

A. M. Niess¹,
S. Veihelmann¹, F. Passek²,
K. Roecker¹, H.-H. Dickhuth¹,
H. Northoff², E. Fehrenbach²

Belastungsinduzierter oxidativer Stress: DNA-Schäden und Expression von Stressproteinen in Leukozyten — Eine Übersicht

Exercise induced oxidative stress: DNA damage and
expression of stress proteins in leucocytes - An overview

¹ Medizinische Klinik und Poliklinik, Abteilung Sportmedizin
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. H.-H. Dickhuth)

² Abteilung Transfusionsmedizin mit Blutbank (Ärztlicher Direktor: Prof.
Dr. H. Northoff), Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Diese Studie wurde mit Förderungsmitteln des Bundesinstitutes für
Sportwissenschaft Köln unterstützt (VF 0407/01/21/97)

Zusammenfassung

Belastungsassoziierte immunologische Reaktionen umfassen auch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS), insbesondere im Rahmen der Aktivierung von Leukozyten. Das Ausmaß an daraus resultierendem oxidativem Stress und zellulärer Schädigung hängt ganz entscheidend von der Kapazität antioxidativer Mechanismen ab. Wir untersuchten an 10 Probanden den Einfluß einer intensiven Ausdauerbelastung auf DNA-Schäden in Leukozyten sowie daraus separierter mononukleärer Zellen und die cytoplasmatische Expression der antioxidativen Stressproteine HSP70 und Hämoxxygenase-1 (HO-1) in Lympho- (L), Mono-(M) und Granulozyten (G). Im single-cell-gelelectrophoresis (SCG)- Assay zeigten die Gesamtleukozyten einen Anstieg DNA-geschädigter Zellen von 2% (Medianwert) in Ruhe auf 33% 24 h nach Belastung. Eine geringere Zunahme auf 15% fand sich in den separierten mononukleären Zellen. Durchflußzytometrisch konnte in den M und G zu allen Zeitpunkten nach Belastung ein deutlicher Anstieg HSP70-positiver Zellen beobachtet werden. Die Expression der HO-1 wurde in den L, deutlicher jedoch in M und G zu allen Zeitpunkten

stimuliert. Somit zeigten sowohl DNA-Schäden als auch die Expression von HSP70 und HO-1 bevorzugt in den G, für die Stressproteine auch in den M, eine deutliche Reaktion auf die intensive Ausdauerbelastung, was wir als Folge der in diesen Zellpopulationen gesteigerten Generierung von ROS interpretieren. Dabei bleibt offen, ob den DNA-Effekten eine direkte Schädigung der DNA durch ROS oder aber Apoptose zugrunde liegt. Die gesteigerte Expression von HSP70 und HO-1 kann als Schutzmechanismus zum Erhalt von Funktion bzw. proliferativer Kapazität der Leukozyten unter körperlicher Belastung interpretiert werden.

Schlüsselwörter: Sportliche Belastung, oxidativer Stress, Leukozyten, DNA-Schäden, Hitzeschockproteine, Hämoxxygenase

Summary

Heavy endurance exercise leads to oxidative stress, which is one feature of the inflammatory response. Leucocytes are involved in the generation of ROS such as superoxide and NO, but are also capable of expression of antioxidative stress

proteins. Our studies involved a quantification of DNA damage in leucocytes and separated mononuclear cells of 10 athletes after a half marathon run (HM) using the single cell gelelectrophoresis (SCG) - assay. Additionally cytoplasmic expression of heat shock protein 70 (HSP70) and heme oxygenase-1 (HO-1) in lymphocytes (L), monocytes (M) and granulocytes (G) was analysed by flow cytometry. The increase of percent DNA damaged cells 24 h after the HM was greater in total leucocytes (+ 31%) compared to separated mononuclear cells (+ 13%) indicating a greater extent of DNA effects in G. Expression of HSP70 was enhanced in M and G 3 and 24 h after HM, whereas the low HSP70-expression of L at rest was unchanged after exercise. In contrast HO-1 positive L rose but G and M exhibited a greater post exercise expression of this stress protein. The results indicate, that DNA damage detected after heavy endurance exercise occurred primarily in G. Whether the exercise induced DNA damage is caused by a direct reaction of ROS with DNA bases or if apoptosis is involved, remains unclear. The DNA effects in G and the inducible expression of antioxidative stress proteins in G and M indicate, that they are critical target cells susceptible to exerci-



se induced oxidative stress. An enhanced expression of HSP70 and HO-1 might be an important mechanism of the response to oxidative stress, which allows the maintainance of viability, function and proliferative capacity in leucocytes during heavy exercise.

Keywords: exercise, oxidative stress, leucocytes, DNA damage, heat shock proteins, heme oxygenase

Einleitung und Übersicht

Akute sportliche Belastungen induzieren ebenso wie regelmäßiges körperliches Training vielfältige Reaktionen des Immunsystems. Das wachsende Interesse der Sportmedizin an immunologischen Fragestellungen konnte in den letzten Jahren belastungsassoziierte Akut- und Anpassungsreaktionen aufzeigen, die sich z.B. im Verhalten lymphozytärer Subpopulationen, der Mobilisierung von Mono- und Granulozyten, einer Aktivierung von Komplementsystem und Cytokinen sowie auch der Expression von Stressproteinen manifestieren (22, 54, 61, 63). Neben dem modulierenden Einfluß von Sport auf die körpereigene Immunabwehr ist dabei in funktioneller Hinsicht insbesondere der durch die genannten Mechanismen hervorgerufene Entzündungsprozeß von Interesse (48), bestimmt er doch nicht unwesentlich den Ablauf muskulärer Regeneration und Adaptation nach höheren oder ungewohnten sportlichen Belastungen (67). Ein wichtiger Bestandteil dieser Entzündungsreaktion ist die Generierung reaktiver Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species, ROS) und der daraus resultierende oxidative Stress (73).

Reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS)

ROS weisen ein oder mehrere ungepaarte Elektronen (\cdot) auf, sind dadurch extrem reaktionsfreudig und entfalten so zum einen Wirkung gegenüber pathogenen Mikroorganismen oder Tumorzellen, entwickeln andererseits jedoch auch gewebstoxische Effekte. Zu den wichtigsten ROS zählen das Superoxid ($\cdot\text{O}_2$), Hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) und Stickoxidradikal ($\cdot\text{NO}$). Aus diesen können durch Umwandlung weitere oxidierende Derivate wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hypo-

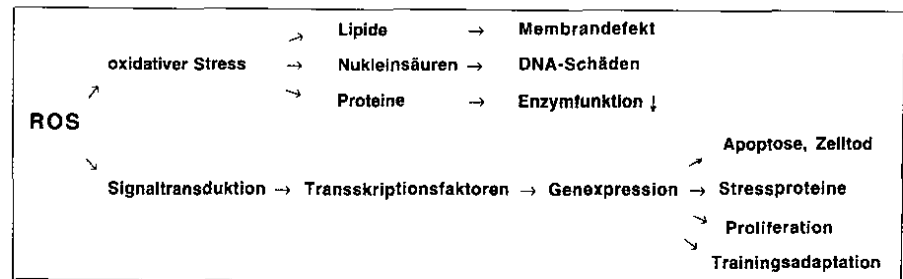


Abbildung 1: Schematische Darstellung möglicher zellulärer Reaktionen auf reaktive Sauerstoffverbindungen. Modifiziert nach (12).

chlorsäure (HOCl) oder Peroxynitrit (ONOO^\cdot) entstehen, die z.T. eine noch höhere Toxizität als die eigentlichen ROS besitzen. Die Wirkung von ROS und ihren Folgeprodukten umfassen die Schädigung von Membranlipiden, Proteinen, Nukleinsäuren und extrazellulärer Matrix. Alimentär aufgenommene Antioxidantien und verschiedene körpereigene antioxidative Systeme wirken den bereits unter Ruhebedingungen generierten ROS entgegen und halten normalerweise das Ausmaß an oxidativem Stress innerhalb bestimmter Grenzen. Die Bedeutung antioxidativer Mechanismen erwächst aus der Erkenntnis, daß oxidativem Stress eine wichtige kausale Rolle sowohl bei der Pathogenese von verschiedenen akuten und chronischen Erkrankungen, als auch dem Alterungsprozeß zugeschrieben wird (28). In ähnlichem Sinne wird ROS eine Bedeutung beim Sport eingeräumt, gleichwohl hier eine eindeutige Klärung der Frage nach dem Ausmaß an tatsächlicher praktischer Relevanz aussteht.

Allerdings fungieren ROS nicht nur als Verursacher von oxidativem Stress. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, daß sie als sekundäre Botenstoffe an der Genexpression beteiligt sind (71). So kann die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren $\text{NF}\kappa\text{B}$ und AP-1 durch ROS stimuliert und beispielsweise unter Einwirkung von H_2O_2 die Genexpression der Hämoxxygenase, einem antioxidativen Stressprotein, in Makrophagen gefördert werden (38). Ob solche Vorgänge auch im Rahmen körperlicher Belastung eine Rolle spielen und ROS letztendlich auch bei der Induktion trainingsadaptativer Veränderungen Bedeutung besitzen, ist noch weitgehend unklar (Abb. 1).

Quellen von ROS unter körperlicher Belastung

Für die Generierung von ROS unter körperlicher Belastung werden verschiedene Mechanismen diskutiert (65).

- **Mitochondriale Atmungskette:** Partuell (2 - 5%) unvollständige Reduktion von Sauerstoff in der Atmungskette nur bis zur Stufe des $\cdot\text{O}_2$, wobei sich die Absolutmenge gebildeter ROS bei ansteigendem Sauerstoffumsatz in der arbeitenden Muskulatur erhöht (7). Dabei dürfte ein im Verlauf intensiverer Belastungen anzunehmender Aktivitätsverlust der mitochondrialen Cytochromoxidase (25) die Entstehung von $\cdot\text{O}_2$ zusätzlich begünstigen.

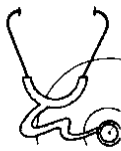
- **Xanthinoxidase:** Insbesondere intensive Belastungen führen über den ATP-break down zu einem vermehrten Anfall von AMP. Dessen weiterer Abbau via Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure wird in den letzten beiden Schritten durch das Enzym Xanthinoxidase unter Bildung von $\cdot\text{O}_2$ katalysiert (26).

- **Fenton-Reaktion:** Einen weiteren Mechanismus der ROS-Entstehung stellt die Umwandlung von H_2O_2 in das weitaus aggressivere $\cdot\text{OH}$ -Radikal via Fenton-Reaktion unter Anwesenheit freien Eisens dar. Eine gesteigerte Freisetzung von Eisen aus Häm- und Myoglobin bzw. deren Abbauprodukten unter Belastung begünstigt diese Reaktion (4, 34).

ROS aus immunkompetenten Zellen

Im Immunsystem sind eine Reihe an Zellen in der Lage relevante Mengen an ROS zu bilden. Neben den neutrophilen Granulozyten sind dies insbesondere Monozyten bzw. Makrophagen, aber auch eosinophile Granulozyten, also Zellpopulationen, deren Aktivierung

WISSENSCHAFT



auch unter körperlicher Belastung nachweisbar ist (8, 10).

- Die Aktivierung neutrophiler Granulozyten induziert den oxidativen Burst, dessen initiale Reaktion über eine Stimulation der NADPH-Oxidase zunächst zur Generierung von $\cdot\text{O}_2$ und dann in weiteren Schritten über H_2O_2 letztendlich zu der Bildung von HOCl führt (54). Das entscheidende Enzym dieser letzten Reaktion ist die Myeloperoxidase, die allgemein auch als Marker für die Degranulation neutrophiler Granulozyten Anwendung findet. Anstiege der Myeloperoxidase konnten bei Belastungen von unterschiedlicher Dauer und Intensität, insbesondere jedoch mit zusätzlicher exzentrischer Komponente dokumentiert werden (9, 51).

- In Monozyten bzw. Makrophagen führt eine cytokinvermittelte Aktivierung der induzierbaren Stickoxid-Synthase (iNOS) zur Bildung von Stickoxid ($\cdot\text{NO}$) aus L-Arginin (27). Neuere Erkenntnisse geben den Hinweis, daß auch Granulozyten in der Lage sind, $\cdot\text{NO}$ zu bilden (78). Die Toxizität von $\cdot\text{NO}$ resultiert u.a. aus seinem Metaboliten Peroxynitrit (ONOO^\cdot). $\cdot\text{NO}$ hat einen Einfluß auf das Auftreten von DNA-Schäden, indem es einerseits DNA-Reparaturenzyme wie das Fpg-Protein hemmt (80), zum anderen jedoch direkt selbst DNA-Strangbrüche induzieren kann (70). Im Energiestoffwechsel umfassen die komplexen Wirkungen von $\cdot\text{NO}$ u.a. eine Inhibierung der NADH-Ubiquinon- und Succinat-Ubiquinon-Oxidoreduktase in der mitochondrialen Atmungskette (69) sowie der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase in der Glykolyse (45). Ob und inwieweit die Eigenschaften des von Leukozyten produzierten $\cdot\text{NO}$ im Rahmen körperlicher Belastung eine Rolle spielen, ist noch weitgehend unklar. Außerdem sind Monozyten ähnlich wie neutrophile Granulozyten auch in der Lage O_2 zu bilden.

