

MECHANIZMY OBRONY ANTYOKSYDACYJNEJ KRWI U PIŁKAREK NOŻNYCH

Małgorzata Michalczyk

Celem pracy było dokonanie oceny wpływu wysiłku o narastającej intensywności na reakcję systemu obrony antyoksydacyjnej we krwi u piłkarek nożnych, ocenianej na podstawie zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych (dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy glutationowej, katalazy i reduktazy glutationowej), stężeń antyoksydantów nieenzymatycznych (witamina E, zredukowany glutation), markerów stresu oksydacyjnego (stężenie dialdehydu malonowego i kwasu moczowego) oraz aktywności kinazy kreatynowej. Test o narastającej intensywności był przeprowadzony na początku i na końcu okresu przygotowawczego rundy wiosennej rocznego cyklu treningowego. Krew żylna była pobierana przed i po wysiłku wykonanym na ruchomej bieżni do maksymalnego zmęczenia.

Słowa kluczowe: *stres oksydacyjny, wolne rodniki, antyoksydanty, piłka nożna, wysiłek fizyczny*

Wstęp

Podczas gry w piłkę nożną przeważają wysiłki biegowe o zmiennej intensywności, podczas których wzrasta zapotrzebowanie na energię oraz tlen. Znaczny, bo 10 do 20 krotnie zwiększony dopływ tlenu oraz prawie 100 krotny wzrost jego zużycia przez mięśnie podczas wykonywania intensywnej pracy prowadzi do nasilenia się produkcji reaktywnych, głównie wolnorodnikowych, form tlenu (RFT) w mięśniach szkieletowych, krwi oraz prawdopodobnie w innych tkankach. Głównym źródłem ich tworzenia w mięśniach jest mitochondrialny proces łańcucha oddechowego oraz reakcja oksydazy ksantynowej, a we krwi-

autooksydacja hemoglobiny do methemoglobiny. RFT reagując ze składnikami układów biologicznych prowadzą do oksydatywnej modyfikacji ich struktury, co może prowadzić do utraty ich funkcji życiowej, a w konsekwencji do poważnych zaburzeń procesów metabolicznych w komórce. Z drugiej jednak strony RFT mogą odgrywać również rolę ważnych związków sygnałowych, zaangażowanych w procesach adaptacji komórek do zmienionych warunków fizjologicznych.

W pracy przedstawiono reakcje metaboliczne na obciążenie wysiłkowe, badane w warunkach laboratoryjnych, u piłkarek nożnych na początku i na końcu okresu przygotowawczego rundy wiosennej rozgrywek ligowych. Obserwacje dotyczą oceny potencjału antyoksydacyjnego, aktywności wybranych enzymów komórkowych i antyoksydacyjnych, antyoksydantów nieenzymatycznych oraz wybranych markerów stresu oksydacyjnego w warunkach spoczynku oraz bezpośrednio po wysiłku.

Material, metody i narzędzia badań

Badaniami objęto ogółem 12 kobiet w wieku od 15 do 31 lat, zawodniczek Klubu Sportowego Czarni Sosnowiec uprawiających piłkę nożną. Charakterystykę badanych zawodniczek przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Charakterystyka somatyczna badanych piłkarek

	Średnia ± SD	Minimum	Maksimum
Wiek [lata]	20,3 ±4,3	15	31
Masa ciała [kg]	59,2 ± 5,6	50,9	67,9
Wysokość ciała [cm]	165,4 ±3,2	160	172
VO ₂ max w badaniu 1 [mlO ₂ /min/kg]	44,5±1,97	29,3	51,3
VO ₂ max w badaniu 2 [mlO ₂ /min/kg]	46,0±0,75	42,60	50,90

