnoho studií udává, že funkce různých imunitních buněk jsou přechodně porušeny následkem dlouhotrvajícího kontinuálního namáhavého cvičení a u sportovců zapojených do period vyčerpávajícího tréninku vykazují větší náchylnost k infekcím. U sportovců jsou mnohem častější bolesti v krku a chřipce podobné symptomy než v běžné populaci a kromě toho u nich může nachlazení přetrvávat delší dobu. Opakující se dlouhotrvající intenzivní fyzická zátěž může způsobit pokles počtu cirkulujících leukocytů, což zřejmě souvisí se zvýšením hladin stresových hormonů během cvičení a vyplavení nedozrálých leukocytů z kostní dřeně. Existuje domněnka, že imunosuprese způsobená cvičením může být zapříčiněna také poklesem koncentrace glutaminu v periferní krvi. Během cvičení také stoupá produkce reaktivních sloučenin kyslíku a některé imunitní funkce mohou proto být porušeny vlivem nadbytku volných radikálů.

„Cvičení vyvolává imunologicky „nebezpečný“ stres a zánětlivou odpověď, která se může stát neregulovanou a zdraví škodlivou. Při nebezpečném cvičení je narušena normální rovnováha mezi pro- a proti-zánětlivými odpověďmi. Možný patofyziologický mechanismus je charakterizován koncepcí, která předpokládá, že cirkulující leukocyty jsou k imunitnímu stimulu fyzické zátěže vnímavější než normálně.“ (Cooper, Radom-Aizik, Schwindt, Zaldivar, 2007).

Cooper, Radom-Aizik, Schwindt, Zaldivar ve svém souhrnném článku týkajícím se nebezpečnosti cvičení uvádí jako pozoruhodné, že téměř ve všech případech tzv. nebezpečného cvičení hrají významnou roli s ním související stres, zánětlivé procesy a imunitní systém. Cvičení vede k masivní zánětlivé odpovědi charakterizované mobilizací leukocytů a vzestupem jejich počtu v centrální cirkulaci, přibýváním účinných mediátorů zánětu jako je IL-6, produkovaného imunitními buňkami, různými tkáněmi a přímo aktivní svalovou tkání, v cirkulaci. Jednotlivé periody cvičení vedou ke zvýšení počtu cirkulujících leukocytů a dokonce kmenových buněk. Lymfocyty, monocyty a NK-buňky reagují

s prudkým začátkem cvičení rychlým vzestupem, ale začínají klesat okamžitě po jeho skončení. Hladina cirkulujících neutrofilních granulocytů se zvyšuje pomaleji a může zůstat zvýšena až několik hodin po konci cvičení.

Norman a Pedersen ve svém článku uvádějí, že vrozená (nespecifická) imunita odpovídá rozdílně na chronický stres intenzivního cvičení, NK buňky mají tendenci ke zvyšování počtu, zatímco funkce neutrofilních granulocytů je potlačena. Přestože byly u sportovců pozorovány znatelné změny v úrovni a funkční aktivitě imunitních parametrů, badatelé zaznamenaly nepatrnou spojitost s vyšší incidencí infekcí a nemocí. Po dlouhotrvající (prolongované) zvýšené námaze se projevují změny v mnoha složkách imunitního systému. Podle teorie „otevřeného okna“ může během období pozměněné imunity (což může trvat 3 až 72 hodiny, Gleeson udává 3 až 24 hodin) vzrůst riziko subklinických a klinických projevů infekce. Žádná seriózní studie zatím nedemonstrovala, že sportovci vykazující vyšší míru imunosuprese po těžké námaze jsou ti, kteří onemocní během následujícího týdne dvou. Zvýšení fagocytózy granulocytů a monocytů v krvi a IL-6 naznačuje silnou prozánětlivou odpověď, zatímco vzestup kortizolu a receptorů antagonistů IL-1 ukazuje na současnou protizánětlivou reakci. Imunitní systém je tedy potlačen a stresován. Nebezpečí respiračního onemocnění se tak může zvyšovat, pokud sportovci procházejí opakovanými cykly vysokého zatížení, jsou vystaveni novým patogenům a jiným stresorům (např. nedostatku spánku, těžkému psychickému stresu, malnutrici). Imunitní systém je cvičením ovlivňován aktuálně a jenom v menší míře chronicky. Cvičení v rozumné míře zlepšuje „dohled nad imunitou“ a ochranu proti infekcím horních cest dýchacích, kdežto vysoká zátěž sportovců vede k přechodné imunosupresi a zvýšení rizika výskytu infekcí.

Gomez-Merino, Chennaoui, Burnatt, Drogou a Guezennec zaměřili svoji studii na pozorování imunitních a hormonálních změn následujících po vojenském výcviku. Zjistily,

že dlouhotrvající zátěž jako je vojenský výcvik způsobuje změny v imunitním systému a) potlačením slizniční humorální imunity, odrážející se v redukcii slinného IgA a poměru IgA/protein, b) uvolněním plazmatického IL-6, prozánětlivého cytokinu. Program vojenského výcviku je jednotná a předvídatelná síla stresorů a homogenita a dobré zdraví vojáků zajišťuje jedinečnou příležitost pro vyšetření hormonálních a imunologických efektů chronického stresu, který vede ke stavu energetického deficitu. Zhoršená buněčná imunitní odpověď byla zaznamenána po osmi týdnech stresujícího vojenského výcviku. Úbytek energie během vojenského cvičení se jevil být hlavním faktorem měnícím in vitro lymfatické proliferativní procesy. Sledovaný vzestup hladiny plazmatického IL-6 je v souladu s nálezy změn úrovně cytokinů závislých na cvičení. Mírné, ale znatelné zvýšení IL-6 představuje zánětlivý fenomén. Zvýšení hladiny plazmatického IL-6 je považováno za následek aktivace sympatického nervového systému prolongovaným cvičením. Slezina opravdu produkuje více než 50% celkového cirkulujícího IL-6, thymus a ostatní orgány imunity jsou silněji inervovány sympatickým nervovým systémem. Předpokládá se, že aktivace sympatického nervového systému stimuluje produkci a/nebo sekreci IL-6. IgA je uvolňován z plazmatických buněk pod epitelem acinů ve slinných žlázách a transport IgA přes epiteliální bariéru vyžaduje sekreční komponentu. Sympatický nervový systém je pravděpodobný kandidát pro modulaci slinného IgA. Omezení sekrece IgA naznačuje a) že minimálně jeden z procesů týkajících se transportu a sekrece IgA by mohl být ovlivněn tréninkem nebo b) možný vliv sympatického nervového systému. Vojenský výcvikový program má imunosupresivní účinek na mukózní systém spolu s uvolněním prozánětlivého cytokinu IL-6, jednoho z nejsilnějších mediátorů akutní fáze odpovědi, do oběhu. Imunosupresivní a zánětlivý účinek tréninku může být způsoben hormonální činností. Trénink indukuje uvolnění norepinephrinu jako důsledku stimulace nervových zakončení sympatického systému. Vojenský výcvik redukoval hladinu dvou

imunomodulujících hormonů – dehydroepiandrosteron-sulfátu (DHEAs) a prolaktinu. Spojení mezi nízkou hladinou DHEAs a zvýšením IL-6 v krvi může být zodpovědné za zjištění, že DHEA zvyšuje aktivitu pomocných T-lymfocytů typu 1 (T_H1) podtypu CD4 buněk a v důsledku toho udržuje rovnováhu mezi pomocnými T-lymfocyty typu 1 (T_H1) a pomocnými T-lymfocyty typu 2 (T_H2) CD4 buňkami. Snižující se hladina DHEAs může rozrušit rovnováhu mezi Th1 a Th2 CD4 buňkami, které produkují IL-6. Prolaktin působí jako imunostimulační mediátor během odpovědi na stres u okolí a psychický stres. Byly popsány snížené hladiny prolaktinu po jednoduchém vojenském kurzu, jež jsou považovány za chronický fenomén vázající se na stres, který může způsobit imunosupresi.

Výsledky po sedmiměsíčním tréninku elitních plavců, vystavených dlouhodobému tréninku intenzivní úrovně, které zkoumali v roce 1995 Gleeson, MacDonald, Cripps, Pyne, Clancy a Frickem, ukázaly signifikantní potlačení IgA, IgG a IgM v séru a koncentrace slinného IgA. Během tréninkové sezóny nebyly sledovány žádné významné změny v číslech nebo procentech podtypů B nebo T buněk, ale jak v číslech tak v procentech byl významný pokles NK buněk. Protrahované potlačení imunity spojované s prolongovaným tréninkem může určovat náchylnost k infekcím, zvláště v období hlavních závodů. Studie provedená na vysoce trénovaných elitních plavcích ukázala potlačení imunitních parametrů: a) nižší sérové hladiny IgA, IgG a IgM a tendenci ke snížení hladin podtypu IgG2; b) průměrný pokles hladiny slinného IgA po individuální tréninkové dávce; c) propad v počtu NK buněk po sedmiměsíční tréninkové sezóně, procenta lymfocytů a hladin slinného IgA před i po cvičení. V periferní krvi nebyly žádné změny v počtu B buněk, podtypů T buněk. Ačkoli byly hladiny sérových imunoglobulinů v referenčním rámci normální populace, hodnoty všech tří hlavních typů byly pod 10. percentilem. Znatelný pokles počtu NK buněk po cvičení vyjadřuje podle některých autorů akutní reakci na zátěž, může reflektovat fyziologickou redistribuci NK buněk z periferní krve během intenzivního

tréninku, a že hladina NK buněk se dostává na původní úroveň během 24 hodin. Vzorky krve zpracované v rámci výše zmiňované studie odebrané déle než po 24 hodinách naznačují, že pokles počtu a procent NK buněk je pravděpodobně odrazem prodlužovaného potlačení imunity spíše než akutní odpovědí. Intenzivní cvičení je následováno poklesem slinného IgA. Intenzivní trénink chronicky ovlivňuje, vedle potlačení systémové imunity, hodnoty slinného IgA. Ve fázi před závody, na konci sedmiměsíční tréninkové sezóny, byl častější výskyt IgM ve slinách, což naznačuje, že sekrece IgM může být kompenzačním mechanismem potlačení IgA, které následuje po dlouhodobém tréninku. Nedostatek kompenzace IgM může u vrcholových sportovců zvýšit náchylnost k respiračním infekcím. Tato studie opatřila důkaz o tom, že u skupiny elitních plavců dochází k potlačení systémové i mukózní (slizniční) imunity. Mechanismus imunoprese není znám, ale může být zprostředkován hormonálními změnami spojenými s vyčerpávajícím cvičením.

Těžká zátěž má akutní i chronický vliv na systémovou imunitu. Mnoho složek imunitního systému vykazuje nepříznivé změny po dlouhotrvající těžké zátěži.

Akutní imunitní odpověď: teorie „otevřeného okna“ – změny komponent imunity, které mohou trvat od 3 do 72 hodin, období během něhož mohou viry a bakterie se mohou „uchytit“, vzrůstá riziko subklinických a klinických projevů onemocnění.

Na dlouhotrvající těžkou zátěž reaguje mnoho složek imunitního systému. Některé z nich, které uvádí Nieman ve svém souhrnném článku:

- vysoká hladina plazmatického kortizolu způsobuje vysokou hladinu neutrofilů a nízké hodnoty lymfocytů v krvi;
- vzrůst granulocytární a monocytární fagocytózy v krvi, ale pokles nasální neutrofilové fagocytózy;
- pokles koncentrace nasálního a slinného IgA;

- pokles nasální mukociliární clearance;
- pokles granulocytární a makrofágové oxidativní ničivé (smrtící) aktivity;
- pokles cytotoxické aktivity NK buněk;
- pokles proliferace lymfocytů indukované mitogenní aktivitou;
- zmenšení opožděné hypersenzitivní reakce kůže;
- zvýšení plazmatické koncentrace před- a pozánětlivých cytokinů;
- otupělá exprese histokompatibilního komplexu (MHC) II. třídy a prezentace antigenu makrofágům.

„Riziko propuknutí infektu může být zvýšeno, pokud sportovci procházejí opakovanými cykly vysoké zátěže, jsou vystaveni novým patogenům a dalším stresorům imunitního systému, zahrnujícím nedostatek spánku, těžký (náročný) mentální stres, malnutrici nebo pokles hmotnosti.“ (Nieman, 2000).

Dohi, Kreamer a Mastro zjistili, že cvičení zvyšuje expresi prolaktinových receptorů na lymfocytech. Během stresu dochází k vzrůstu plazmatické hladiny prolaktinu; imunitní systém je vnímavý na prolaktin a ovlivnitelný stresem. Plazmatická koncentrace prolaktinu znatelně roste jako odezva akutního aerobního cvičení a pozitivně koreluje s celkovou expresí prolaktinových receptorů B-lymfocytů. Cvičení navíc znatelně zvyšuje celkový počet cirkulujících B-lymfocytů. Další možný mechanismus exprese prolaktinových receptorů indukovaných cvičením může být zprostředkován kortizolem, který je znám jako imunosupresivum. Je dobře známo, že vysoká intenzita cvičení zvyšuje koncentraci kortizolu. Během maximální zátěže tudíž zvyšování prolaktinu může působit proti účinkům glukokortikoidů, aby byla udržena imunitní homeostáza. Důležitost exprese prolaktinových receptorů je v regulaci buněčné funkce a je dána jaterní expresí receptorů prolaktinu a vzestupem proliferace lymfocytů. Receptory prolaktinu jsou přítomny na malém množství nonB-lymfocytů (CD19⁺), T-lymfocytech a NK buňkách. Zvýšená hladina plazmatického

prolaktinu se dostává na základní hladinu během hodiny po cvičení. Studie dokazují, že v reakci na zátěž dochází ke zvýšení produkce protilátek nebo koncentrace sérových imunoglobulinů. Fyzická zátěž může zlepšit interakci mezi cílovými imunitními buňkami a prolaktinem, hormonem schopným stimulovat imunitní systém. Vědomí cvičením indukované imunoregulace může usnadnit porozumění komunikaci mezi endokrinním a imunitním systémem.