Bedeutung der leukozytären ROS-Generierung

Die Generierung von ROS durch Leukozyten verursacht sowohl im infiltrierten Gewebe (79) als auch in den Zellen selbst Veränderungen und Schäden. So spielen ROS von ins Gewebe einwandernden Granulozyten und Monozyten beim postischämischen Reperfusionss-

schaden, wie er z.B. im Myokard nach Ballondilatationen beobachtet werden kann, eine wichtige pathophysiologische Rolle (6). Oxidativem Stress wird auch eine Bedeutung bei der Entstehung des belastungsinduzierten Muskelschadens zugerechnet (32, 37, 20). Kommt es bereits in den ersten Stunden nach exzentrischer Muskelbelastung zur Einwanderung von Granulozyten in das beanspruchte Muskelgewebe, so beginnt im Verlauf auch eine Infiltration durch Monozyten bzw. Makrophagen, die etwa nach 24 bis 48 Stunden ihr Maximum erreicht (3, 67). Im Rahmen der sich somit manifestierenden Entzündungsreaktion ist der Bildung von ROS durch einwandernde Leukozyten ein Anteil an der Entstehung des belastungsinduzierten Muskelschadens zuzurechnen (21).

Verursacht die Aktivierung von Leukozyten einerseits eine Schädigung von eindringenden Mikroorganismen oder des infiltrierten Gewebes, so sind diese Zellen zum anderen jedoch selbst von der Generierung der ROS im Sinne einer Autooxidation betroffen. Wie in-vitro-Versuche zeigen konnten, führt der Einfluß von ROS zu Veränderungen der Funktion neutrophiler Granulozyten. Dabei waren sowohl eine Abschwächung von Migrations- und Phagozytosefähigkeit unter Einfluß von H_2O_2 (5) als auch eine reduzierte $\cdot\text{O}_2$ -Bildung nach $\cdot\text{NO}$ -Exposition dieser Zellen (17) beobachtet worden. Dies könnte möglicherweise die verminderte Stimulierbarkeit neutrophiler Granulozyten zur Produktion von $\cdot\text{O}_2$ nach einer zuvor erfolgten Belastung (36) erklären.

Belastungsinduzierte DNA-Schäden in Leukozyten

Mit Hilfe des single-cell-gelelectrophoresis (SCG)-Assays zeigten *Hartmann et al.* (31) das Auftreten von DNA-Schäden in Leukozyten 24 Stunden nach intensiver anaerober Belastung, ein Befund der mittlerweile auch nach einer längeren intensiven Ausdauerbelastung beobachtet werden konnte (47). Der SCG-Assay ist eine empfindliche Methode zur Ermittlung von Einzelstrangbrüchen und alkalilabilen Stellen der DNA in Einzelzellen (42). Unter Anwendung einer anderen Methode fanden *Sen et al.* (60) ebenfalls Hinweise auf belastungsinduzierte Strangbrüche der leukozytären DNA.

Unklar ist, welche Bedeutung DNA-Schäden für die Leukozytenfunktion selbst darstellen. Die im SCG-Assay nach körperlicher Belastung zu beobachtenden DNA-Effekte sind nicht mit gleichzeitig auftretenden Chromosomenveränderungen verbunden (29). Dies deutet auf die suffiziente Reparatur der DNA-Läsionen durch entsprechende Endonukleasen hin. Theoretisch gesehen dürften in weiter proliferierenden Zellen wie Lymphozyten DNA-Schäden eher eine Relevanz besitzen als beispielsweise in neutrophilen Granulozyten, die nur eine Halbwertszeit im Stundenbereich aufweisen. In den bisher vorliegenden Arbeiten wurden die DNA-Effekte jeweils in den Gesamtleukozyten bestimmt, so daß nicht erkennbar war, ob Unterschiede in Abhängigkeit der einzelnen Zellpopulation vorlagen.

Nicht vollständig geklärt ist auch die Frage nach den kausalen Mechanismen, die den belastungsinduzierten DNA-Effekten zugrundeliegen. Oxidativer Stress dürfte allerdings als wahrscheinlichste Ursache angesehen werden, ließen sich doch unter der Gabe von α -Tocopherol geringere DNA-Effekte beobachten (30). Unklar bleibt jedoch, ob die Effekte Folge einer Generierung von ROS in den Leukozyten selbst sind. Durch das verzögerte Auftreten der DNA-Schäden 24 Stunden nach Belastung müssen zudem sekundäre Mechanismen wie eine Interaktion von Produkten der Lipidperoxidation und der DNA diskutiert werden (15).

Antioxidativ wirksame Mechanismen

Den Wirkungen von ROS stehen alimentäre und endogene Antioxidantien sowie körpereigene antioxidative Schutzmechanismen gegenüber (s. Tabelle 1). Ist die Funktion alimentärer Antioxidantien von deren Zufuhr über die Ernährung abhängig, so lassen sich bei einem Teil der körpereigenen antioxidativen Schutzsysteme auch Anpassungsreaktionen dokumentieren (16, 43).

Die körpereigenen Schutzsysteme umfassen die Superoxiddismutase (SOD), Catalase, Glutathionperoxidase, die Hitzeschockproteine HSP27 und HSP70 sowie die Hämoxigenase (64). Einige dieser Enzyme mit antioxidativem Potential sind Mitglieder der Stressproteinfamilie, im speziellen die SOD und das 32-KD-



Tabelle 1: Beispiele der wichtigsten Antioxidantien und endogenen antioxidativen Schutzmechanismen.

Alimentäre Antioxidantien
Vitamin A, C und E
Flavonoide
N-Acetylcystein
Endogene Antioxidantien
Harnsäure
Bilirubin
Adrenalin
NADH, NADPH
Ubichinol
Antioxidative Schutzsysteme
Superoxiddismutase (SOD)
Catalase
Glutathionperoxidase
Stressproteine
(z. B. HS27, HSP70, Hämoxxygenase)

oxidationsspezifische Stressprotein Hämoxxygenase (44). Beide Enzyme spielen eine besondere Rolle bei der Eliminierung von ROS, die auch während Phagozytosevorgängen und Entzündungsreaktionen produziert werden (52).

Antioxidative Stressproteine

Die Hitzeschockproteine (HSP), auch Stressproteine genannt, sind hochkonservative Proteine, die von Zellen als Antwort auf Hitzeschock (40-43°C), Stress oder ROS zum Schutz vor schädlichen Molekülen oder bakteriellen Toxinen produziert werden. Die HSP lassen sich anhand ihres Molekulargewichtes in vier große Molekülfamilien mit 90 KD, 70 KD, 60 KD und 10-30 KD einteilen. HSP machen die Zellen widerstandsfähiger gegen normalerweise letale Toxindosen oder zellschädigende Temperaturerhöhungen. Einige HSP üben Chaperonfunktion aus. Sie helfen bei der korrekten Faltung von Proteinen, bei der Einschleusung von wichtigen Proteinen in die Mitochondrien, beim Transport im Cytoplasma und an den Ribosomen, beim Abbau von Stoffwechselprodukten, bei der Degradierung von abnormalen Proteinen oder bei der Eliminierung von phagozytiertem Material und spielen eine Rolle als Regulatorproteine (20, 36, 51, 60, 81).