Test wysiłkowy

Na początku i na koniec okresu przygotowania ogólnego rundy wiosennej (na przełomie stycznia i lutego oraz w kwietniu 2003 r.) piłkarki wykonywały test o narastającej intensywności do indywidualnego maksymalnego obciążenia na bieżni ruchomej (LE 300C- Jaeger). Podczas testu wysiłkowego rejestrowano pobór tlenu, wentylację minutową płuc i częstość skurczów serca korzystając z aparatury gazometrycznej Oxycon Alpha (Jaeger). Szybkość przesuwu bieżni zwiększano o 2 km/godz, począwszy od 6 km/godz., co 3 min. z 1 minutową przerwą, podczas której pobierano próby krwi kapilaryzowanej do oznaczenia stężenia mleczanu oraz parametrów równowagi kwasowo-zasadowej. W warunkach spoczynku, przed wysiłkiem oraz 5 min. po jego zakończeniu pobierano, do próbek z heparyną, jako czynnikiem antykoagulacyjnym, próby krwi żyłnej do analiz biochemicznych.

Techniki analityczne

W świeżych próbach osocza krwi oznaczano, wykorzystując zestawy diagnostyczne firmy ANALCO, aktywność kinazy kreatynowej (CK; EC.2.3.7.2) i dehydrogenazy mleczanowej (LD. EC.1.1.1.27) oraz stężenie glukozy i kwasu moczowego, a ponadto stężenie amoniaku stosując zestaw diagnostyczny firmy Boehringer. W próbach świeżej krwi oznaczano aktywność peroksydazy glutationowej (GSH-Px; EC.1.11.1.9) przy pomocy zestawu RANSEL (RS 505, Randox) oraz stężenie zredukowanego glutationu (GSH) metodą Beutler'a [2]. Erytrocyty, uzyskane po odwirowaniu osocza, przemywano 3 krotnie zimnym (4°C) roztworem soli fizjologicznej, a następnie zamrażano (-20°C) do czasu wykonania oznaczeń aktywności enzymów antyoksydacyjnych, to jest dysmutazy ponadtlenkowej (SOD; EC.1.15.1.9) przy pomocy zestawu RANSOD (SD 125, Randox), katalazy (CAT; EC.1.11.1.6) metodą Aebi [1] i reduktazy glutationowej (GR; EC.1.6.4.2) metodą Glatzle [6]. Ponadto, w próbach osocza krwi

oznaczano stężenie witaminy E (α - i γ -tokoferoli) i retinolu techniką HPLC według Sobczaka [7] oraz dialdehydu malonowego, jako markera peroksydacji lipidów, metodą Buege i Aust'a [3]. W próbach pełnej krwi oraz hemolizatach erytrocytów oznaczano stężenie hemoglobiny metodą Drabkin'a korzystając z zestawu diagnostycznego firmy Randox (HG 980).

Analiza statystyczna

Wszystkie wyniki przedstawiono jako średnie arytmetyczne \pm SD. Oceny istotności różnic pomiędzy wartościami przed- i powysiłkowymi dokonano stosując testy nieparametryczne Wilcoxon'a i Mann'a-Whitney'a, przyjmując za próg istotności wartość $p < 0,05$.

Wyniki badań

Średnie wartości przed- i powysiłkowe wszystkich badanych parametrów zebrano w tabeli 2.

Tabela 2

Przed- i powysiłkowe wartości aktywności wybranych enzymów oraz stężenia antyoksydantów we krwi i jej frakcjach

Parametr		Badanie 1 X \pm SEM	Badanie 2 X \pm SEM
Kinaza kreatynowa CK, U/l	Przed wys.	105,5 \pm 23,2	112,0 \pm 12,9
	Po wys.	132,4 \pm 32,1*	140,0 \pm 16,9*#
Dehydrogenaza LA LD, U/l	Przed wys.	228,4 \pm 12,46	305,5 \pm 25,6#
	Po wys.	278,3 \pm 13,14*	362,5 \pm 25,9##*
Amoniak NH ₃ , μ g/dl	Przed wys.	79,4 \pm 9,80	104,4 \pm 9,9
	Po wys.	148,8 \pm 17,90*	166,7 \pm 12,3*
Glukoza mg/dl	Przed wys.	96,35 \pm 2,62	85,3 \pm 6,0#
	Po wys.	158,8 \pm 8,74*	133,6 \pm 10,4*
Glutation GSH, μ g/mgHb	Przed wys.	2,94 \pm 0,13	2,82 \pm 0,16
	Po wys.	3,02 \pm 0,12	3,84 \pm 0,61*
Kwas moczowy, KM, mg/dl	Przed wys.	4,24 \pm 0,38	3,85 \pm 0,27
	Po wys.	5,23 \pm 0,43*	5,32 \pm 0,20*
Witamina E α -tokoferol, mg/l	Przed wys.	11,22 \pm 0,79	10,25 \pm 0,5
	Po wys.	11,80 \pm 0,89	10,69 \pm 0,58