Mooren, Blöming, Lechtermann, Lerch a Völker sledovali v závislosti na fyzické zátěži chování lymfocytů. Po vyčerpávajícím i mírném cvičení dochází k apoptóze lymfocytů v periferní krvi. Apoptóza nebo programovaná buněčná smrt je nezbytně důležitý proces regulace imunitní odpovědi. Apoptóza je zahrnuta do cvičením indukovaných změn v imunitním systému podobně jako potréningová lymfocytopenie. Změny v apoptických buňkách jsou malé a mohly by být proto jenom částečně důvodem cvičením způsobené lymfocytopenie. Několik nedávných studií ukázalo, že vyčerpávající fyzická zátěž způsobuje poškození DNA v leukocytech. Irreparabilně poškozené imunitní buňky jsou eliminovány apoptózou. Lymfocytární apoptóza se vyskytuje u přibližně 60% lymfocytů ihned (okamžitě) po cvičení vysoké intenzity.

Už v roce 1984 byl Edwardem, Baconem, Elmsem, Verardim, Felderem a Knightem po cvičení pozorován znatelný vzestup počtu cirkulujících antigen prezentujících buněk spojených s aktivitou NK buněk a rovněž T-buněk. Cvičení zvyšuje počet NK buněk v periferním oběhu. Příliv se zdá být dočasný, protože hodinu po cvičení se aktivita NK buněk vrací na hodnoty před cvičením.

Po cvičení vzrůstá počet buněk s nízkou hustotou – makrofágů a dendritických buněk v periferní krvi úměrně počtu lymfocytů.

Důvod zvýšeného výskytu infekčních onemocnění u vrcholových sportovců je pravděpodobně multifaktoriální. Společné působení rozličných stresorů (fyzického,

psychického, nebo stresu způsobeného prostředím a stresu nutričního) může potlačit imunitní funkce. Kromě toho je nutné brát v potaz i fakt, že během cvičební zátěže je, v důsledku vyšší frekvence dýchání a prohloubení dechu, zvýšeno ohrožení organismu patogeny nesenými vzduchem. Účinky stresorů dohromady s vystavením patogenům mohou u sportovců zapříčinit větší náchylnost k infekcím.

2.3.1 Vliv fyzické zátěže na změnu počtu cirkulujících dendritických buněk

Ho, López, Vuckovic, Pyke, Hockey a Hart zveřejnili v roce 2001 výsledky studie, která byla založena na hypotéze, že významný stres jako je chirurgický výkon a cvičení může navodit měřitelné změny v počtu dendritických buněk, jejich podskupinách, fenotypu a funkci. Autoři této studie vycházeli ze znalostí, že dendritické buňky jsou klíčovými antigen-prezentujícími buňkami, které iniciují a řídí imunitní odpověď. Tyto buňky jsou produkovány v kostní dřeni, cirkulují krví a vstupují do tkání a sliznic, aby působily jako „strážci imunity“. Zjistili, že stres ve formě operačního výkonu mění počet dendritických buněk nezávisle na počtu monocytů. Cvičení také indukuje vzestup počtu dendritických buněk, avšak současně s počtem monocytů. Stres způsobený fyzickou zátěží zvyšuje počet dendritických buněk pomaleji a paralelně se zvyšováním hladin monocytů. Data v této a jiných studiích naznačují, že krevní hladiny dendritických buněk a monocytů jsou regulovány rozdílně v závislosti na fyziologických okolnostech. Nicméně je důležité, že počet dendritických buněk stoupá koordinovaným způsobem společně s lymfocyty, podle nominální hodnoty, což může být interpretováno jako koordinovaná produkce/mobilizace dvou klíčových, navzájem se ovlivňujících komponent imunitní odpovědi. Překvapivě nebyly ani v jedné z těchto stresových situací zjištěny žádné fenotypické nebo funkční aktivity. V obou situacích, jak při operačním výkonu tak při fyzické zátěži, jsou

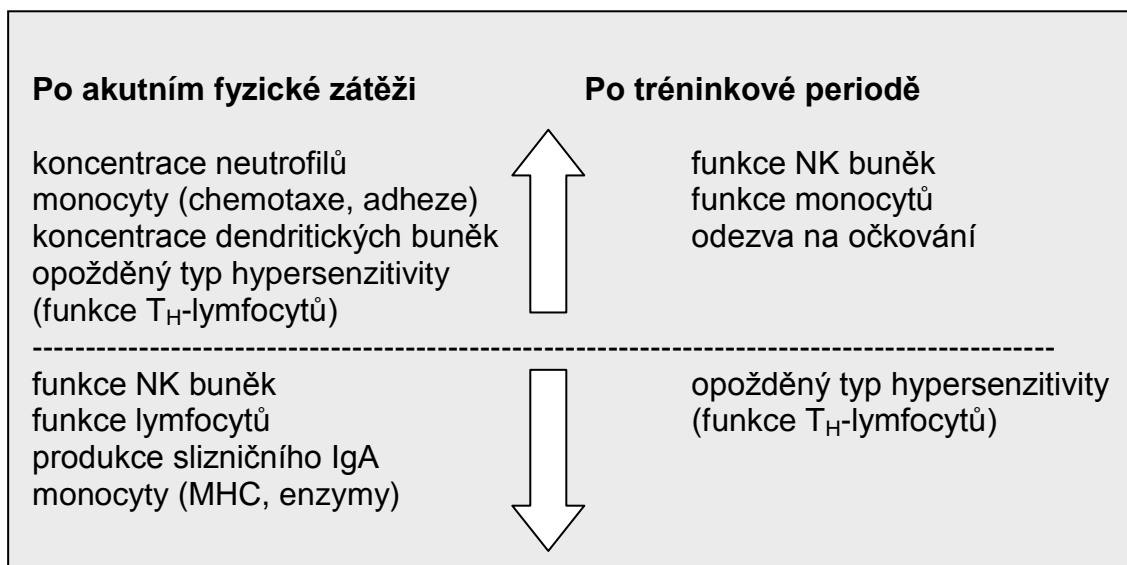
dendritické buňky rychle mobilizovány do krevního oběhu jako odpověď na stres, který může sloužit k přípravě imunitní obrany. Reakce na stres je kromě změny počtu dendritických buněk doprovázena leukocytózou v periferním krevním oběhu. Tyto změny jsou zapleteny do imunosupresivního efektu stresu z fyzické zátěže.

Kromě změn v počtu dendritických buněk vázaných na stres, byl citovanou studií prokázán statisticky nesignifikantní vzestup počtu dendritických buněk ve vzorcích odebraných zdravým jedincům v různých časových obdobích během dne. Tento vzorec může představovat cirkadiánní variaci počtu dendritických buněk v krvi, pro ostatní populace leukocytů pevně stanovený fenomén.

Ze studie výše zmíněných autorů vyplývá, že ačkoli se různé formy stresu, v tomto případě stres v podobě chirurgického operačního výkonu a fyzické zátěže, nedají přímo srovnávat, byly u nich dokumentovány podobné změny imunologických a endokrinních parametrů.

Liao, Chiang, Yen, Chen, Zhuang a Lai zkoumali vliv periodického tréninku a aktivního rekonvalescentního programu na protinádorovou aktivitu a vývoj dendritických buněk. Studii prováděli na cvičící a kontrolní, resp. necvičící, skupině, jejichž výsledky pak porovnávali. Autoři tohoto projektu došli k závěru, že počet dendritických buněk významně vzrostl u skupiny cvičících, ale nebyly nalezeny žádné signifikantní změny v expresi povrchových antigenů CD80 a CD86. Pozorování trvalo 5 týdnů a bylo z něj vyvozeno, že periodický trénink se začleněním aktivní rekonvalescence podporuje množství a vývoj dendritických buněk a zvyšuje aktivitu dendritických buněk proti nádorovým buňkám.

„Fyzická zátěž (cvičení) indukuje významný a reproduktibilní vzestup počtu dendritických buněk. Mediátory zapojené v tomto procesu pak mohou být zajímavé jako potenciální mobilizátoři dendritických buněk pro imunoterapeutické programy.“ (Ho, López, Vuckovic, Pyke, Hockey, Hart, 2001).



Obrázek 5 – Shrnutí sledovaných imunologických změn spojených s fyzickou zátěží demonstrující jak vzestup tak pokles imunitních funkcí (převzato od Malm, 2004)

2.3.2 Přehled akutních vlivů cvičení na imunitní funkce

Jednorázové fyzické zatížení v podobě dlouhotrvajícího usilovného cvičení má dočasný depresivní vliv na imunitní funkce. Akutní fyzická zátěž je doprovázena reakcemi, jež jsou v mnoha aspektech nápadně podobné těm, které navozuje infekce, sepe nebo trauma. Dochází ke značnému zvýšení počtu cirkulujících leukocytů (hlavně lymfocytů a neutrofilů) jak v závislosti na intenzitě tak na době trvání zátěže. Akutní zátěž doprovází také vzestup hodnot plazmatické koncentrace substancí majících vliv na leukocytární funkce, zahrnující zánětlivé cytokiny jako jsou TNF- α (tumor necrosis factor- α), makrofágový zánětlivý protein-1 a IL-1 β , protizánětlivé cytokiny IL-6, IL-10 a receptory antagonistů IL-1 (IL-1ra) a proteiny akutní fáze včetně C-reaktivního proteinu (CRP).

V odpovědi na cvičení se vyskytují také změny v hladinách hormonů. Jde o vzestup plazmatické koncentrace adrenalinu, kortizolu, růstového hormonu a prolaktinu, majících imunomodulační efekt.

IL-6 zaznamenává během cvičení značný vzestup koncentrace v plazmě. To lze vysvětlit jeho uvolňováním z kontrahujících se svalových vláken. Ze svalů získaný IL-6 se zdá být přinejmenším částečně odpovědný za zvýšenou sekreci kortizolu během dlouhotrvajícího fyzické zátěže. Vedle tohoto účinku IL-6 bylo v poslední době prokázáno, že relativně malý vzestup hladiny plazmatického IL-6 indukuje zmnožení dvou protizánětlivých cytokinů, a to IL-1ra a IL-10, jelikož zvýšení ze svalů získaného IL-6 předchází přibývání cytokinů, čímž se z IL-6 stává iniciátor této odpovědi.

Současně se zvýšením hodnot IL-6, IL-1ra a IL-10 zapřičiňuje působení vysilujícího cvičení pokles procentuelního zastoupení pomocných T-lymfocytů typu 1 (T_H1), zatímco procento pomocných T-lymfocytů typu 2 (T_H2) zůstává nezměněno. Zatímco kortizol a adrenalin potlačují produkci pomocných T-lymfocytů typu 1, IL-6 naopak stimuluje pomocné T-lymfocyty typu 2. Fyzická zátěž tedy ovlivňuje rovnováhu mezi produkcí cytokinů pomocnými T-lymfocyty typu 1 a typu 2. IL-6 dále způsobuje potlačení produkce TNF- α , silného spouštěče zánětu.

Ze studií sledujících vliv cvičení na imunitní funkce lze vyvodit, že odpovědnost za imunitní reakce vyvolané cvičením nese z velké části již výše zmiňovaný IL-6. Zvýšené systémové hladiny IL-6 během fyzické zátěže a následující cvičení mohou být označeny za jeden z mechanismů, kterým pravidelné cvičení poskytuje ochranu před vývojem chronického onemocnění (kardiovaskulárního a/nebo metabolického).

Akutní namáhavá fyzická zátěž vyvolává vzestup počtu cirkulujících NK-buněk (natural killers), ovšem po cvičení následuje jejich pokles až na méně než polovinu klidových hodnot. Na normální hladiny se NK-buňky obvykle vrací během 24 hodin. Pokud se jedná

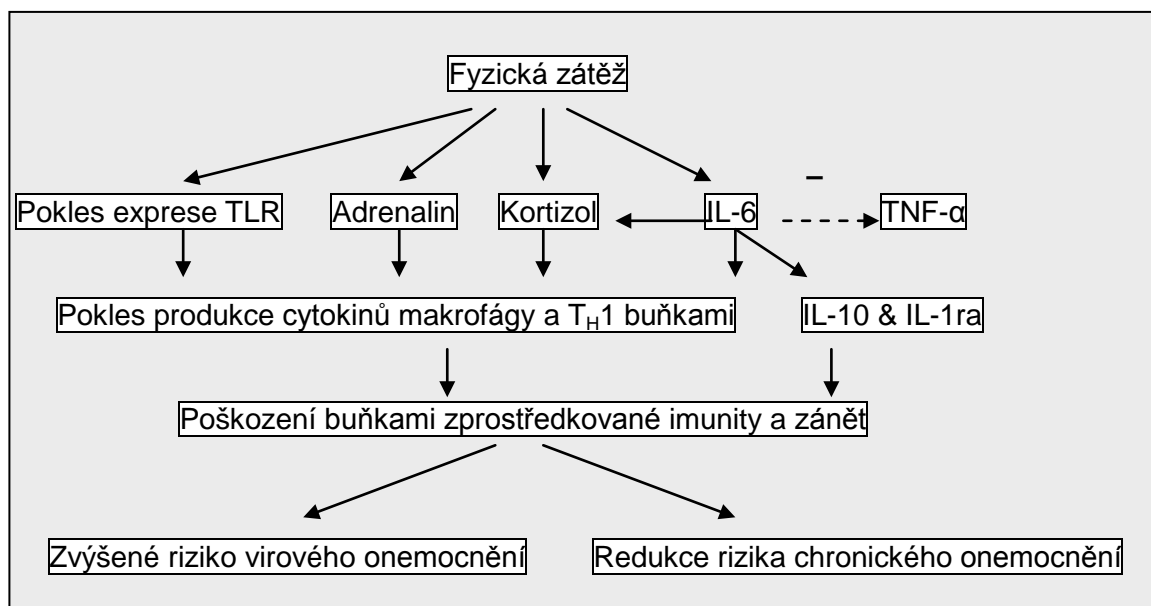
o dlouhotrvající a vyčerpávající zátěž může k počátku poklesu NK-buněk docházet již během cvičení. Při fyzické zátěži trvající déle než 1,5 hodiny mohou klesnout hladiny lymfocytů na několik hodin pod předzátěžové hodnoty.

Cvičení ovlivňuje také funkci antigen-prezentujících buněk. Studie prokazují cvičením vyvolanou redukci exprese hlavního histokompatibilního komplexu II. třídy a schopnosti prezentace antigenu u makrofágů.

Změny v počtu cirkulujících leukocytů a v imunitních funkcích doprovázející akutní náraz fyzické aktivity se obvykle vracejí na hodnoty předcházející zátěži během 3 až 24 hodin. Ve skutečně klidovém stavu, myšleno 24 hodin po posledním tréninku, se imunitní funkce u sportovců a nespportovců zdají být podobné, vykazují velmi mále rozdílů.