HSP70 bietet einen speziellen Schutz vor oxidativem Stress durch die cytotoxische

Aktivität von Tumornekrosefaktor α (33, 39). Die HSP hemmen auf dem Weg der Signaltransduktion die Phospholipase A_2 und damit den Arachidonsäurezyklus und die Produktion von ROS. Auch für IL-1 wird eine solche Funktion der HSP diskutiert (52). Wichtig erscheint die Induzierbarkeit dieser HSP durch Stressoren. So wird HSP70 unter hypoxischem Reiz vermehrt in proximalen Tubuluszellen der Niere exprimiert (74). In menschlichen Lymphozyten läßt sich unter oxidativem Stress eine gesteigerte Synthese von HSP27 und HSP70 nachweisen, die auch positive Auswirkungen auf den Erhalt der proliferativen Kapazität dieser Zellen zeigt (41).

Zu den Stressproteinen wird auch die Hämoxxygenase (HO) gezählt, bei der zwei Isoformen unterschieden werden, die konstitutive HO-2 (36 KD) und die induzierbare HO-1 (32 KD). Zu ihren Substraten gehören Häm, Methämoglobin, denaturiertes Myoglobin, Cytokine, Hormone, Schwermetalle, bakterielle Toxine u.a.. Eine gesteigerte Expression der HO-1 bietet den Zellen Schutz vor oxidativem Stress (12, 62, 68, 72, 77), indem sie über eine Induktion der Synthese von Ferritin den intrazellulären Pool an freiem Eisen reduziert und den initialen Schritt beim Abbau von Häm zu Bilirubin katalysiert (1). In-vitro-Versuche konnten eine vermehrte HO-1-Expression in Säugetierzellen unter Einwirkung von ROS dokumentieren (2, 75).

Einfluß von körperlicher Belastung auf Aktivität und Expression von antioxidativen Schutzsystemen

Für die antioxidativen Enzyme SOD, Catalase und Glutathionperoxidase wurde in einer Reihe von Studien eine Aktivitätszunahme unter einer akuten körperlichen Belastung beschrieben, gleichwohl hier auch widersprüchliche Ergebnisse vorliegen (35, Review). Gesicherter ist demgegenüber der aktivitätsfördernde Einfluß eines regelmäßigen Trainings auf diese antioxidativen Enzyme (16, 55).

Im Gegensatz dazu beschäftigten sich bisher nur wenige Untersuchungen mit den Auswirkungen von Sport auf die HSP-Expression (40, 56-58). *Salo et al.* (57) beschreiben die Expression verschiedener HSP 30-60 Minuten nach Sport auf Protein und RNA-Ebene in

Skelettmuskel, Herz und Leber von Ratten. In einer weiteren Studie am Rattenmodell wurde beschrieben, daß Ausdauertraining die Expression des HSP70-Proteins im Plantarismuskel steigert (58). In einer Studie, bei der Sportler unter Hitzebedingungen belastet wurden, fand sich eine Zunahme von HSP70 in Leukozyten, welche nach einem zusätzlichen Hitzeschock der Zellen in-vitro jedoch herunterreguliert wurde (56). Inwieweit eine akute körperliche Belastung eine Induktion der HO-1-Expression in Leukozyten verursacht, ist unklar.

Unser Ziel war es, leukozytäre Stressreaktionen auf eine intensive Ausdauerbelastung näher einzugrenzen. Mit Hilfe der Untersuchung von DNA-Schäden und der Expression der antioxidativen Stressproteine HSP70 und HO-1 sollten neue Erkenntnisse über den Einfluß von belastungsinduziertem oxidativem Stress in unterschiedlichen Leukozytenpopulationen gewonnen werden.

Material und Methoden

Studiendesign

Zehn gesunde männliche Laufausdauer-sportler (30.8 \pm 9.5 J., 175.0 \pm 3.3 cm, 64.4 \pm 3.7 kg, durchschnittlicher Trainingsumfang 52.1 \pm 20.7 Laufkilometer/Woche) absolvierten eine längere intensive Ausdauerbelastung, die durch Teilnahme an einem offiziellen Halbmarathonwettkampf (21.1 km, Laufzeit 89.6 \pm 10.6 min, Laktat n. Belastung 5.4 \pm 2.4 mmol \cdot l⁻¹) realisiert wurde. Alle Teilnehmer der Studie gaben eine subjektive Ausbelastung durch den Wettkampf an, waren sämtlich Nichtraucher und verneinten sowohl die Einnahme von Medikamenten als auch von Vitamin- oder Mineralstoffpräparaten.

Vor, direkt, 3 und 24 und 48 Stunden nach dem Lauf erfolgten venöse Blutabnahmen in EDTA-Plastikmonovetten. Pro Abnahme wurden zudem 5 ml Vollblut zur Bestimmung der Myeloperoxidase in Glasröhrchen ebenfalls unter Zusatz von EDTA gewonnen. Begleitend nahmen wir kapilläre Blutabnahmen zur Laktatbestimmung im hämolysierten Vollblut vor dem Lauf sowie sofort nach Zielankunft vor.



Probenbehandlung

Aus 2 ml Vollblut wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation ($3000 \text{ U} \cdot \text{l}^{-1}$) unter Verwendung einer Ficoll/ATS/Iopromid-Lösung (Fa. Biochrom, Berlin) von $1.077 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Dichte die mononukleären Zellen isoliert. Das in Plastik und Glasröhrchen gewonnene EDTA-Blut wurde bei 4°C über 10 Minuten zentrifugiert und der Plasmaüberstand bei -70°C eingefroren. Zudem wurden aus 5 ml Vollblut von 8 Probanden sofort Leukozyten über eine Dichtegradientensedimentation (Lymphoflot, Fa. Biotest, Dreieich) separiert und der FACScan-Analyse zugeführt.