Witamina E γ-tokoferol, mg/l	Przed wys.	0,64±0,09	0,46±0,07
	Po wys.	0,80±0,06	0,73±0,07
Witamina A Retinol, mg/l	Przed wys.	0,45±0,03	0,78±0,12#
	Po wys.	0,45±0,03	0,84±0,05#
Dysmutaza O ₂ ⁻ SOD, U/g Hb	Przed wys.	1218,4±68,7	930,5±74,92#
	Po wys.	1071,2±64,48*	782,6±56,7#*
Peroxidaza GSH GSH-Px, U/gHb	Przed wys.	42,9±3,6	35,8±4,4
	Po wys.	50,6±2,7 *	45,4±4,5*
Katalaza CAT, k/g Hb	Przed wys.	289,9±20,3	156,4±15,9 #
	Po wys.	276,9±24,3	156,7±11,3 #
Reduktaza GSH GR-FAD ⁺ , U/gHb	Przed wys.	24,2±1,2	21,1±1,6#
	Po wys.	24,7±1,1	22,4±1,6#
Reduktaza GSH GR+FAD ⁺ , U/gHb	Przed wys.	25,4±1,16	22,1±1,7#
	Po wys.	26,1±1,2	23,1±1,6#
EGRAC (deficyt B2 gdy>1,2)	Przed wys.	1,05±0,01	1,05±0,014
	Po wys.	1,05±0,009	1,02±0,004
Dialdehyd malonowy MDA, nmoli/ml	Przed wys.	2,24±0,46	2,81±0,37
	Po wys.	2,62±0,57*	3,05±0,33*
Selen we krwi, ng/ml	Przed wys.	59,3±2,1	62,3±4,9

Uwaga: * - różnice w stosunku do wartości przedwysiłkowych statystycznie istotne ($p < 0,05$, test Wilcoxon'a); # - różnice w stosunku do wartości uzyskanych w badaniu I statystycznie istotne ($p < 0,05$, test U Mann'a-Whitney'a)

Zarówno aktywność enzymów komórkowych, to jest kinazy kreatynowej (CK) i dehydrogenazy mleczanowej (LD), jak i enzymów antyoksydacyjnych oraz stężenia badanych metabolitów (glukoza, kwas moczowy, amoniak) i antyoksydantów niskocząsteczkowych (glutation zredukowany GSH, retinol, alfa- i gamma-tokoferole) były indywidualnie dość zróżnicowane. Z tego względu powysiłkowe zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych były nieistotne.

Istotnie ($p < 0,05$) wyższe od wartości spoczynkowych były powysiłkowe aktywności CK i LD, co stanowi typową reakcję organizmu na obciążenie wysiłkowe, świadczącą o zwiększeniu się przepuszczalności błon komórek mięśniowych. Obserwowano przy tym tendencję do przyjmowania wyższych spoczynkowych i powysiłkowych aktywności CK i LD, które, za wyjątkiem spoczynkowej aktywności CK

by istotnie wyższe w 2gim badaniu. Dodatkowym czynnikiem odpowiedzialnym za powysiłkowy wzrost aktywności enzymów komórkowych w osoczu krwi jest zmniejszenie objętości osocza krwi po jednorazowym bodźcu wysiłkowym.