Z reakcí imunitních funkcí a hormonů na akutní fyzickou zátěž lze usuzovat, že cvičení zvyšuje náchylnost k virovým infekcím, jelikož oslabuje buněčnou imunitu potlačením produkce cytokinů pomocných T-lymfocytů typu 1, ale na druhou stranu má prokazatelně protizánětlivý účinek posunem dominance na stranu pomocných T-lymfocytů typu 2, který by měl potlačovat schopnost imunitního systému způsobovat poškození tkáně a zánět.

Důležité je také zjištění, že akutní dlouhotrvající namáhavou fyzickou zátěž následuje po několik hodin snížení exprese „Toll-like“ receptorů na povrchu monocytů. Nedávné studie dokládají, že jak akutní aerobní tak chronicky se opakující odporové cvičení vyúsťují v pokles exprese „Toll-like“ receptorů na buněčném povrchu monocytů. „I když tento fakt může přispívat k pozátěžovému poklesu imunitních funkcí a vyšší náchylnosti k infekcím u sportovců, zdá se být pouze malou cenou za to, na jak dlouhou dobu může mít snížení exprese „Toll-like“ receptorů prospěšný efekt, protože tím je potlačena zánětlivá kapacita leukocytů, tudíž dochází k redukci rizika vývoje chronického onemocnění.“ (obrázek 6) (Gleeson, 2007).



Obrázek 6 – Schéma možného mechanismu zvýšení náchylnosti k infekcím, redukce zánětu a rizika vývoje chronického onemocnění: IL-1ra = receptory antagonistů IL-1; znaménko minus znázorňuje inhibiční aktivitu IL-6 na produkci tumor necrosis factor (TNF- α) (převzato od Gleeson, 2007)

3 CÍLE A HYPOTÉZY

Diplomová práce vychází ze studie prováděné Klinikou rehabilitace a tělovýchovného lékařství FN Motol a Ústavem imunologie 2.LF UK. Cílem práce je pokusit se objasnit vliv extrémní pohybové zátěže na zastoupení subpopulací dendritických buněk (DC) (myeloidních a plasmocytoidních dendritických buněk) v periferní krvi u vrcholových sportovců. Zhodnotit zastoupení, morfologické a funkční charakteristiky včetně stavu maturace a aktivace u periferních dendritických buněk a jejich subpopulací.

Východiskem pro studii je skutečnost, že extrémní fyzická zátěž má imunosupresivní účinek. Dendritické buňky představují hlavní buňky, které zahajují imunitní reakci. Předpokládá se, že hrají rozhodující roli ve formování imunitní odpovědi. Podílejí se na rozlišování cizího a vlastního a signálů nebezpečí, které pro organismus představují škodliviny vnější, ale i vnitřní. Dendritické buňky také přispívají k udržování tolerance vůči vlastním tkáním. Řízení imunitní odpovědi závisí na stadiu maturace, již vyjadřují maturační markery – CD80, CD83 a kostimulační molekula CD86.

Již byly popsány změny počtu a funkce základních složek specifické imunity, nikoli však chování cirkulujících dendritických buněk. Proto by tedy tato studie měla přinést data, která by doplnila současné poznatky zátěžové imunologie a přispěla tak k pochopení zvýšené náchylnosti vrcholových sportovců infekčním onemocněním horních cest dýchacích.

Hypotéza H_0 : Extrémní fyzická zátěž se neodráží ve změně hodnot subpopulací dendritických buněk v periferní krvi.

Hypotéza H_1 : Extrémní fyzická zátěž se odráží ve změně hodnot subpopulací dendritických buněk v periferní krvi.

4 METODIKA VÝZKUMU

Na úplném začátku studie byla prohledáním elektronických databází dostupných na ÚVI 2.LF UK, vyhledáním zdrojů via PubMed, ProQuest, EBSCO, HighWire Press zpracována rešeršní příprava. Na jejím základě pak byla dále rozpracována metodika a strategie výzkumu.

Výzkum byl proveden na 20 probandech, ve věku mezi 18 až 39 lety, resp. jejich průměrný věk byl v době měření 27,25 roku \pm 5,96. Výška probandů se pohybovala mezi 178 a 194cm, což je v průměru 184,45cm \pm 3,47. Průměrná hodnota hmotnosti, jejíž rozptyl byl od 75 do 103 kg, byla 89,45kg \pm 6,48. Jednalo se o hráče extraligového hokejového týmu HC Slavia Praha. Skupina profesionálních sportovců byla vybrána z důvodu jejich permanentního vystavení extrémní fyzické zátěži po většinu roku, v době hokejové sezóny i v přípravě před ní.

První odběr krevních vzorků probíhal před začátkem fyzické zátěže, druhý krevní náběr pak následoval bezprostředně po jejím skončení.

Výzkum obsahoval také dotazníkové šetření na bázi nevalidizovaného dotazníku

DOTAZNÍK			
jméno a příjmení:			
1.	věk		
2.	váha / výška	kg	cm
3.	akutní infekční onemocnění během posledních 14 dnů? léčen ATB?	ANO ATB	NE
4.	trpěl v dětství / trpí na časté infekce DC? (imunodeficit?)	ANO	NE
5.	projevy atopie – alergie, astma, ekzémy? + vyvolavatel?	ANO	NE
6.	očkování v posledních 14ti dnech, proti čemu?	ANO	NE
7.	chronická onemocnění?	ANO	NE
8.	trvale užívané léky?	ANO	NE
9.	potravinové doplňky (multivitaminové aj.)	ANO	NE
10.	kouření / alkohol? kolik denně, jak dlouho?	ANO	NE

Tabulka 1 - Dotazník

sestaveného pro účely studie (tabulka 1). Před odběrem byl formou anamnestického dotazníku proveden základní screening monitorující případné zkreslující faktory (onemocnění, alergie, medikace).

4.1 Stanovení fyzické zátěže

K tomu, abychom mohli nadefinovat atributy fyzické zátěže, jsme použili sporttesterů, jež měli hokejisté na sobě v klidu před tréninkem a po celou dobu tréninku. Sporttestery firmy Polar zaznamenávali kontinuálně tepovou frekvenci probandů, kterou jsme pak vyhodnocovali a analyzovali, ke zjištění průměrné a maximální tepové frekvence, pomocí softwaru téže firmy.

4.1.1 Popis sporttesteru

Sporttester (pulsometr, monitoring srdečního tepu) umožňuje individuální sledování srdeční frekvence v reálném čase nebo jeho nahrání pro pozdější rozbor. Sporttester se skládá ze dvou částí: z hrudního pásu, který slouží jako vysílač a přijímače na zápěstí v podobě hodinek. Zaznamenaná srdeční akce je vysílána v podobě radiového (analogového) nebo digitálního signálu, jež použije přijímač ke stanovení aktuální tepové frekvence. Tento signál může být jednoduchý radiový pulz nebo specifický kódovaný signál z hrudního pásu (jako je např. Bluetooth).

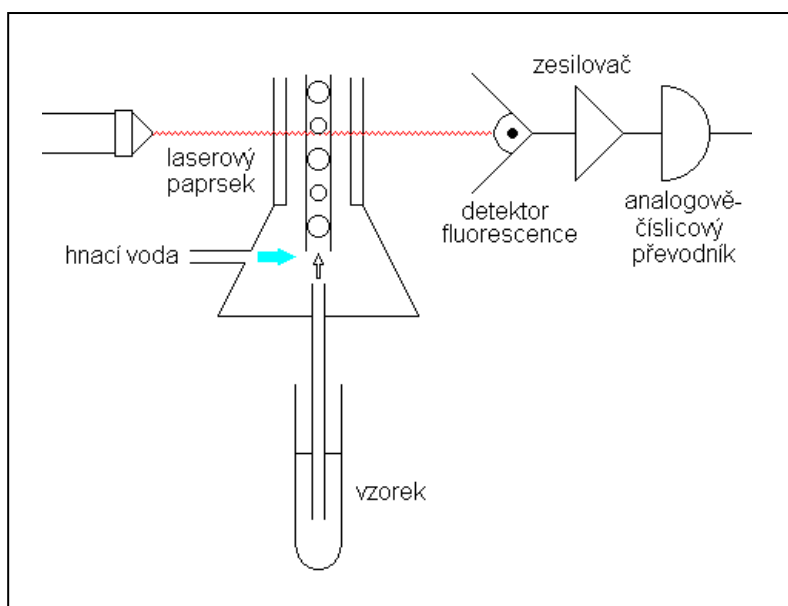
4.2 Imunologická část studie

Krevní vzorky byly analyzovány formou stanovení klasického krevního obrazu a pomocí průtokové cytometrie byl stanovován počet dendritických buněk. Počet dendritických buněk pak díky tomu mohl být vztažen k absolutnímu počtu buněk v určitém objemu periferní krve.

4.2.1 Průtoková cytometrie

Průtoková cytometrie je metoda, která umožňuje diferenciaci populací buněk a zjištění přesných počtů buněk obsažených v suspenzi vzorku na základě jejich různých optických vlastností. Dovoluje cíleně separovat buňky, jež splňují požadované parametry. Parametrem může být fyzikální nebo chemická vlastnost a vše co můžeme označit monoklonální protilátkou. Vzorky mohou být pro potřeby průtokové cytometrie značeny také pomocí fluorescenčních substrátů, které se nejčastěji váží na jejich DNA. Metoda využívá jednak rozptylu světla (přímý/čelní a boční rozptyl) a jednak intenzity fluorescence jednotlivých buněk nebo fluorescence emitované aplikovanými fluorescenčními probami. Průtokový cytometr je běžně vybaven argonovým laserem, který umožňuje analýzu mnoha buněčných parametrů na základě odklonu laserového paprsku. Úroveň odklonu odpovídá velikosti a denzitě procházejících částic. Cytometrická analýza je založena na skutečnosti, že jednotlivé měřené částice/buňky procházejí snímacím místem a je prováděno měření každé částice/buňky (obrázek 7). Nejčastěji měřenými parametry průtokové cytometrie jsou velikost, granularita, povrchové a CD znaky, intracelulární vytokány, pH, intracelulární vápník, hořčík, enzymatická aktivita, viabilita, nukleové kyseliny a membránový potenciál. Metodika průtokové cytometrie při barvení buněk fluorescentním barvivem, konjugovaným

s monoklonálními protilátkami, umožňuje stanovit přítomnost, denzitu i distribuci cytoplazmatických znaků. Tyto cytoplazmatické znaky jako tzv. diferenciační znaky (CD, Clusters of Differentiation) pomáhají určovat specifické buněčné subpopulace (např. CD4+ T lymfocyty značené monoklonální protilátkou proti znaku CD4 na jejich povrchu).



Obrázek 7 – Schéma průtokové cytometrie

Ústav imunologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze je vybaven přístrojem FACS Aria, který umožňuje analýzu povrchových i intracelulárních markerů buněk za současného sledování až jedenácti různých parametrů. Slouží také separaci (sortování) subpopulací buněk definovaných specifickou expresí markerů. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) je jednou z prvních a základních aplikací průtokové cytometrie. Při této metodě průtokové cytometrie je buněčná suspenze zaváděna do středu úzkého rychle tekoucího proudu kapaliny, který je uspořádán tak, že dochází k rozdělení jednotlivých buněk v závislosti na jejich průměru. Speciálním vibračním mechanismem je pak vzniklý proud roztržštěn na kapky. Celý systém je nastaven tak, že existuje pouze malá pravděpodobnost výskytu dvou buněk v jedné kapce. Ještě předtím, než je buněčná

suspenze rozbita na jednotlivé kapky, fluorescenční detektor změří fluorescenční charakteristiku každé jednotlivé buňky. FACS je metoda na roztřídění suspenze buněk do dvou nebo více frakcí a to po jedné buňce. V místě, kde dochází k rozštěpení proudu suspenze na kapky lze tyto kapky nabít v závislosti na míře intenzity právě naměřené fluorescence. Takto nabité kapky procházejí elektrostatickým polem, které je dokáže rozdělit do sběrných nádob podle jejich náboje.

Dendritické buňky v periferní krvi byly v rámci naší studie identifikovány pomocí kombinace monoklonálních protilátek jako CD45+/ lineage neg. /HLA-DR+/CD11c+/CD123- (myeloidní, mDC) a CD45+/ lineage neg. /HLA-DR+/CD11c-/CD123+ (plazmacytoidní, pDC). Aktivace dendritických buněk byla sledována podle exprese kostimulačních molekul (Cluster of Differentiation; CD80+, CD83+ a CD86+).

5 VÝSLEDKY

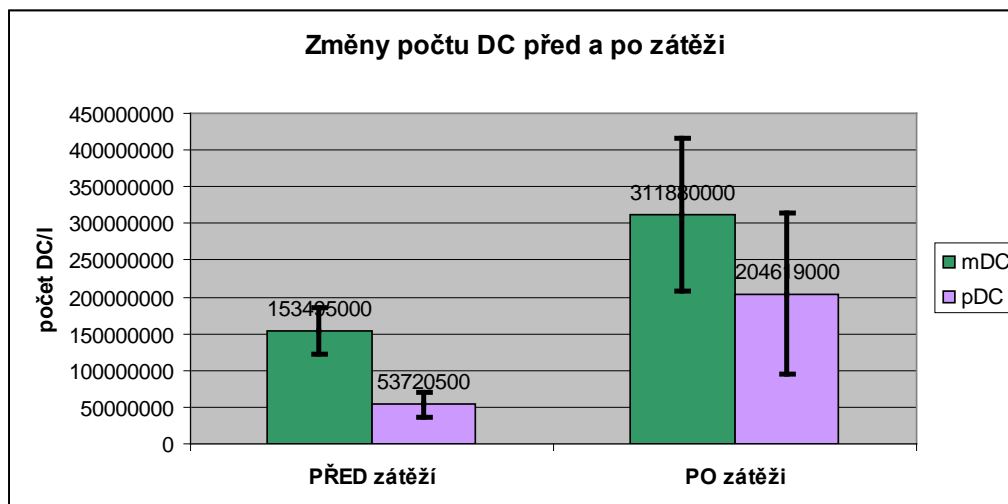
Výsledky odečtené ze sporttesterů nám pomohly definovat atributy fyzické zátěže. Maximální tepová frekvence v zátěži dosahovala hodnoty, průměrná tepová frekvence v zátěži byla naměřena. Z toho vyplývá, že se hokejisté v průběhu tréninku pohybovali na cca 80% svého tepového maxima, tedy na úrovni nebo těsně pod anaerobním prahem. Periodu hokejového tréninku bychom mohli označit jako intermitentní zátěž silového charakteru, pohybující se v tepovém rozmezí od $147,9 \pm 10,41$ tepu za minutu do $183,3 \pm 12,68$ tepu za minutu, tedy většinu času z hodinového tréninku okolo anaerobního prahu.