Analytische Methoden

SCG-Assay

Zur Quantifizierung der DNA-Schäden in den Gesamtleukozyten und mononukleären Zellen zu den Zeitpunkten vor, 3, 24 und 48 h nach Belastung wurde der SCG-Assay bis auf kleine Abänderungen wie von Singh *et al.* (1988) beschrieben durchgeführt. $15 \mu\text{l}$ Vollblut bzw. $10 \mu\text{l}$ der zuvor isolierten mononukleären Zellsuspension wurden in jeweils $400 \mu\text{l}$ Low-melting(LMP)-Agarose vorsichtig durchmischt und davon $100 \mu\text{l}$ auf einen mit normaler Agarose vorbeschichteten Objektträger aufgetragen. Nach Kühlung wurden die Objektträger für eine Stunde in 4°C kalten Lysepuffer (2.5 M NaCl , 100 mM EDTA , 10 mM Tris , $1\% \text{ Sodium-Laurylsarcosine}$, $\text{pH } 10.0$); sowie frische Zugabe von $1\% \text{ Triton-X}$ und $10\% \text{ DMSO}$ gegeben. Nach anschließender Alkalibehandlung über 40 Minuten im Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH , 1 mM EDTA , $\text{pH } 13.0$) erfolgte eine 20minütige horizontale Elektrophorese der Objektträger, bei einer Spannung von $0.86 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ und 300 mA vorgenommen. Nach dreimaliger Neutralisierung mit Tris-Puffer (0.4 M , $\text{pH } 7.5$) wurde eine Färbung der Proben mit jeweils $50 \mu\text{l}$ Ethidiumbromid ($20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) und im Anschluß daran die Quantifizierung der DNA-Migration (image length) im elektrischen Feld mittels Okularskalierung unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiolab, Fa. Zeiss, Jena) vorgenommen.

Pro Objektträger wurden 50 Zellen ausgewertet. In den vor Belastung gewonnenen Kontrollen lag der mittlere image length (IL) der Probanden bei $30.6 \pm 0.2 \mu\text{m}$ (Leukozyten) bzw. $30.7 \pm 0.2 \mu\text{m}$

(mononukleäre Zellen). Entsprechend den Empfehlungen von McKelvey-Martin *et al.* (42) wurde daher eine Zelle oberhalb eines Schwellenwertes von $32.5 \mu\text{m}$ IL als positiv gewertet und das Ergebnis in Prozent DNA-geschädigter Zellen pro Probe angegeben.

Myeloperoxidase-ELISA

Die Bestimmung der Myeloperoxidasekonzentration (MPO) erfolgte aus den in Glasröhrchen bei -70°C gelagerten Plasmaproben unter Verwendung eines Myeloperoxidase-ELISA-Kits (Fa. Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden). Die MPO-Konzentration wurde mittels eines vollautomatisierten ELISA-Readers (Fa. Biermann, Bad Nauheim) bei 405 nm ermittelt.

FACScan-Analyse

Die Bestimmung der HSP im Cytoplasma zu den Zeitpunkten vor, 3 und 24 h nach Belastung geschah über eine indirekte Immunfluoreszenzmessung mit Hilfe des Zellpermeabilisierungskits FIX&PERM (An der Grub, Wien, Austria). 1×10^6 Zellen wurden zunächst in Suspension fixiert (Reagenz A). Anschließend wurde ihre Zellmembran permeabilisiert (Reagenz B) und gleichzeitig die Zellen 15 Minuten im Dunkeln mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern ($1 \mu\text{g}$ pro Test) (StessGen, Biotechnologies Corp., Canada) inkubiert: SPA810 (specific for the inducible form of human HSP70; IgG1, clone C92F3A5), OSA100 (Heme Oxygenase-1, rabbit polyclonal antiserum). Nach zweimaligem Waschen folgte die 20minütige Bindung des FITC-markierten Sekundärantikörpers (FITC-conjugated goat antimouse/rat/rabbit F(ab')₂ IgG, Dianova, Hamburg). Die Messungen erfolgten mit dem FACScan-Gerät EPICS-XL-MLC (Fa. Coulter, Krefeld).

Doppelmarkierungen mit den Antikörpern CD45/CD14 und CD3/CD16-56 wurden zur Validierung der Subpopulationen Lymphozyten und Monozyten durchgeführt. Lympho-, Mono- und Granulozyten wurden bei den weiteren Messungen im Scattergramm mit Hilfe von „gates“ eingegrenzt. Als Negativkontrollen wurden die entsprechenden Isotypkontrollen (IgG1-FITC, Southern Biotechnology Association/BIOZOL) und FITC-markierten Zweitantikörper eingesetzt. Die Quantifizierung der Expression von HSP70 und HO-1 erfolgte in %

positiver Zellen und Fluoreszenzintensität (mean fluorescence channel, MFC).

Weitere Bestimmungen

Hämoglobin und Hämatokrit sowie die Aktivität der Creatinkinase (CK) im Plasma wurde innerhalb unserer Laborroutine bestimmt. Die nach Belastung gewonnenen Werte für MPO und CK wurden entsprechend der Empfehlung von Dill *et al.* (19) für Plasmavolumenverschiebungen korrigiert.

Statistische Verfahren

Die Präsentation der gewonnenen Ergebnisse wurde mittels Medianstatistik vorgenommen. Zur graphischen Deskription der Werte kam das Box-Plot zur Anwendung (s. Abb. 2). Statistische Verfahren und graphische Darstellung der Ergebnisse wurden mit dem Softwarepaket JMP (SAS Institute Inc., Cary NC, USA) auf MacIntosh-Computer durchgeführt.

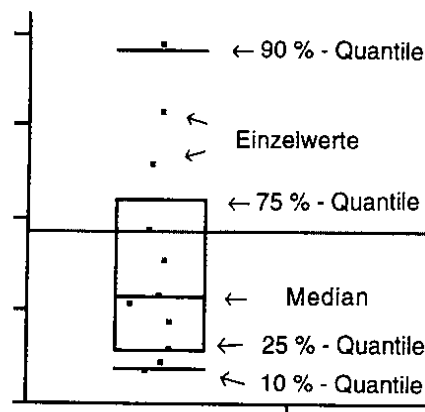


Abbildung 2: Darstellung der Mediananalyse mittels Box-Plot. Ergänzend repräsentiert die horizontale Linie den Mittelwert der Probenensemble.

Ergebnisse

Sowohl die Proben der Gesamtleukozyten als auch die daraus isolierten mononukleären Zellen zeigten einen leichten Anstieg des Anteils an Zellen mit DNA-Schäden 3 Stunden nach Belastung (s. Abb. 3). Am Folgetag nahm dieser Anteil bei den Gesamtleukozyten dann deutlich, bei den mononukleären Zellen nochmals leicht zu, um dann jeweils im 48 h-Wert wieder abzufallen.