Typową reakcją na stres wysiłkowy był również wzrost stężenia glukozy ($p < 0,05$), wskutek jej mobilizacji z rezerwy glikogenowej w wątrobie, oraz amoniaku ($p < 0,05$), co wynikało z nasilonych, szczególnie w warunkach pracy o intensywności maksymalnej, reakcji katalizowanych przez kinazę adenylanową oraz deaminazę AMP. Deaminacja AMP do inozynomonofosforanu (IMP) musiała prowadzić do zwiększenia się puli ksantyny i hipoksantyny utlenianych przez układ dehydrogenazy i oksydazy ksantynowej do kwasu moczowego [4, 5], którego stężenie po wysiłku również istotnie wzrastało ($p < 0,05$). Innym skutkiem reakcji utlenienia ksantyny i hipoksantyny była niewątpliwie nasilona generacja anionorodników nadadtlenkowych (O_2^-).

Stężenie glutationu po wysiłku wzrastało, chociaż różnica w stosunku do wartości spoczynkowej była istotna tylko w drugim badaniu, natomiast w obu badaniach obserwowano znamienne wzrost stężenia dialdehydu malonowego (MDA) jako markera stresu oksydacyjnego. Obserwowano przy tym tendencję do przyjmowania wyższych wartości stężenia MDA w badaniu 2, chociaż różnice w stosunku do badania 1 nie były istotne statystycznie. Średnie stężenie selenu w pełnej krwi było w obu badaniach niższe od dolnej granicy przedziału referencyjnego (80 ng/ml – 250 ng/ml) [8].

Różnice pomiędzy przed- i powysiłkowym poziomem witamin antyoksydacyjnych (witaminy E i retinolu) były nieznamienne. Wystąpiła tendencja do obniżenia się stężenia alfa-tokoferolu w 2gim badaniu, chociaż w obu przypadkach mieściło się ono w zakresie optymalnym.

Reakcja enzymów obrony antyoksydacyjnej na zwiększone stężenia reaktywnych form tlenu była zróżnicowana. Aktywność dysmutazy nadadtlenkowej (SOD) obniżała się po wysiłku ($p < 0,05$), aktywności

katalazy (CAT) i reduktazy glutationowej (GR) praktycznie nie ulegały zmianie, natomiast aktywność peroksydazy glutationowej wzrastała ($p < 0,05$).

Porównując wyniki uzyskane w obu badaniach stwierdzono istotne obniżenie się przed- i powysiłkowych wartości aktywności SOD, CAT i GR w badaniu 2 w stosunku do badania pierwszego, co może świadczyć o mniejszej skuteczności obrony antyoksydacyjnej w tej fazie treningu. Potwierdzeniem tej hipotezy może być tendencja do przyjmowania wyższych wartości MDA w tym badaniu oraz stwierdzone istotnie wyższe powysiłkowe wartości aktywności CK i LD, pomimo praktycznie niezmienionego poziomu witaminy E, glutationu i kwasu moczowego oraz wyższego stężenia retinolu.

Interesującym było stwierdzenie, przy pomocy nieparametrycznej analizy korelacji Spearmana, występowania istotnych zależności pomiędzy:

1. Aktywnością kinazy kreatynowej (CK) a stężeniem MDA (R Spearmana = 0,702, $p=0,0002$ dla wartości spoczynkowych i $R=0,7202$, $p=0,0007$ dla wartości powysiłkowych), oraz
2. Powysiłkową aktywnością CK i powysiłkowym stężeniem amoniaku ($R = 0,435$, $p=0,03$).

U tych zawodniczek, u których stwierdzono podwyższony ponad normę fizjologiczną poziom CK (>195 U/l) i podwyższone stężenie amoniaku, obserwowano również wyższe niż u pozostałych badanych, stężenie dialdehydu malonowego (MDA), świadczące o występującym u nich wolnorodnikowym procesie peroksydacji lipidów. Oksydacyjna modyfikacja reszt nienasyconych kwasów tłuszczowych wchodzących w skład lipidów błonowych prowadzi do zwiększenia przepuszczalności błon komórkowych wskutek oksydacyjnego uszkodzenia struktury błon, co umożliwia ucieczkę białek komórkowych (w tym CK i LD) do krwioobiegu.