Pomocí průtokové cytometrie jsme sledovali počty subpopulací dendritických buněk a expresi kostimulačních molekul na jejich povrchu. Průtokově cytometrická analýza povrchových znaků dendritických buněk byla zaměřena na panel sestávající z molekul CD80, CD83 a CD86. Pro jednotlivé znaky byly stanovovány změny fluorescence kostimulačních molekul ve vzorcích získaných před zátěží a po fyzické zátěži pomocí indexu MFI (Mean Fluorescence Index). Statistická významnost změn fluorescence byla testována párovým t-testem na hladině významnosti 5% ($P < 0,05$).

Změny v zastoupení jednotlivých subpopulací dendritických buněk během extrémní fyzické zátěže aplikované v této studii dokládají následující grafy a tabulky (obrázek 8 – 10).

Z námi provedeného výzkumu vyplývá, že dochází ke statisticky významné změně (kdy $P < 0,05$) v pozátěžovém nárůstu procentuálního zastoupení obou, jak myeloidních (mDC) tak plazmocytoidních (pDC), subpopulací dendritických buněk (tzn. jejich absolutního počtu v litru periferní krve) (Obrázek ?). Průměrné procentuální zastoupení obou subpopulací DC bylo po zátěži statisticky významně vyšší (mDC = $0,31\% \pm 0,09\%$, tzn. $311880000 \pm 103426641,2$ mDC/l; pDC = $0,20\% \pm 0,09\%$, tzn. $204619000 \pm 110371547,3$ pDC/l) než před ní (mDC = $0,26\% \pm 0,07\%$, tzn. $153495000 \pm 31347751,95$ mDC/l; pDC =

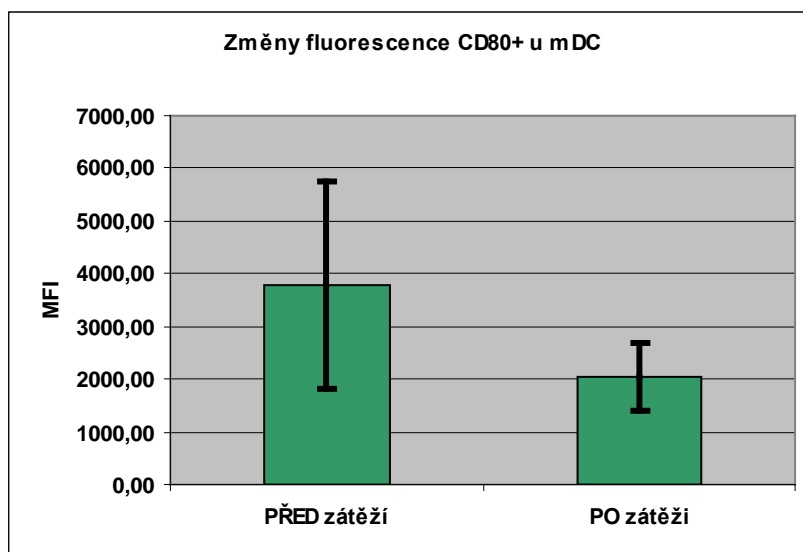
0,09% ± 0,02%, tzn. 53720500 ± 16425259,9 pDC/l) ($P_{mDC} = 6,51189E-07$; $P_{pDC} = 3,60397E-06$).



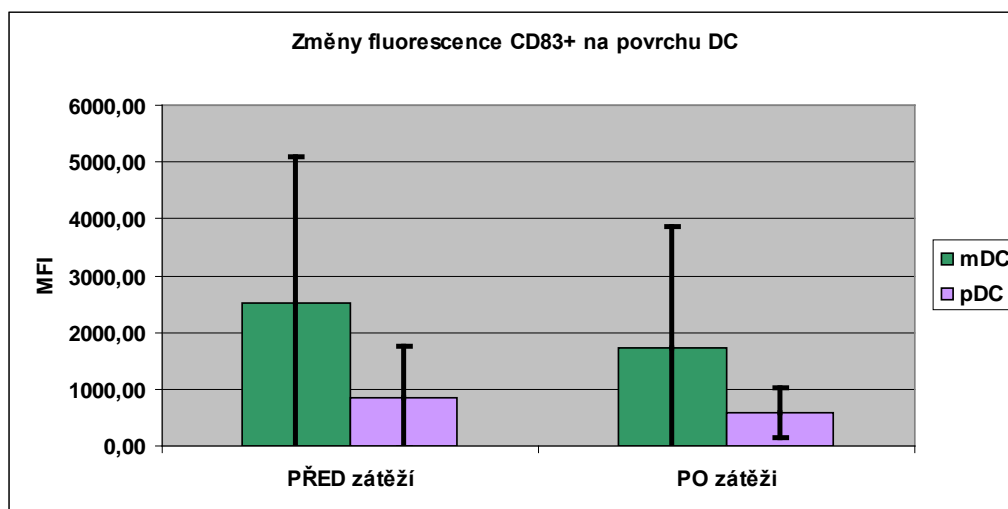
Obrázek 8 – Změny počtu DC před a po zátěži

Dále jsme pozorovali signifikantní pokles exprese kostimulačních molekul CD80 u myeloidních dendritických buněk (mDC) (MFI z 3782,8 ± 1952,6 na 2035,5 ± 634,7; $P = 0,0007$) (obrázek 8) a CD83 u obou populací dendritických buněk (u mDC klesl MFI z 2513,3 ± 2570,3 na 1727 ± 2146,1 s $P = 0,00935202$ a u pDC z 863,4 ± 880,4 na 579,6 ± 445,9 s $P = 0,01873107$) (obrázek 9).

U poslední ze zkoumaných kostimulačních molekul CD86 nebyly pozorovány významné změny ani u jedné subpopulace dendritických buněk. Pozátěžový pokles exprese kostimulační molekuly CD86 u plazmocytoïdních dendritických buněk (pDC) (MFI z 545,2 ± 234 na 490,25 ± 270,9; $P = 0,07877331$) a její vzestup u myeloidních dendritických buněk (mDC), který byl minimální (MFI z 1056,7 ± 784,85 na 1163,3 ± 995,97; $P = 0,16649734$), nám vyšly jako statisticky nevýznamné. Statisticky významný nebyl ani pokles exprese kostimulační molekuly CD80 u plazmocytoïdních dendritických buněk (pDC) (MFI z 717,92 ± 254,96 na 617,63 ± 79,34; $P = 0,16554409$).



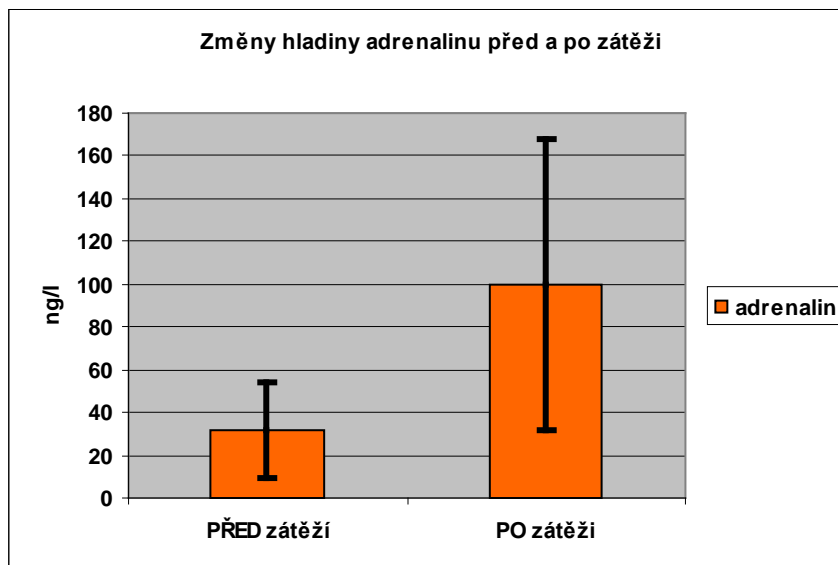
Obrázek 9 – Pokles exprese CD80+ u mDC



Obrázek 10 – Pokles exprese CD83 u obou populací dendritických buněk

Hladina adrenalinu se během zátěže zvýšila v průměru o 217,5% (z 31,44 ng/l ± 22,27 na 99,83 ng/l ± 68,24) (obrázek 10). Tento masivní nárůst hodnot podporuje tvrzení, že nadledviny trénovaných osob během srovnatelné zátěže secernují více adrenalinu než u osob netrénovaných, hovoří se o tzv. „sportovní nadledvině“. Prudké zvýšení může

vysvětlovat také fakt, že hladina adrenalinu se zvyšuje lineárně s trváním zátěže, ale hlavně exponenciálně s její intenzitou.



Obrázek 11 – Změny hladin adrenalinu před a po zátěži

Výsledky studie nebyla potvrzena hypotéza H_0 : Extrémní fyzická zátěž se neodráží ve změně hodnot subpopulací dendritických buněk v periferní krvi, potvrzena byla hypotéza H_1 : Extrémní fyzická zátěž se odráží ve změně hodnot subpopulací dendritických buněk v periferní krvi.

6 DISKUZE

Několikeré studie se zabývaly změnami v imunitním systému způsobenými cvičením nebo jinými stresovými situacemi. Hlavním cílem naší studie bylo určit vliv extrémní fyzické zátěže na zastoupení subpopulací dendritických buněk v periferní krvi u vrcholových sportovců.

„Dendritické buňky jsou jedny z hlavních senzorů mikrobiální infekce. Interagují s T-lymfocyty, stejně jako ostatní buňky zapojené v rozpoznání patogenu, a mají úlohu v odstranění infekčních agens prostřednictvím sekrece mediátorů zánětlivé reakce, jako jsou cytokiny a chemokiny, a skrze jejich schopnost sloužit jako antigen prezentující buňky.“ (Burzyn, Rassa, Kim, Nepomnaschy, Ross, Piazzoni, 2004).

Akutní fyzická zátěž v podobě hokejového tréninku podle našich výsledků vyvolává významný nárůst pozátěžového procentuelního zastoupení obou subpopulací dendritických buněk, jak hodnot myeloidních (mDC) tak plazmocytoidních (pDC) dendritických buněk, resp. jejich absolutního počtu na litr periferní krve. Edwards et. al. uvádí, že po fyzické zátěži vzrůstá počet makrofágů a dendritických buněk, což naše výsledky potvrzují. Jejich studie uvádí vzestup počtu antigen-prezentujících buněk spojených s aktivitou NK-buněk a T-lymfocytů. Jinými slovy podle současných znalostí o dendritických buňkách jakožto stěžejních antigen-prezentujících buňkách naše výsledky potvrdily výstup studie Edwardse et. al.

Zátěž vyvolala vzestup počtu dendritických buněk v krvi, byl u nich ovšem zaznamenán pokles exprese kostimulačních molekul CD80 u myeloidních dendritických buněk (mDC) a CD83 u obou populací.

Pouze lehce, statisticky nevýznamně, poklesla exprese kostimulační molekuly CD80 a CD86 u plazmocytoïdních dendritických buněk (pDC). Minimální byl také vzestup exprese kostimulační molekuly CD86 u myeloidních dendritických buněk (mDC).

Zvýšení zastoupení obou subpopulací dendritických buněk v periferní krvi u vrcholových sportovců vlivem extrémní fyzické zátěže může značit zvýšenou pohotovost imunitního systému na hrozící nebezpečí (poškození tkání).

Expese kostimulačních molekul úzce souvisí s aktivací dendritických buněk, respektive se stavem jejich diferenciaci (zrání). My víme, že proces maturace je u dendritických buněk provázen silným zvýšením exprese MHC (resp. HLA) proteinů, kostimulačních molekul, adhezivních molekul a produkci cytokinů potřebných pro optimální stimulaci diferenciaci antigenně specifických efektorových T-lymfocytů. Z našeho měření vychází zvýšení počtu dendritických buněk v periferní krvi a současně snížení exprese, tudíž můžeme usuzovat na skutečnost, že do krve jsou během zátěže vyplavovány dendritické buňky méně zralé.

„Toll-like“ receptory jsou transmembránové proteiny antigen-prezentujících buněk, které hrají důležitou roli v odhalení a rozpoznání mikrobiálních patogenů. Rovněž mohou být aktivovány endogenními signály značícími poškození tkáně, jako jsou například proteiny teplotního šoku. Klíčovým produktem signalizování „Toll-like“ receptorů u antigen-prezentujících buněk je tvorba zánětlivých cytokinů a proteinů, a proto je cestou „Toll-like“ receptorů zprostředkován celotělový zánět. „Navázání patogenních molekul nebo endogenních nebezpečných signálů na „Toll-like“ receptory vede k aktivaci antigen-prezentující buňky a následné aktivaci T-buněk, která je tím ovlivňována.“ (Gleeson, 2007). Nedávné studie ukázaly, že jak akutní aerobní tak chronické odporové cvičení má za následek pokles exprese „Toll-like“ receptorů na buněčném povrchu. „Toll-like“ receptory navozují up-regulaci velkého histokompatibilního komplexu (MHC) II. třídy,

kostimulačních molekul a exprese prozánětlivých cytokinů. Úměrně s úbytkem „Toll-like“ receptorů tedy následkem dlouhotrvajícího cvičení dochází také ke snížení indukce kostimulačních molekul a cytokinů následujících stimulaci známými aktivátory „Toll-like“ receptorů. I když tyto účinky mohou přispívat k pozátěžové imunodepresi a vyšší náchylnosti sportovců k infekcím, může pokles exprese „Toll-like“ receptorů představovat prospěšný efekt, protože snižuje zánětlivou kapacitu leukocytů, tudíž upravuje celotělový chronický zánět a možná redukuje riziko vzniku chronického onemocnění. (Gleeson, 2007).

O poklesu exprese „Toll-like“ receptorů může svědčit námi zaznamenané snížení exprese kostimulačních molekul CD80 u myeloidních dendritických buněk a CD83 u obou zkoumaných subpopulací dendritických buněk. „Přesný fyziologický stimul zprostředkovávající cvičením indukovaný pokles exprese „Toll-like“ receptorů na buněčném povrchu není znám; je zapojeno více potenciálních signálů, zahrnujících protizánětlivé cytokiny, stresové hormony a proteiny teplotního šoku.“ (Gleeson, 2007).