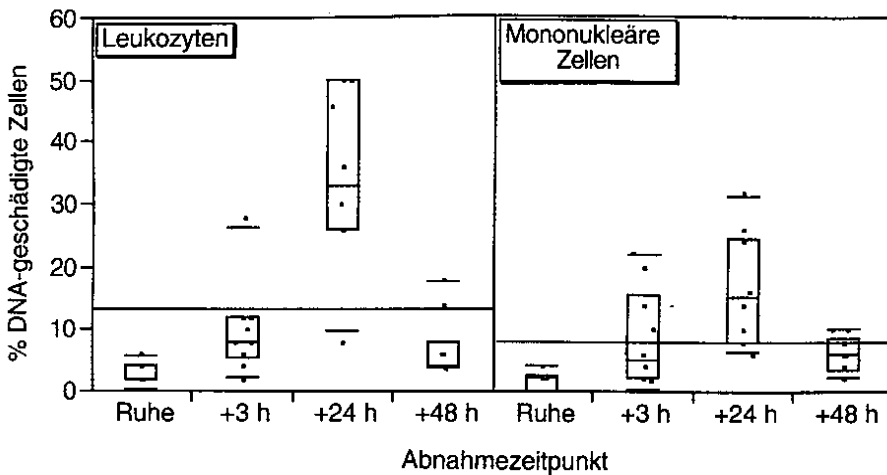


Abbildung 3: Vergleichende Darstellung für DNA-Schäden positiver Zellen (image length > 32,5 µm) in den Populationen der Gesamtleukozyten und mononukleären Zellen zu den Zeitpunkten Ruhe, 3, 24 und 48 h nach der Halbmarathonbelastung (n = 10). Die Daten des SCG-Assays sind in Prozent DNA-geschädigter Zellen (%) angegeben. Die Darstellung erfolgt als Mediananalyse mit Einzelwerten (Legende Box-Plot s. Methodikteil).

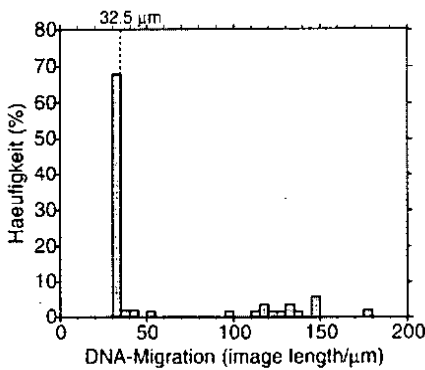


Abbildung 4: Häufigkeitshistogramm der in 50 mononukleären Zellen ermittelten Werte der DNA-Migration (image length). Die Werte über 32,5 µm liegen oberhalb des Kontrollniveaus und signalisieren eine DNA-geschädigte Zelle (Einzelbeispiel Proband D, 24 h-Probe).

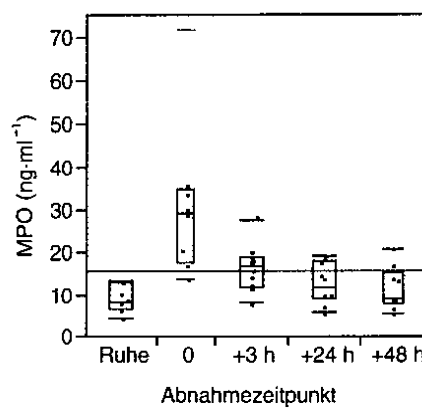


Abbildung 5: Verhalten der Myeloperoxidasekonzentration im Plasma (MPO) zu den Zeitpunkten Ruhe, 0, 3, 24 und 48 h nach Halbmarathonbelastung (n = 10). Die Darstellung der Daten des ELISA-Tests erfolgt als Mediananalyse mit Einzelwerten (Legende Box-Plot s. Methodikteil).

Tabelle 2: Absolute Zellzahlen von Leukozyten, neutrophilen Granulozyten, Lympho- und Monozyten zu den Zeitpunkten Ruhe, 0, 3, 24 und 48 h nach der Halbmarathonbelastung (n = 10). Darstellung der Daten als Medianwerte (Minima — Maxima).

	Ruhe	0	+ 3 h	+ 24 h	+ 48 h
Leukozyten (10 ⁹ · l ⁻¹)	6.9 (4.3–10.3)	12.5 (8.4–21.0)	15.4 (11.3–17.9)	8.9 (4.8–10.2)	7.5 (5.8–12.2)
Neutrophile Granulozyten (10 ⁹ · l ⁻¹)	3.6 (2.0– 5.8)	10.1 (5.0–15.6)	13.4 (8.9–15.4)	4.8 (2.3– 6.2)	3.7 (2.7– 8.9)
Lymphozyten (10 ⁹ · l ⁻¹)	2.3 (1.6– 3.4)	2.2 (1.0– 4.2)	0.9 (0.7– 1.4)	2.4 (1.4– 3.3)	2.7 (1.7– 3.1)
Monozyten (10 ⁹ · l ⁻¹)	0.8 (0.4– 0.9)	0.7 (0.4– 1.5)	1.2 (0.8– 1.3)	0.9 (0.6– 1.4)	0.4 (0.3– 0.6)

Bei 5 Probanden fanden sich 24 h nach Belastung einzelne mononukleäre Zellen, die mit Werten des image length zwischen 80 und 150 µm sehr deutliche DNA-Effekte aufwiesen (s. Einzelbeispiel Abb. 4).

Die im Plasma gemessene Myeloperoxidase (MPO) zeigte direkt nach Ende des Halbmarathonlaufes erhöhte Werte. 3 Stunden nach Belastung waren diese Werte wieder rückläufig, lagen allerdings noch oberhalb der Ausgangswerte in Ruhe. 24 und 48 Stunden nach dem Lauf war kein Einfluß des Halbmarathons auf die MPO-Konzentration mehr erkennbar (s. Abb. 5). Die CK-Werte stiegen von 51 (31-101) U·l⁻¹ in Ruhe auf ein Maximum von 235 (76 - 788) U·l⁻¹ 24 Stunden nach Belastung an.

Die neutrophilen Granulozyten (s. Tab. 2) lagen direkt und 3 Stunden nach Belastung deutlich, am Folgetag noch leicht oberhalb der Ausgangswerte. Im 3-Stundenwert fanden sich erniedrigte Lymphozytenzahlen, während zu diesem Zeitpunkt ein Anstieg der Monozyten beobachtet werden konnte.

In der bei 8 Probanden durchgeführten Durchflußzytometrie war eine cytoplasmatische Basalsekretion von HSP70 in deutlich mehr Mono- und Granulozyten als Lymphozyten nachweisbar (Abb. 6). Dabei lag der Ruhewert für HSP70 in den Lymphozyten bei nahe 0%. Nach Belastung war bei den Mono- und Granulozyten zu beiden Zeitpunkten ein deutlicher Anstieg HSP70-positiver Zellen erkennbar, wobei von den Granulozyten nach 24 Stunden nahezu 100% HSP70 exprimierten.