Wnioski

Podsumowując wyniki uzyskane w niniejszej pracy można stwierdzić, że:

1. Wysiłek o stopniowo narastającej intensywności do maksymalnego indywidualnego zmęczenia wykonany na bieżni ruchomej nie spowodował u badanych zawodniczek, w obu badaniach, istotnych zmian statusu antyoksydacyjnego krwi ocenianego na podstawie aktywności enzymów antyoksydacyjnych i antyoksydantów nieenzymatycznych.
2. Podwyższone stężenie MDA po wysiłku biegowym, świadczące o nasileniu się stresu oksydacyjnego podczas intensywnej pracy mięśniowej, może wskazywać, że jedną z przyczyn zwiększonej ucieczki białek komórkowych do krwioobiegu są oksydacyjne uszkodzenia struktury błon komórek mięśniowych.
3. Na koniec okresu przygotowawczego rundy wiosennej stan obrony antyoksydacyjnej krwi u badanych piłkarek uległ niewielkiemu pogorszeniu, głównie wskutek obniżonej aktywności głównych enzymów antyoksydacyjnych, to jest dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT).
4. Średnie wartości stężenia selenu w pełnej krwi stwierdzone w obu badaniach były niższe od wartości referencyjnych (80-250 ng/ml), co potwierdza wcześniejsze obserwacje o występowaniu umiarkowanego deficytu tego pierwiastka w populacji mieszkańców Górnego Śląska.

Piśmiennictwo

1. Beutler H. 1974. Catalase. Methods of Enzymatic Analysis, Bergmeyer HU (Ed), pp 673-683
2. Beutler E, Duron O, Mikus Kelly B. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med 61:882-888
3. Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. Methods in Enzymology, Academic Press, New York, 52:302-310

A

4. Hellsten-Westing Y, Ekblom B, Sjödin B. The metabolic relation between hypoxanthine and uric acid in man following maximal short-distance running. *Acta Physiol Scand* 1989; 137: 341-345
5. Hellsten-Westing Y, Sollevi A, Sjödin B. Plasma accumulation of hypoxanthine, uric acid and creatine kinase following exhausting runs of differing durations in man. *Eur.J.Appl.Physiol.* 1991; 62: 380-384
6. Glatzle G, Korner WF, Christeller S, Wiss O. 1970. Method for the detection of a biochemical riboflavin deficiency. Stimulation of NADPH₂-dependent glutathione reductase from human erythrocytes by FAD in vitro. Investigations on the vitamin B₂ status- in healthy people and geriatric patients. *Intern J Vit Res* 40: 166-183.
7. Sobczak A, Skop B, Kula B. 1999. Simultaneous determination of serum retinol and alpha- and gamma-tocopherol levels in type II diabetic patients using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed. Sci. Appl.* 730: 265-271
8. Koller LD and Exon JH. 1986. The two faces of selenium-deficiency and toxicity-are similar in animals and man. *Can. J. Vet.* 50: 297-306

Summary

The aim of this study was to evaluate the effect of a graded running exercise on the enzymatic and non-enzymatic blood antioxidant defence system in female soccer players. The following variables were examined: activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase, as well as plasma concentrations of low molecular weight antioxidants (α - γ -tocopherols, reduced glutathione) and markers of oxidative stress (plasma concentration of malondialdehyde and uric acid as well as the activity of creatine kinase). Venous blood samples were drawn at rest and 3-4 min. after completion of a graded running test carried on to volitional exhaustion performed during the general preparation phase of the yearly training cycle. It was found that the graded running test did not lead to significant changes in either activities of antioxidant enzymes or non-enzymatic antioxidants. However, the post-exercise increases in malondialdehyde content and activity of

creatine kinase may imply that the graded running test resulted in the enhancement of oxidative stress, but it did not compromise the blood antioxidant defence. During the last 2 min of each training load, choice reaction time was measured (MRK 433).