Akutní fyzická zátěž představuje pro organismus jistou formu stresové reakce, proto vlivem kortizolu a dalších stresových hormonů (zejm. katecholaminů) vyvolává reakci i v imunitním systému, tedy snižuje rezistenci vůči infekcím. Glukokortikoidy a katecholaminy ovlivňují prezentaci antigenu, tedy antigen-prezentující buňky, ze kterých nejdůležitějšími se jeví dendritické buňky, jež jsou předmětem naší studie. Kortizol potlačuje expresi kostimulačních molekul B.7 (CD80, CD86) u dendritických buněk, tedy působí down-regulaci exprese MHC II. třídy, resp. HLA II. třídy, u antigen prezentujících buněk, což přispívá k jejich inhibičnímu účinku na aktivaci T-lymfocytů vázanou na antigen-prezentující buňky.

Výstupem z výsledků změn hladin adrenalinu před a po zátěži pro nás může tedy být tvrzení, že se jednalo o významný stres pro organismus. Katecholaminy reagují na stres

okamžitě, na rozdíl od kortizolu, u kterého hodinová zátěž nepůsobí významnější změny v plazmatické koncentraci. Akutní změny spojené s fyzickou zátěží tedy jsou, spíše než působením kortizolu, vyvolávány působením katecholaminů. Proto bylo pro účely této studie vybráno stanovení hladin adrenalinu před a po zátěži.

Glukokortikoidy, jejichž hlavním zástupcem je u člověka kortizol, také působí v synergii s katecholaminy T_H2 posun. „Kortizol a adrenalin potlačují produkci pomocných T-lymfocytů typu 1.“ (Gleeson, 2007). Porušení rovnováhy mezi pomocnými T-lymfocyty typu 1 a typu 2 ve prospěch pomocných T-lymfocytů typu 2 může být prospěšné, protože tím je potlačena schopnost imunitního systému způsobovat poškození tkání a zánět. Stresové odpovědi postupně, skrze indukci posunu cytokinové osy k pomocným T-lymfocytům typu 2 (T_H2), chrání organismus před systémovým překmitem prozánětlivých cytokinů produkovaných pomocnými (prozánětlivými) T-lymfocyty (T_H1). Ovšem svoje následky má i snížení procentuelního zastoupení pomocných T-lymfocytů typu 1, které podporují buňkami zprostředkovanou imunitu, a současný pokles jimi produkovaných cytokinů, které způsobují právě kortizol a adrenalin, jelikož snižuje ochranu před virovými infekcemi. To by mohlo vysvětlovat, proč jsou sportovci náchylnější k infekcím horních cest dýchacích.

Katecholaminy jsou obvykle považovány za imunosupresory, ovšem během stresu způsobeného fyzickou zátěží mohou také stimulovat mechanismy vrozené imunitní odpovědi (např. fagocytózu), a to i bez předchozí antigenní stimulace. Zejména tato cvičením indukovaná stimulace fagocytární odpovědi a obecně vrozená imunitní odpověď jsou považovány za preventivní strategii organismu sportovce s účelem zabránění průniku a/nebo udržení antigenů v situaci, kdy se zdá, že je specifická (získaná, adaptivní) imunitní odpověď potlačena, a tak tedy katecholaminy mohou participovat na těchto účincích jako tzv. stresové mediátory.

Některé dendritické buňky preferenčně stimulují diferenciaci pomocných T-lymfocytů typu 1 (T_H1), jiné pomocných T-lymfocytů typu 2 (T_H2). Zralé dendritické buňky způsobují odpověď pomocných T-lymfocytů typu 2 (T_H2), nezralé dendritické buňky vyvolávají buď regulační T-buněčnou odpověď nebo reakci pomocných T-lymfocytů typu 1 (T_H1). Pokud antigen prezentující buňka, v našem případě dendritická buňka, nemá dostatek kostimulačních molekul, druhý signál je nedostatečný, vede stimulace přes T-receptory k apoptotické smrti T-lymfocytu nebo k jeho útlumu (anergii, inhibici proliferace). V našich výsledcích se objevily změny u CD80 u myeloidních a CD83 u obou subpopulací dendritických buněk ve smyslu snížení jejich exprese.

„Nejdůležitější molekulou pro amplifikaci T-buněčné odpovědi je molekula CD86.“ (Šedivá, 2006). U této kostimulační molekuly v naší studii nebyly prokázány statisticky signifikantní změny.

Námi provedená studie potvrzuje mechanismus, kterým může cvičení zvyšovat náchylnost k virovým onemocněním, ale redukovat zánět a riziko vývoje chronického onemocnění, jak jej uvedl v roce 2007 ve svém souhrnném článku Gleeson. Cvičení vyvolává pokles exprese „Toll-like“ receptorů, který dokládají naše zjištění o snížení exprese kostimulačních molekul CD80 u myeloidních a CD83 u myeloidních i plazmocytoidních dendritických buněk. Současně s poklesem exprese „Toll-like“ receptorů dochází ke snížení počtu makrofágů a produkce cytokinů pomocných T-lymfocytů typu 1. Důsledkem toho dochází k poškození buňkami zprostředkované imunity a zánětu. Tato kaskáda dějů pak zvyšuje riziko virové infekce.

7 ZÁVĚR

Závěrem této diplomové práce tedy může být, že extrémní fyzická zátěž signifikantně ovlivňuje zastoupení subpopulací dendritických buněk v periferní krvi. Patrné je zvýšení počtu obou subpopulací dendritických buněk po hodinovém intenzivním fyzickém zatížení v podobě hokejového tréninku.

Dendritické buňky představují hlavní antigen-prezentující buňky, proto výsledky studie mohou ukazovat na možnou rychlou mobilizaci dendritických buněk vlivem intenzivní fyzické zátěže do krevní cirkulace, čímž se imunitní systém organismu zřejmě připravuje na poškození (trauma, infekce).

Následkem extrémní fyzické zátěže se mění počty dendritických buněk v periferní krvi a současně i jejich aktivační stav. Jelikož maturaci dendritických buněk doprovázejí dramatické změny vlivem přeměny z fagocytujících na antigen prezentující-buňky jako je zejména zvýšení exprese MHC (HLA) proteinů a také exprese kostimulačních molekul, změny exprese kostimulačních markerů ve smyslu snížení naznačují, že dendritické buňky vyplavené do krevního oběhu po fyzické zátěži jsou méně diferencované, tedy méně zralé.

Ze snížené exprese kostimulačních molekul CD80 u myeloidních dendritických buněk (mDC) a CD83 u obou subpopulací dendritických buněk můžeme kromě snížení aktivity dendritických buněk usuzovat i na s ní související pokles exprese „Toll-like“ receptorů.

Úbytek „Toll-like“ receptorů může být jednou z příčin pozátěžové imunodeprese a důvodem zvýšené náchylnosti sportovců k virovým infekcím. Přes „Toll-like“ receptory jsou na antigen-prezentující buňku navázány patogenní molekuly nebo signály endogenního nebezpečí, aby ta se potom pomocí kostimulačních molekul mohla navázat na receptory T-lymfocytu a dát impulz k jeho aktivaci a diferenciaci. Pokud tedy není zprostředkováno navázání patogenní molekuly nebo endogenního nebezpečného signálu prostřednictvím

receptoru „Toll“ na antigen prezentující buňku nedojde k aktivaci T-buněčné odpovědi. Což by mohlo vysvětlovat snížení imunitních funkcí po akutní fyzické zátěži.

8 SOUHRN

Tato diplomová práce vznikala na základě projektu studie prováděné Ústavem imunologie a Klinikou rehabilitace a tělovýchovného lékařství 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole.

Záměrem studie bylo zjistit vliv extrémní fyzické aktivity na zastoupení subpopulací dendritických buněk v periferní krvi u vrcholových sportovců. Časné změny počtu a funkce základních složek buněčné imunity po sportovní zátěži byly již v mnoha studiích popsány, chování cirkulujících dendritických buněk však zatím studováno nebylo. Současně se zastoupením myeloidních a plasmocytoidních dendritických buněk před a po intenzivní fyzické zátěži byl hodnocen jejich aktivační stav.

Pro hodnocení hladin dendritických buněk v periferní krvi byla použita metoda průtokové cytometrie. Ke stanovení míry fyzické zátěže bylo použito kontinuálního sledování tepové frekvence pomocí sporttesterů.

Nulová hypotéza předpokládala, že po akutní fyzické zátěži nedochází ke změnám v zastoupení dendritických buněk, se nepotvrdila. Došlo ke změně ve smyslu zvýšení počtu dendritických buněk a to u obou zkoumaných subpopulací.

9 SUMMARY

This thesis was created on the basis of studies conducted by the Department of Immunology and Clinic of Rehabilitation and Sports Medicine of 2nd Medical School Charles University and University Hospital in Motol.

The thesis purpose was to find out the effect of extreme physical load of top sportsmen to changes in representation of various subpopulations dendritic cells. Early count changes and changes of function of basic elements of cellular immunity after a sport load have been described, whereas a behaviour of circulating dendritic cells hasn't been studied yet. An amount and a stage of myelogenic and plasmocytogenic dendritic cells before and after the sports load was assessed.

The flow cytometry method was used to assess the amount of dendritic cells. A continuous monitoring of pulse rate using sport testers was used to determine the level of physical load.

The null hypothesis assumed, that there won't be any changes in amount of dendritic cells after acute physical load. This thesis was not confirmed. There were changes in the way of increasing of an amount of dendritic cells in both examined subpopulations.

10 REFERENČNÍ SEZNAM

1. AKIRA, Shizuo. Toll-like Receptor Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003, vol. 278, no. 40, s. 38105-38108. Dostupný z WWW: <jbc.org>.
2. ANOLIK, Jennifer H. B Cell Biology and Dysfunction in SLE. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases*. 2007, vol. 65, no. 3, s. 182-186.
3. BHARADWAJ, Arpita S., BEWTRA, Agindra K., AGRAWAL, Devendra K. Dendritic cells in allergic airway inflammation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2007, no. 85, s. 686-699.
4. BURZYN, Dalia, RASSA, John C., KIM, David, NEPOMNASCHY, Irene, ROSS, Susan R., PIAZZONI, Isabel. Toll-Like Receptor 4-Dependent Activation of Dendritic Cells by a Retrovirus. *Journal of Virology*. 2004, vol. 78, no. 2, s. 576-584.
5. COLONNA, Marco. Alerting dendritic cells to pathogens: The importance of Toll-like receptor signaling of stromal cells. *PNAS*. 2004, vol. 101, no. 46, s.16083-16084. Dostupný z WWW:<pnas.org>.
6. COOPER, Michael Dan, RADOM-AIZIK, Shlomit, SCHWINDT, Christina, ZALDIVAR, Frank. Dangerous exercise: lessons learned from dysregulated inflammatory response to physical activity. *Journal of Applied Physiology*. 2007, no. 103, s. 700-709. Dostupný z WWW:<jap.org>.
7. DOHI, Kaiichiro, KRAEMER, William J., MASTRO, Andrea M. Exercise increases prolactin-receptor expression on human lymphocytes. *Journal of Applied Physiology*. 2003, no. 94, s. 518-524. Dostupný z WWW:<jap.org>.
8. EDWARDS, A.J., BACON, T.H., ELMS, C.A., VERARDI, R., FELDER, M., KNIGHT, S.C. Changes in the population of lymphoid cells in human peripheral blood following physical exercise. *Clin.exp.Immunol.*1984, no. 58, s. 420–427.
9. EDWARDS, Kate M., BURNS, Victoria E., RING, Christopher, CARROLL, Douglas. Individual differences in the interleukin-6 response to maxima and submaximal exercise task. *Journal of Sports Science*. 2006, vol. 24, no. 8, s. 855-862.
10. GANONG, William F. *Přehled lékařské fyziologie*. Praha: H&H, 1995, dotisk 1999. 680 s. ISBN 80-85787-36-9.
11. GLEESON, M., MCDONALD, W.A., CRIPPS, A.W., PYNE, D.B., CLANCY, R.L., FRICKER, P.A. The effect on immunity of long-term intensive training in elite swimmers. *Clin.Exp.Immunol.* 1995, no. 102, s. 210-216.
12. GLEESON, Michael, NIEMAN, David C., PEDERSEN, Bente K. Exercise, nutrition and immune function. *Journal of Sports Science*. 2004, no. 22, s. 115-125.
13. GLEESON, Michael. Immune function in sport and exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2007, no. 103, s. 693-699. Dostupný z WWW:<jap.org>.
14. GOMEZ-MERINO, Daniele, CHENNAOUI, Mounir, BURNATT, Pascal, DROGOU, Catherine, GUEZENEC, Charles Yannick. Immune and Hormonal Changes following Intense Military Training. *Military Medicine*. 2003, no. 168, s. 1034-1038.
15. HISCOCK, Natalie, PEDERSEN, Bente Klarlund. Exercise-induced immunodepression – plasma glutamine is not the link. *Journal of Applied Physiology*. 2002, no. 93, s. 813-822.