Die Expression der HO-1 wurde in Lympho-, Mono- sowie Granulozyten durch den Halbmarathon deutlich stimuliert (s. Abb. 7). In allen drei Zellpopulationen stiegen zu allen Zeitpunkten nach dem Halbmarathon die Zahl positiver Zellen. Mit 67% (Median) fand sich bei den Monozyten schon eine deutliche Basalsekretion der HO-1, die in geringerem Maße auch bei den Granulozyten (20%) ermittelt werden konnte. Demgegenüber exprimierte nahezu kein Lymphozyt HO-1 in Ruhe. Die Ergebnisse der Fluoreszenzintensität zeigten ein im wesentlichen ähnliches Verhalten der HSP70- und HO-1-Expression (Werte nicht gezeigt).



WISSENSCHAFT

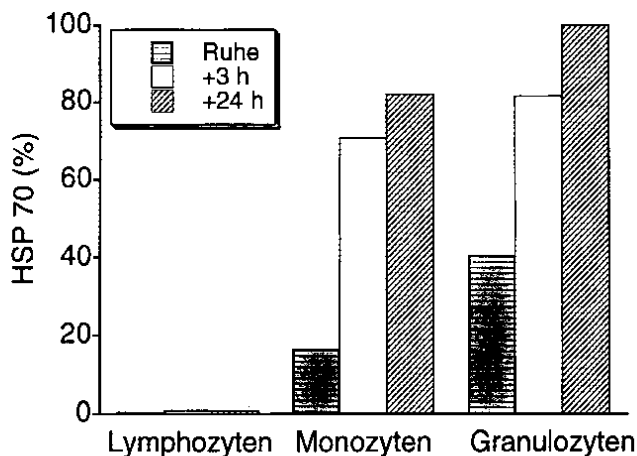


Abbildung 6: Vergleichende Darstellung des Anteils HSP70-positiver Zellen (%) in den Lympho-, Mono- und Granulozyten (Medianwerte) zu den Zeitpunkten Ruhe, 3 und 24 h nach der Halbmarathonbelastung als Säulendiagramm (n = 8).

ven Bursts interpretiert werden. Der auch von anderen Autoren (9, 13) beschriebene Anstieg der Myeloperoxidase im Plasma weist auf eine abgelaufene Aktivierung und Degranulierung dieser Zellen hin.

Wie die Häufigkeitsverteilung in Abbildung 3 zeigt, fanden sich bei einem Teil der Probanden im 24-Stundenwert in einzelnen Zellen der mononukleären Population sehr ausgeprägte DNA-Effekte. Wir vermuten, daß diese Effekte Monozyten zuzuordnen sind, was durch deren Eigenschaft, ähnlich wie die neutrophilen Granulozyten, ROS zu generieren, in kausaler Hinsicht Bestätigung finden würde. Dabei könnte der in diesen Zellen vorliegende belastungsinduzierte oxidative Stress aus einer Bildung von ·NO resultieren. ·NO ist neben seinen verschiedenen Wirkungen auch zu einer Hemmung von DNA-Reparaturenzymen (80) und direkten Schädigung der DNA in der Lage (70). In-vitro-Versuche deuten darauf hin, daß die ·NO-Synthese in stimulierten Makrophagen erst nach 12 Stunden ein Maximum erreicht, um dann im weiteren Verlauf DNA-Schäden dieser Zellen zu induzieren (18). Dies wäre eine Erklärung für das verzögerte Auftreten der belastungsinduzierten DNA-Schäden.

Welche genauen Mechanismen zu den DNA-Effekte führen, ist allerdings weiterhin unklar. Neben einer direkten Oxidation von Bestandteilen der DNA durch ROS muß auch eine Induktion von Apoptose in diesen Zellen diskutiert

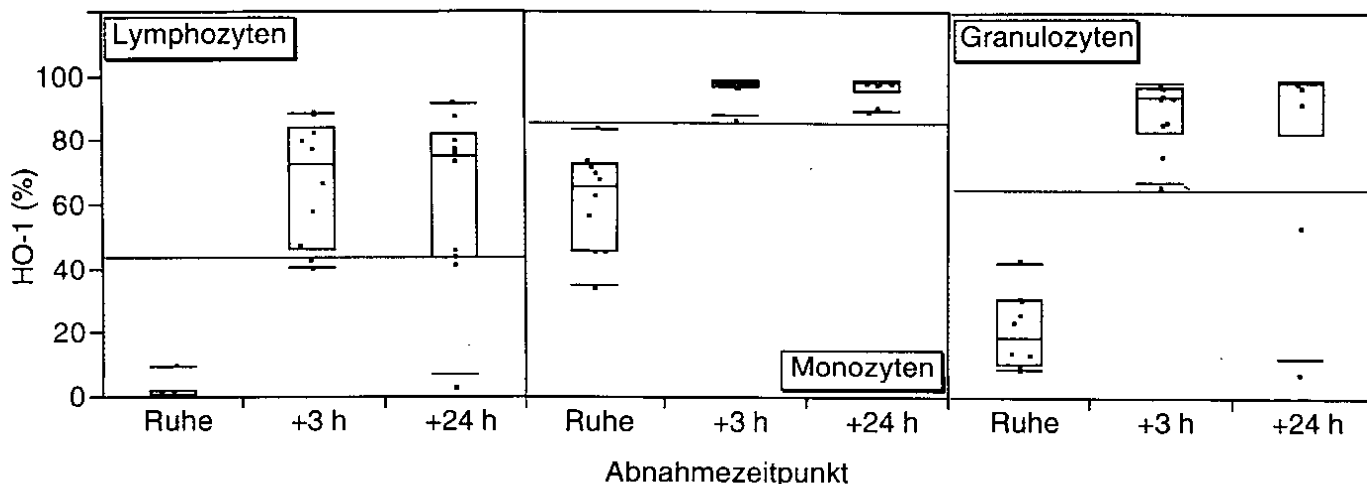
Diskussion

In dieser Studie wurde erstmalig das Verhalten mehrerer Indikatoren für oxidativen Stress in verschiedenen Leukozytenpopulationen nach einer intensiven Ausdauerbelastung gemeinsam untersucht. Dabei konnten nach einem Halbmarathonwettkampf sowohl DNA-Schäden in den Gesamtleukozyten und in davon isolierten mononukleären Zellen, als auch eine Zunahme der Expression der Stressproteine HSP70 und der Hämoxygenase-1 (HO-1) in Lympho-, Mono- und Granulozyten beobachtet werden. Diesen Veränderungen liegt nach bisherigen Erkenntnissen oxidativer Stress als mindestens ein kausaler Mechanismus zugrunde.