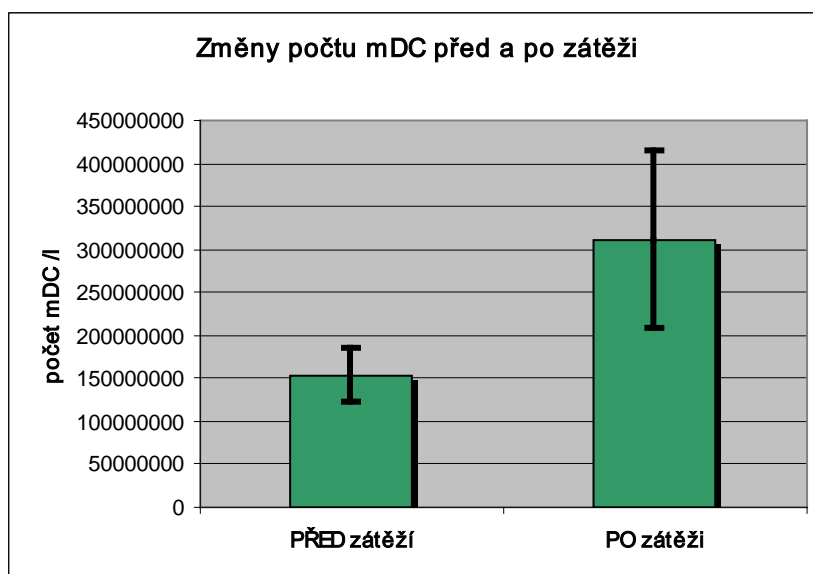
16. HO, Ch.S.K., LÓPEZ, J.A., VUCKOVIC, S., PYKE, Ch.M., HOCKEY, R.L., HART, D.N.J. Surgical and physical stress increases circulating blood dendritic cell counts independently of monocyte counts. *Blood*. 2001, vol. 98, no. 1, s. 140-145. Dostupný z WWW:<bloodjournal.org>.
17. HOŘEJŠÍ, Václav. Receptory TLR – klíčové molekuly imunitního systému. *Vesmír*. 2004, no. 3, s. 134.
18. HOŘEJŠÍ, Václav, BARTUŇKOVÁ, Jiřina. *Základy imunologie*. 3. vyd. Praha: Triton, 2005, 279 s. ISBN 80-7254-686-4
19. LIAO, H.F., CHIANG, L.M., YEN, C.C., CHEN, Y.Y., ZHUANG, R.R., LAI, L.Y., CHINANG, J., CHEN, Y.J. Effect of a periodized exercise training and active recovery program on antitumor activity and development of dendritic cells. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*. 2006, vol. 46, no. 2, s. 307-314.
20. LORÉ, Karin, BETTS, Michael R., BRENCHLEY, Jason M., KURUPPU, Janaki, KHOJASTEH, Soorena, PERFETTO, Stephen, ROEDERER, Mario, SEDER, Robert A., KOUP, Richard A. Toll-Like Receptor Ligands Modulate Dendritic Cells to Augment Cytomegalovirus- and HIV-1-Specific T Cell Response. *The Journal of Immunology*. 2003, no. 171, s. 4320-4328.
21. MALM, C. Exercise-induced Muscle damage and inflammation: fact or fiction? *Acta Physiologica Scandinavica*. 2001, no. 171, s. 233-239.
22. MALM, Christer. Exercise Immunology: The current state of Man and Mouse. *Sports Medicine*. 2004, vol. 34, no. 9, s. 555-566.
23. MALM, C., EKBLÖM, Ö., EKBLÖM, B. Immune alteration in response to two consecutive soccer games. *Acta Physiologica Scandinavica*. 2004, no. 180, s. 143-155.
24. MILLS, Paul J., HONG, Suzi, REDWINE, Laura, CARTER, Steven M., CHIU, Albert, ZIEGLER, Michael G., DIMSDALE, Joel E., MAISEL, Alan S. Physical fitness attenuates leukocyte-endothelial adhesion in response to acute exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2006, no. 101, s. 785-788. Dostupný z WWW:<jap.org>.
25. MOHAPATRA, Shyam S. Role of natriuretic peptide signaling in modulating asthma and inflammation. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2007, no. 85, s. 754-759.
26. MOOREN, F.C., BLÖMING, D., LECHTERMAN, A., LERCH, M.M., VÖLKER, K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *Journal of Applied Physiology*. 2002, no. 93, s. 147-153. Dostupný z WWW:<jap.org>.
27. NIELSEN, H.G., LYBERG, T. Long-Distance Running Modulates the Expression of Leukocyte and Endothelial Adhesion Molecules. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2004, no. 60, s. 356-362.
28. NIEMAN, David C., PEDERSEN, Bente K. Exercise and Immune function. *Sports Medicine*. 1999, vol. 27, no. 2, 73-80.
29. NIEMAN, David C. Exercise effects on systemic immunity. *Immunology and Cell Biology*. 2000, no. 78, s. 496-501.
30. PEDERSEN, B.K., HOFFMAN-GOETZ, L. Exercise and the immune system: Regulation, integration, and adaptation. *Physiological Reviews*. 2000, no. 8, s. 1055-1081.

31. SATTAPORN, S., EREMIN, O. Dendritic cells (I) : biological functions. *Journal of Royal College of Surgeons of Edinburgh*. 2001, no. 48, s. 9-20.
32. SILBERNAGL, Stefan, DESPOPOULOS, Agamemnon. *Atlas fyziologie člověka*. 6. rozšířené vyd. (3. české) Praha: Grada, 2004. 448 s. ISBN 80-247-0630-X.
33. SOUSA, Caetano Reis. Dendritic cells in a mature age. *Nature Reviews Immunology*. 2006, no. 6, s. 476-483.
34. ŠEDIVÁ, Anna. Dendritické buňky a alergie. *Alergie*. 2006, no. 4, s.287-291.
35. ŠPÍŠEK, Radek, BARTUŇKOVÁ, Jiřina. *Dendritická buňka v imunitě: Její role při regulaci imunitní reakce*. Vesmír. 2003, no.82, s. 212-214. Dostupný z <http://vesmir.cts.cuni.cz>
36. TODAR, Kenneth. Immune Defense against Bacterial Pathogens: Adaptive or Acquired Imunity. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Dostupný z WWW: <textbookofbacteriology.net> Retrieved from source 11.2.2009.
37. TROJAN, Stanislav et al. *Lékařská fyziologie*. 2. přepracované a rozšířené vyd. Praha: Grada, 1996. 496 s. ISBN 80-7169-311-1.
38. VREMEC, David, O'KEEFFE, Meredith, HOCHREIN, Hubertus, FUCHSBERGER, Martina, CAMINSCHI, Irina, LAHOUD, Mireille, SHORTMAN, Ken. Production of interferons by dendritic cells, plasmacytoid cells, natural killer cells, and interferon-producing killer dendritic cells. *Blood*. 2007, vol. 109, no. 3, s. 1165-1172. Dostupný z WWW:<bloodjournal.org>.

11 PŘÍLOHY

	%mDC před	%mDC po	mDC před (počet/l)	mDC po (počet/l)
1	0,2	0,21	146000000	247800000
2	0,16	0,21	128000000	237300000
3	0,25	0,4	122500000	360000000
4	0,29	0,36	194300000	338400000
5	0,28	0,51	184800000	596700000
6	0,21	0,26	151200000	439400000
7	0,19	0,26	121600000	257400000
8	0,42	0,36	205800000	295200000
9	0,21	0,27	134400000	294300000
10	0,25	0,41	102500000	237800000
11	0,22	0,35	147400000	353500000
12	0,26	0,32	140400000	329600000
13	0,23	0,12	108100000	105600000
14	0,18	0,21	138600000	277200000
15	0,38	0,41	205200000	307500000
16	0,26	0,33	169000000	376200000
17	0,22	0,34	151800000	448800000
18	0,31	0,34	145700000	251600000
19	0,35	0,27	189000000	210600000
20	0,36	0,27	183600000	272700000
Průměr	0,2615	0,3105	153495000	311880000
SD	0,071102224	0,089705659	31347751,95	103426641,2

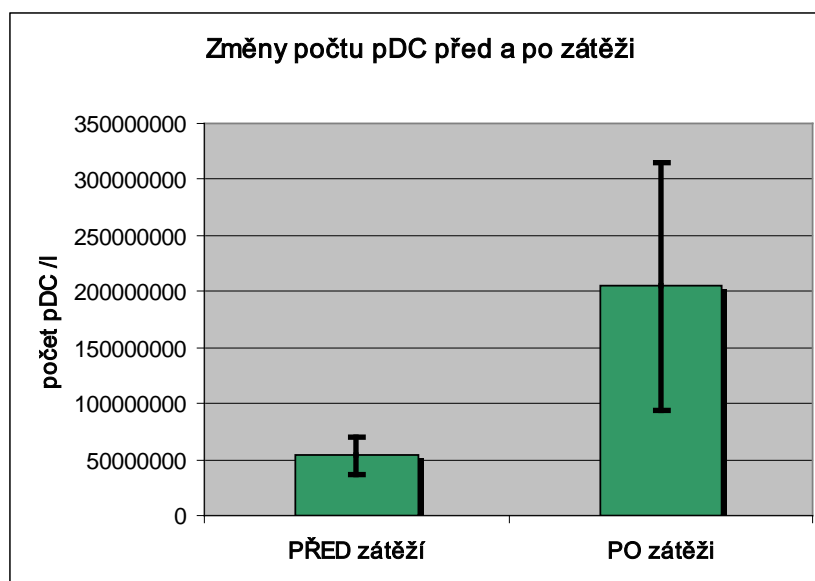
Tabulka 2 – Zastoupení myeloidních dendritických buněk před a po zátěži
SD = směrodatná odchylka



Obrázek 12 – Změny v zastoupení myeloidních dendritických buněk

	%pDC před	%pDC po	pDC před (počet/l)	pDC po (počet/l)
1	0,067	0,12	48910000	141600000
2	0,039	0,06	31200000	70060000
3	0,14	0,31	68600000	279000000
4	0,16	0,23	107200000	216200000
5	0,1	0,29	66000000	339300000
6	0,086	0,29	61920000	490100000
7	0,086	0,36	55040000	356400000
8	0,086	0,11	42140000	90200000
9	0,086	0,15	55040000	163500000
10	0,086	0,31	35260000	179800000
11	0,086	0,24	57620000	242400000
12	0,086	0,28	46440000	288400000
13	0,086	0,12	40420000	105600000
14	0,086	0,09	66220000	113520000
15	0,086	0,15	46440000	112500000
16	0,086	0,28	55900000	319200000
17	0,086	0,15	59340000	198000000
18	0,086	0,19	40420000	140600000
19	0,086	0,16	46440000	124800000
20	0,086	0,12	43860000	121200000
Průměr	0,0898	0,2004	53720500	204619000
SD	0,023917842	0,088803983	16425259,9	110371547,3

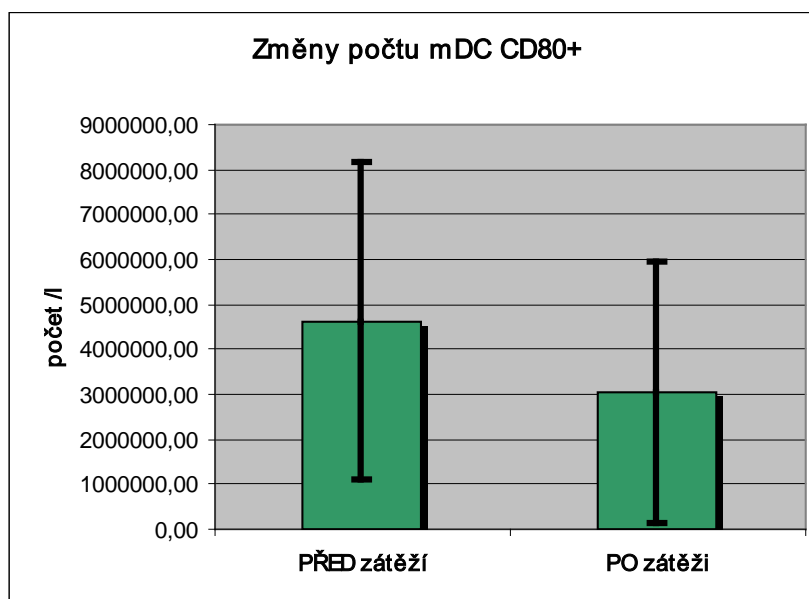
Tabulka 3 – Zastoupení plazmacytoidních dendritických buněk před a po zátěži
SD = směrodatná odchylka



Obrázek 13 – Změny v zastoupení plazmacytoidních dendritických buněk

	%CD80+ před	%CD80+ po	před	po	rozdíl	původní stav (%)	stav po zátěži
1	7,14	0,97	10424400	1416200	-9008200,00	100%	13,59%
2	4,19	1	6117400	1460000	-4657400,00	100%	23,87%
3	2,57	1,06	3752200	1547600	-2204600,00	100%	41,25%
4	1,43	1,72	2087800	2511200	423400,00	100%	120,28%
5	5,36	3,88	7825600	5664800	-2160800,00	100%	72,39%
6	1,76	1,59	2569600	2321400	-248200,00	100%	90,34%
7	2,7	1,16	3942000	1693600	-2248400,00	100%	42,96%
8	7,2	2,04	10512000	2978400	-7533600,00	100%	28,33%
9	9,41	3,49	13738600	5095400	-8643200,00	100%	37,09%
10	1,31	1,79	1912600	2613400	700800,00	100%	136,64%
11	0,72	1,75	1051200	2555000	1503800,00	100%	243,06%
12	1,85	0,64	2701000	934400	-1766600,00	100%	34,59%
13	1,16	4,2	1693600	6132000	4438400,00	100%	362,07%
14	1,94	0,99	2832400	1445400	-1387000,00	100%	51,03%
15	1,83	2,29	2671800	3343400	671600,00	100%	125,14%
16	1,04	1,57	1518400	2292200	773800,00	100%	150,96%
17	2,19	1,22	3197400	1781200	-1416200,00	100%	55,71%
18	1,87	0,31	2730200	452600	-2277600,00	100%	16,58%
19	5,05	9,27	7373000	13534200	6161200,00	100%	183,56%
20	2,73	0,75	3985800	1095000	-2890800,00	100%	27,47%
Průměr	3,1725	2,0845	4631850,00	3043370,00			92,85%
SD	2,426181481	1,993081388	3542224,96	2909898,83			89,11%

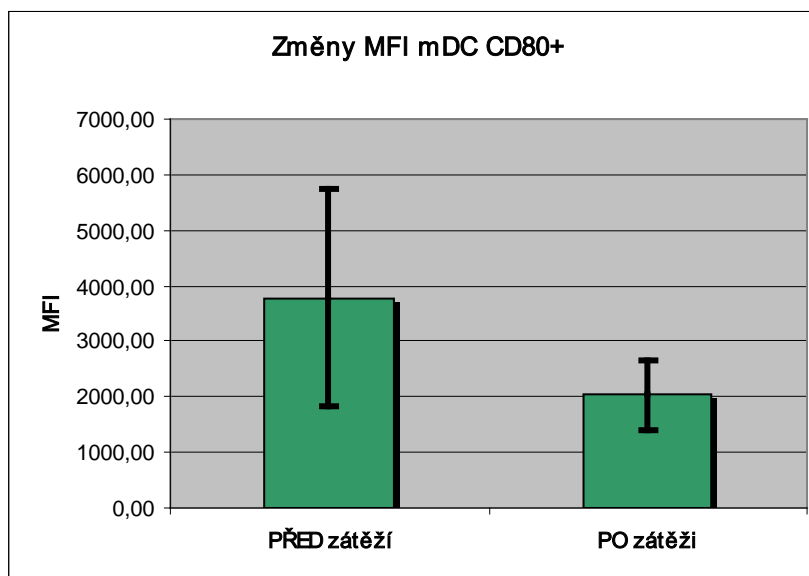
Tabulka 4 – Změny počtu receptorů CD80+ u myeloidních dendritických buněk



Obrázek 14 – Změny počtu receptorů CD80+ u myeloidních dendritických buněk

	před	po	rozdíl	původní stav (%)	stav po zátěži
1	3303	1931	-1372,00	100%	58,46%
2	8796	1909	-6887,00	100%	21,70%
3	2707	1803	-904,00	100%	66,61%
4	4051	1780	-2271,00	100%	43,94%
5	2533	1964	-569,00	100%	77,54%
6	1916	1829	-87,00	100%	95,46%
7	5638	4552	-1086,00	100%	80,74%
8	3111	1937	-1174,00	100%	62,26%
9	4990	1814	-3176,00	100%	36,35%
10	2028	1890	-138,00	100%	93,20%
11	2046	1756	-290,00	100%	85,83%
12	4654	1688	-2966,00	100%	36,27%
13	1636	1933	297,00	100%	118,15%
14	2181	2295	114,00	100%	105,23%
15	1857	1924	67,00	100%	103,61%
16	5565	1791	-3774,00	100%	32,18%
17	7114	1614	-5500,00	100%	22,69%
18	5354	2488	-2866,00	100%	46,47%
19	3050	2282	-768,00	100%	74,82%
20	3126	1530	-1596,00	100%	48,94%
Průměr	3782,80	2035,50			65,52%
SD	1952,56	634,71			29,08%

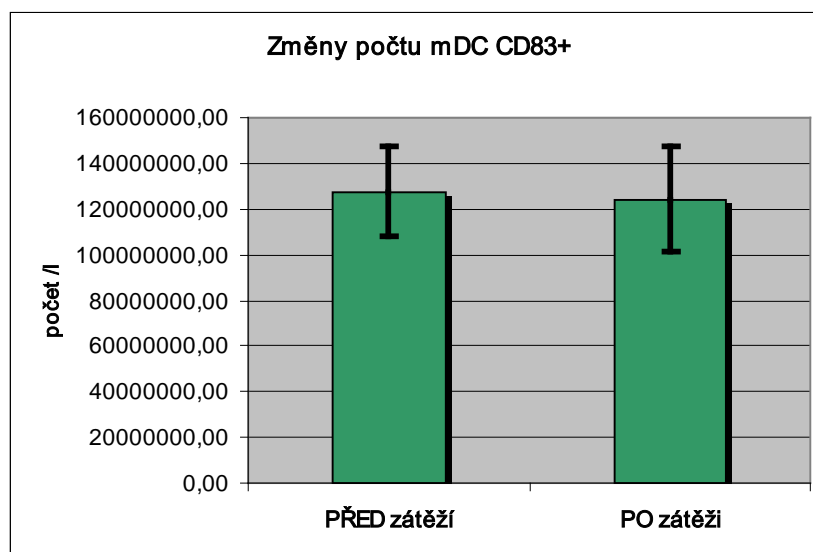
Tabulka 5 – Změny MFI receptorů CD80+ u myeloidních dendritických buněk



Obrázek 15 – Změny MFI receptorů CD80+ u myeloidních dendritických buněk

	%CD83+ před	%CD83+ po	před	po	rozdíl	původní stav (%)	stav po zátěži
1	99,2	98,1	1,45E+08	1,43E+08	-1606000,00	100%	98,89%
2	85,2	66,2	1,24E+08	96652000	-27740000,00	100%	77,70%
3	98,1	92,1	1,43E+08	1,34E+08	-8760000,00	100%	93,88%
4	84,3	88,5	1,23E+08	1,29E+08	6132000,00	100%	104,98%
5	97,4	95,9	1,42E+08	1,4E+08	-2190000,00	100%	98,46%
6	96	92,5	1,4E+08	1,35E+08	-5110000,00	100%	96,35%
7	58,8	55,8	85848000	81468000	-4380000,00	100%	94,90%
8	94,8	87,8	1,38E+08	1,28E+08	-10220000,00	100%	92,62%
9	94,1	98,1	1,37E+08	1,43E+08	5840000,00	100%	104,25%
10	53,9	59,8	78694000	87308000	8614000,00	100%	110,95%
11	88	77	1,28E+08	1,12E+08	-16060000,00	100%	87,50%
12	82,3	74,5	1,2E+08	1,09E+08	-11388000,00	100%	90,52%
13	96,1	97,5	1,4E+08	1,42E+08	2044000,00	100%	101,46%
14	67,8	47,3	98988000	69058000	-29930000,00	100%	69,76%
15	93,2	92,9	1,36E+08	1,36E+08	-438000,00	100%	99,68%
16	79,6	92,8	1,16E+08	1,35E+08	19272000,00	100%	116,58%
17	95,9	97,6	1,4E+08	1,42E+08	2482000,00	100%	101,77%
18	92,4	94,1	1,35E+08	1,37E+08	2482000,00	100%	101,84%
19	98,3	99,6	1,44E+08	1,45E+08	1898000,00	100%	101,32%
20	94,5	95,9	1,38E+08	1,4E+08	2044000,00	100%	101,48%
Průměr	87,495	85,2	127742700,00	124392000,00			97,25%
SD	13,23669	16,02248	19325568,04	23392826,93			10,49%

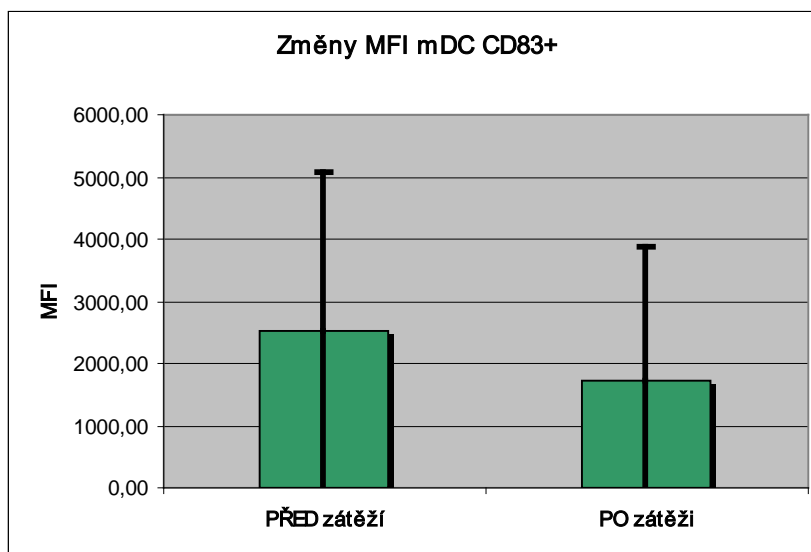
Tabulka 6 – Změny počtu receptorů CD83+ u myeloidních dendritických buněk



Obrázek 16 – Změny počtu receptorů CD83+ u myeloidních dendritických buněk

	MFI před	MFI po	rozdíl	původní stav (%)	stav po zátěži
1	5160	1631	-3529,00	100%	31,61%
2	1372	487	-885,00	100%	35,50%
3	1991	946	-1045,00	100%	47,51%
4	761	697	-64,00	100%	91,59%
5	4422	1910	-2512,00	100%	43,19%
6	2690	1846	-844,00	100%	68,62%
7	540	478	-62,00	100%	88,52%
8	2119	768	-1351,00	100%	36,24%
9	10582	7193	-3389,00	100%	67,97%
10	371	340	-31,00	100%	91,64%
11	946	493	-453,00	100%	52,11%
12	809	442	-367,00	100%	54,64%
13	1507	1579	72,00	100%	104,78%
14	529	415	-114,00	100%	78,45%
15	833	896	63,00	100%	107,56%
16	518	666	148,00	100%	128,57%
17	3635	2841	-794,00	100%	78,16%
18	1930	1420	-510,00	100%	73,58%
19	6712	8186	1474,00	100%	121,96%
20	2839	1305	-1534,00	100%	45,97%
Průměr	2513,30	1726,95			72,41%
SD	2570,25	2146,13			29,23%

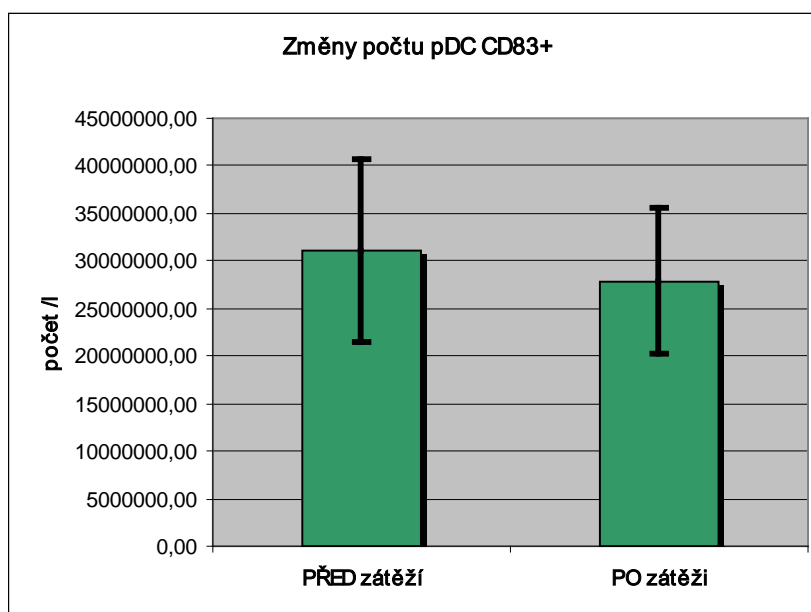
Tabulka 7 – Změny MFI receptorů CD83+ u myeloidních dendritických buněk



Obrázek 17 – Změny MFI receptorů CD83+ u myeloidních dendritických buněk

	%CD83+ před	%CD83+ po	před	po	rozdíel	původní stav (%)	% změna
1	82,9	67,8	40546390	33160980	-7385410,00	100%	81,79%
2	77,3	55	37807430	26900500	-10906930,00	100%	71,15%
3	57,3	59,9	28025430	29297090	1271660,00	100%	104,54%
4	44,8	47,7	21911680	23330070	1418390,00	100%	106,47%
5	82,3	66,1	40252930	32329510	-7923420,00	100%	80,32%
6	61,9	53,2	30275290	26020120	-4255170,00	100%	85,95%
7	40,9	40,6	20004190	19857460	-146730,00	100%	99,27%
8	81,3	62,3	39763830	30470930	-9292900,00	100%	76,63%
9	97,7	97,3	47785070	47589430	-195640,00	100%	99,59%
10	35,2	39,5	17216320	19319450	2103130,00	100%	112,22%
11	48,7	35,5	23819170	17363050	-6456120,00	100%	72,90%
12	52,2	46,5	25531020	22743150	-2787870,00	100%	89,08%
13	57,3	59,3	28025430	29003630	978200,00	100%	103,49%
14	52,8	43,4	25824480	21226940	-4597540,00	100%	82,20%
15	40,2	47,6	19661820	23281160	3619340,00	100%	118,41%
16	42,7	49,4	20884570	24161540	3276970,00	100%	115,69%
17	75,9	64,8	37122690	31693680	-5429010,00	100%	85,38%
18	55,2	47,3	26998320	23134430	-3863890,00	100%	85,69%
19	93,7	87,2	45828670	42649520	-3179150,00	100%	93,06%
20	89,6	70,9	43823360	34677190	-9146170,00	100%	79,13%
Průměr	63,495	57,065	31055404,50	27910491,50			92,15%
SD	19,73529	15,74325	9652528,87	7700021,13			14,41%

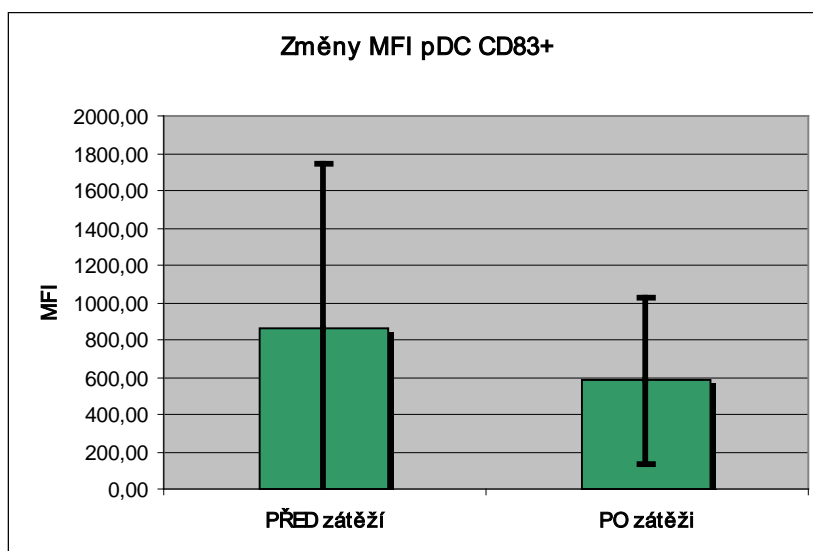
Tabulka 8 – Změny počtu receptorů CD83+ u plazmocytoïdních dendritických buněk



Obrázek 18 – Změny počtu receptorů CD83+ u plazmocytoïdních dendritických buněk

	před	po	rozdíl	původní stav (%)	stav po zátěži
1	1274	567	-707,00	100%	44,51%
2	613	313	-300,00	100%	51,06%
3	544	421	-123,00	100%	77,39%
4	319	389	70,00	100%	121,94%
5	1450	491	-959,00	100%	33,86%
6	471	658	187,00	100%	139,70%
7	370	385	15,00	100%	104,05%
8	1058	415	-643,00	100%	39,22%
9	4089	2238	-1851,00	100%	54,73%
10	345	324	-21,00	100%	93,91%
11	385	365	-20,00	100%	94,81%
12	357	382	25,00	100%	107,00%
13	475	509	34,00	100%	107,16%
14	347	407	60,00	100%	117,29%
15	348	422	74,00	100%	121,26%
16	346	383	37,00	100%	110,69%
17	1060	597	-463,00	100%	56,32%
18	404	403	-1,00	100%	99,75%
19	1765	1311	-454,00	100%	74,28%
20	1247	612	-635,00	100%	49,08%
Průměr	863,35	579,60			84,90%
SD	880,44	445,93			32,29%

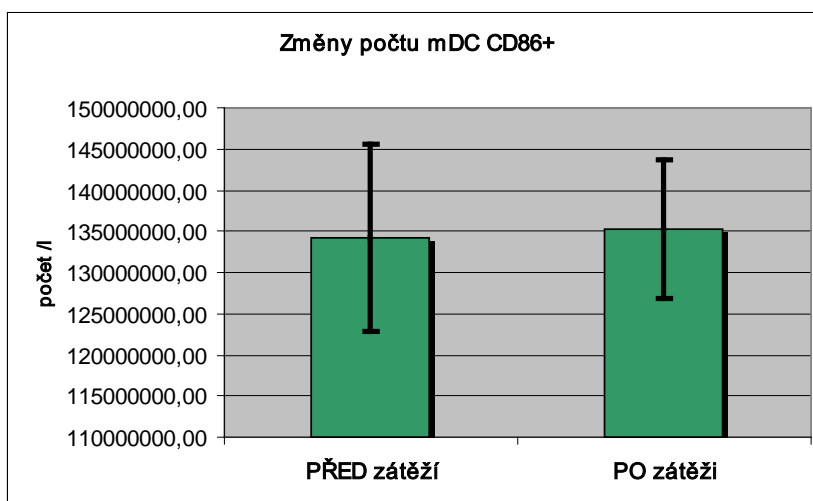
Tabulka 9 – Změny MFI receptorů CD83+ u plazmocytoidních dendritických buněk



Obrázek 19 – Změny MFI receptorů CD83+ u plazmocytoidních dendritických buněk

	%CD86+ před	%CD86+ po	před	po	rozdíl	původní stav (%)	stav po zátěži
1	96,1	92,3	140306000	1,35E+08	-5548000,00	100%	96,05%
2	83,5	83,2	121910000	1,21E+08	-438000,00	100%	99,64%
3	91	94,8	132860000	1,38E+08	5548000,00	100%	104,18%
4	97	97,2	141620000	1,42E+08	292000,00	100%	100,21%
5	95,5	91,3	139430000	1,33E+08	-6132000,00	100%	95,60%
6	95,9	97,4	140014000	1,42E+08	2190000,00	100%	101,56%
7	85,8	92,3	125268000	1,35E+08	9490000,00	100%	107,58%
8	93,4	94,9	136364000	1,39E+08	2190000,00	100%	101,61%
9	96,9	97,7	141474000	1,43E+08	1168000,00	100%	100,83%
10	92,1	94,8	134466000	1,38E+08	3942000,00	100%	102,93%
11	91,8	93,9	134028000	1,37E+08	3066000,00	100%	102,29%
12	83,8	88,7	122348000	1,3E+08	7154000,00	100%	105,85%
13	91	86,8	132860000	1,27E+08	-6132000,00	100%	95,38%
14	64,9	74,9	94754000	1,09E+08	14600000,00	100%	115,41%
15	95,6	97,2	139576000	1,42E+08	2336000,00	100%	101,67%
16	93,3	96,3	136218000	1,41E+08	4380000,00	100%	103,22%
17	98,9	99,1	144394000	1,45E+08	292000,00	100%	100,20%
18	94,8	92,1	138408000	1,34E+08	-3942000,00	100%	97,15%
19	99,4	96,6	145124000	1,41E+08	-4088000,00	100%	97,18%
20	97,3	92,6	142058000	1,35E+08	-6862000,00	100%	95,17%
Průměr	91,9	92,705	134174000,00	135349300,00			101,18%
SD	7,82163	5,769108	11419579,70	8422897,45			4,85%

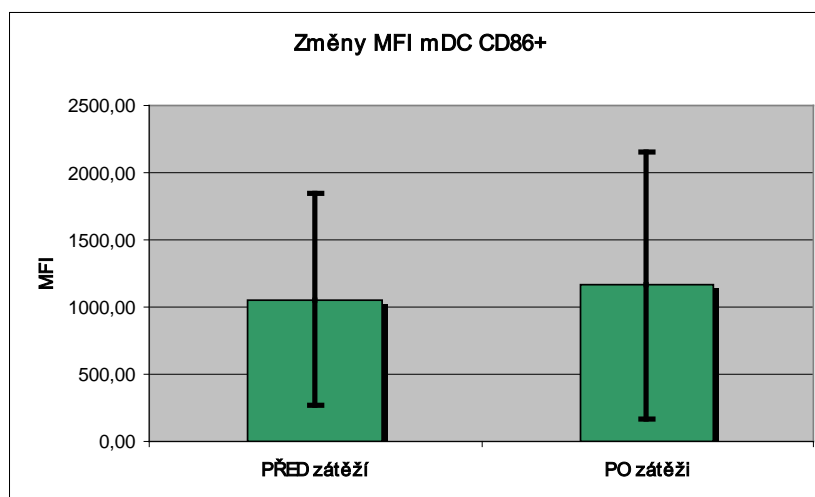
Tabulka 10 – Změny počtu receptorů CD86+ u myeloidních dendritických buněk



Obrázek 20 – Změny počtu receptorů CD86+ u myeloidních dendritických buněk

	MFI před	MFI po	rozdíl	původní stav (%)	stav po zátěži
1	819	574	-245,00	100%	70,09%
2	654	473	-181,00	100%	72,32%
3	667	713	46,00	100%	106,90%
4	1196	1240	44,00	100%	103,68%
5	1058	923	-135,00	100%	87,24%
6	871	1308	437,00	100%	150,17%
7	550	779	229,00	100%	141,64%
8	927	829	-98,00	100%	89,43%
9	1855	1470	-385,00	100%	79,25%
10	739	873	134,00	100%	118,13%
11	699	695	-4,00	100%	99,43%
12	528	664	136,00	100%	125,76%
13	596	739	143,00	100%	123,99%
14	643	737	94,00	100%	114,62%
15	769	1014	245,00	100%	131,86%
16	692	1163	471,00	100%	168,06%
17	3971	5106	1135,00	100%	128,58%
18	932	1193	261,00	100%	128,00%
19	1924	2019	95,00	100%	104,94%
20	1044	754	-290,00	100%	72,22%
Průměr	1056,70	1163,30			110,82%
SD	784,85	995,97			27,30%

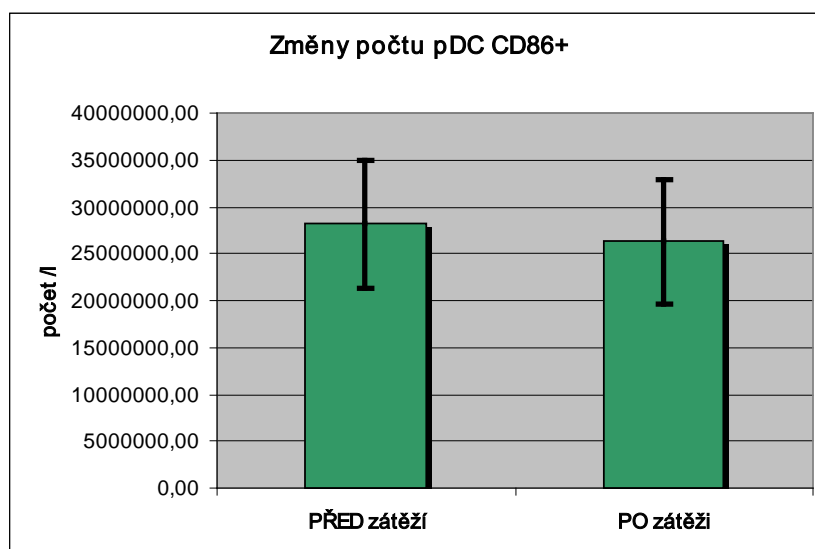
Tabulka 11 – Změny MFI receptorů CD86+ u myeloidních dendritických buněk



Obrázek 21 – Změny MFI receptorů CD86+ u myeloidních dendritických buněk

	%CD86+ před	%CD86+ po	před	po	rozdíl	původní stav (%)	stav po zátěži
1	51,1	45,1	24993010	22058410	-2934600,00	100%	88,26%
2	66	54,5	32280600	26655950	-5624650,00	100%	82,58%
3	48	37,7	23476800	18439070	-5037730,00	100%	78,54%
4	59,9	58,1	29297090	28416710	-880380,00	100%	96,99%
5	58,8	52,6	28759080	25726660	-3032420,00	100%	89,46%
6	59,1	47,3	28905810	23134430	-5771380,00	100%	80,03%
7	46,2	48,9	22596420	23916990	1320570,00	100%	105,84%
8	69,4	67,3	33943540	32916430	-1027110,00	100%	96,97%
9	84,1	70,6	41133310	34530460	-6602850,00	100%	83,95%
10	38,2	38,2	18683620	18683620	0,00	100%	100,00%
11	40,8	44,7	19955280	21862770	1907490,00	100%	109,56%
12	48,7	41,3	23819170	20199830	-3619340,00	100%	84,80%
13	49	41,7	23965900	20395470	-3570430,00	100%	85,10%
14	55,1	54,1	26949410	26460310	-489100,00	100%	98,19%
15	55,2	56,1	26998320	27438510	440190,00	100%	101,63%
16	47,7	59,4	23330070	29052540	5722470,00	100%	124,53%
17	94,7	95,2	46317770	46562320	244550,00	100%	100,53%
18	50,7	46,2	24797370	22596420	-2200950,00	100%	91,12%
19	69,9	65,8	34188090	32182780	-2005310,00	100%	94,13%
20	58,8	50	28759080	24455000	-4304080,00	100%	85,03%
Průměr	57,57	53,74	28157487,00	26284234,00			93,86%
SD	13,92446	13,5369436	6810454,18	6620919,12			11,37%

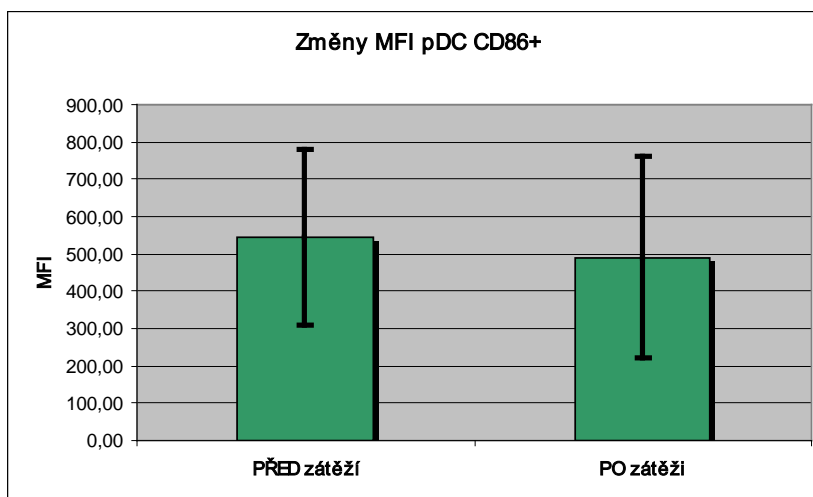
Tabulka 12 – Změny počtu receptorů CD86+ u plazmocytoïdních dendritických buněk



Obrázek 22 – Změny počtu receptorů CD86+ u plazmocytoïdních dendritických buněk

	před	po	rozdíl	původní stav (%)	stav po zátěži
1	600	306	-294,00	100%	51,00%
2	611	386	-225,00	100%	63,18%
3	420	359	-61,00	100%	85,48%
4	489	469	-20,00	100%	95,91%
5	539	494	-45,00	100%	91,65%
6	483	372	-111,00	100%	77,02%
7	395	387	-8,00	100%	97,97%
8	584	374	-210,00	100%	64,04%
9	808	509	-299,00	100%	63,00%
10	353	344	-9,00	100%	97,45%
11	440	378	-62,00	100%	85,91%
12	386	372	-14,00	100%	96,37%
13	533	473	-60,00	100%	88,74%
14	398	592	194,00	100%	148,74%
15	456	473	17,00	100%	103,73%
16	359	453	94,00	100%	126,18%
17	1409	1592	183,00	100%	112,99%
18	404	404	0,00	100%	100,00%
19	654	597	-57,00	100%	91,28%
20	583	471	-112,00	100%	80,79%
Průměr	545,20	490,25			91,07%
SD	234,00	270,90			22,58%

Tabulka 13 – Změny MFI receptorů CD86+ u plazmocytoïdních dendritických buněk



Obrázek 23 – Změny MFI receptorů CD86+ u plazmocytoïdních dendritických buněk

	věk	váha	výška
1	32	92	182
2	39	91	189
3	22	89	184
4	23	85	181
5	23	89	186
6	18	85	185
7	21	80	182
8	32	92	182
9	24	96	187
10	32	80	180
11	36	95	183
12	25	103	194
13	20	75	178
14	25	92	185
15	24	90	185
16	28	85	184
17	28	91	184
18	26	86	185
19	38	96	185
20	29	97	188

Tabulka 14 – Věk, váha a výška probandů

	ATB	infekce HCD	alergie	očkování	chron.onem. chron.záněty mandlí	trvale léky	trvale potrav.doplňky	kouření/ alkohol	poznámka
1	ano (PNC, Klacid) ano; před 7 dny	ano	ne	ne	ne	ne	ano (Ca, Mg)	ne	
2	ne; Tamiflu	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	černý čaj
3	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano (2x kapačka Ca)	ne	
4	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano, multivit.	ne	černý čaj
5	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano (multivit., vit.C)	ne	černý čaj
6	ne	ne	pyl a prach	ne	astma	ne	ne	ne	
7	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano (multivit.)	ne	ovocný čaj
8	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
9	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano (Centrum, Tantum verde, Stodal sirup)	ne	
10	ne; Tamiflu	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	káva
11	ne; Tamiflu	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	káva
12	ne	ne	pyl	ne	ne	ne	ne	ne	ovocný čaj
13	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano, multivit.	ne	černý čaj
14	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano, B-komplex	ne	
15	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano (multivit.)	ne	
16	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano (multivit., echinacea, BCAA, GAINER)	ne	káva
17	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ne	
18	ne; Tamiflu	ne	a pyl	ne	ne	ne	ano, multivit.	ne	černý čaj
19	ne	ne	pyl	ne	ne	ne	ano (multivit.)	ne	černý čaj
20	ne	ne	ne	ne	ne	ne	ano, multivit.	ne	

Tabulka 15 – Výsledky dotazníkového šetření

	Ø TF/ 60' tréninku	max. TF v průběhu 60' tréninku
1	129	168
2	117	160
3	155	195
4	146	187
5	155	185
6	167	190
7	145	176
8	142	173
9	154	178
10	149	184
11	148	193
12	156	184
13	154	189
14	144	173
15	150	186
16	152	181
17	150	175
18	153	183
19	149	183
20	143	223

Tabulka 16 – Tepové frekvence v průběhu fyzické zátěže