Die in früheren Arbeiten nachgewiesenen DNA-Schäden in Leukozyten (29,

31, 46, 60) 24 Stunden nach körperlicher Belastung ließen sich auch in der vorliegenden Studie reproduzieren. Die gleichzeitige Untersuchung von separierten mononukleären Zellen, bestehend aus Lympho- und Monozyten, fand einen deutlich geringeren Anteil DNA-geschädigter Zellen im Vergleich zu den Gesamtleukozyten. Unter Berücksichtigung der relativen Zellverteilung entspringt das höhere Ausmaß an DNA-Effekten in den Gesamtleukozyten somit in erster Linie Schäden der neutrophilen Granulozyten und würde auch Befunde von Inoue *et al.* (32) erklären, die nach intensiver Schwimmbelastung in isoliert untersuchten Lymphozyten keinen Hinweis auf oxidative DNA-Schäden beobachten konnten. In kausaler Hinsicht kann das höhere Ausmaß an DNA-Schäden der neutrophilen Granulozyten als Folge des belastungsinduzierten oxidati-

Abbildung 7: Vergleichende Darstellung des Anteils Hämoxygenase-1 (HO-1) - positiver Zellen in den Lympho-, Mono- und Granulozyten zu den Zeitpunkten Ruhe, 3 und 24 h nach der Halbmarathonbelastung (n = 8). Die Daten der Mediananalyse sind mittels Box-Plot dargestellt (Legende Box-Plot s. Methodikteil).





werden, wenngleich das von uns im SCG-Assay beobachtete Migrationsmuster der DNA ein dafür eher untypisches Bild bot (49). Als Auslöser von Apoptose, dem programmierten Zelltod, sind verschiedene Vorgänge, insbesondere auch oxidativer Stress (11), bekannt. Außerdem ist eine Induktion unter dem Einfluß von TNF α beschrieben, der bei den Probanden ebenfalls einen belastungsassoziierten Anstieg aufwies (Daten nicht gezeigt).

Die Halbmarathonbelastung führte auch zu einer Reaktion der untersuchten Stressproteine, wobei sich eine zwischen den einzelnen Zellpopulationen teilweise deutlich unterschiedliche Expression erkennen ließ. Der Anteil HSP70 positiver Lymphozyten lag sowohl in Ruhe als auch nach Belastung nahe 0%. Einen deutlichen Anstieg zeigte die Expression von HSP70 in den Mono- und Granulozyten 3 Stunden nach Belastung. Zudem war die Tendenz einer nochmaligen Zunahme am Folgetag zu beobachten. Wie in Versuchen in der Rattenmuskulatur gezeigt werden konnte, wird die Induktion von HSP70 durch alleinige Hitzeexposition, ebenso jedoch durch körperliche Belastung ausgelöst (66). Dabei kann einerseits eine aus diesen Stressoren resultierende Anhäufung denaturierter Proteine in der Zelle (35), andererseits jedoch auch oxidativer Stress einen Einfluß auf die Expression von HSP70 nehmen. Interessant erscheint, daß lediglich eine intrazelluläre ROS-Generierung, nicht jedoch die extrazelluläre Exposition der Zellen mit ROS cytoplasmatisches HSP70 erhöht (77). Dies könnte unsere Beobachtung erklären, daß gerade die Zellen, welche per se schon eine ausgeprägte Fähigkeit zur eigenen Produktion von ROS besitzen, auch eine belastungsinduzierte Expression für HSP70 aufweisen. Dies wäre eine durchaus sinnvolle physiologische Reaktion, bedürfen ja gerade Mono- und Granulozyten effektiver antioxidativer Mechanismen, um sich vor Auswirkungen von oxidativem Stress zu schützen.

Die durch den Halbmarathon induzierte starke Stimulierung der HO-1 sowohl in Monozyten, als auch Lympho- und Granulozyten spricht eindeutig für das Auftreten von oxidativem Stress im Rahmen dieser Ausdauerbelastung. Denn im Gegensatz zu den Hitzeschockproteinen wird die HO-1 im Humansystem durch

oxidativen Stress und nicht primär durch Hitzestress induziert (62). So führt beispielsweise die Einwirkung von H₂O₂ über die Induktion von Transskriptionsfaktoren zu einer verstärkten Genexpression der Hämoxxygenase in Makrophagen (38). Erstmals konnten *Essig et al.* (23) eine gesteigerte Expression der HO-1 auf RNA-Ebene in zuvor belasteter Muskulatur von Mäusen nachweisen.

Die HO-1 wird als Schutzsystem gegen oxidativen Stress beschrieben (12, 41, 68, 72, 76). Denaturiertes Myoglobin, welches nach einer Ausdauerbelastung verstärkt anfällt, wird vermutlich Hauptsubstrat der HO-1 sein. Die entscheidenden antioxidativen Effekte von HO-1 sind einerseits die Produktion von Bilirubin, welches selbst antioxidativ wirksam ist, indem es die Lipidperoxidation verhindert (12). Zum anderen verursacht HO-1 eine vermehrte Synthese von Ferritin, welches die Verringerung des intrazellulären Pools an freiem Eisen begünstigt. Freies Eisen, welches einen Anstieg im Gewebe unter körperlicher Belastung aufweist (34), induziert bereits in geringer Konzentration die Generierung von hochreagiblem \cdot OH über die Fenton-Reaktion. Die starke Ruheexpression der HO-1 in Monozyten und Granulozyten spricht für diese beiden Zelltypen als Hauptträger der oxidativen Stressabwehr. Unterstützt wird dies durch eine Rekrutierung HO-1-positiver Lymphozyten nach Belastung.

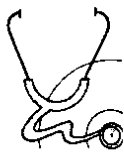
Die gesteigerte leukozytäre Expression von Stressproteinen führt zu einem geringeren Zelltod und dem Erhalt der proliferativen Kapazität von Leukozyten unter dem Einfluß verschiedener Stressoren (41). Es ist anzunehmen, daß dieser Mechanismus einen wichtigen Bestandteil beim Erhalt der Immunfunktion im Rahmen höherer körperlicher Belastung darstellt. Ob durch infiltrierende Leukozyten exprimierte Stressproteine auch in der Muskulatur protektive Aufgaben erfüllen und Reparaturprozesse beeinflussen, ist unklar. Regelmäßiges Training erhöht die Belastungstoleranz, wobei die Adaptationsvorgänge auch die antioxidativen Enzyme Catalase, Superoxiddismutase (16) und Glutathionperoxidase (37, 43) miteinschließen. Erste Studien konnten einen Einfluß von Ausdauertraining auch auf die Expression von Hitzeschockproteinen und Hämoxxygenase in Leukozyten aufzeigen (24, 50).

Die präsentierten Ergebnisse liefern einen Einblick in stressinduzierte Reaktionen in Leukozyten nach einer intensiven Ausdauerbelastung, wobei diese Veränderungen nicht als auf diese Zellen beschränkte Mechanismen gesehen werden dürfen. Aktuelle Arbeiten deuten darauf hin, daß DNA-Schäden, Apoptose und die Expression von Stressproteinen auch in Muskelzellen durch akute körperliche Belastung induziert werden können. So konnten *Podhorska-Okolow et al.* (14) Apoptoseprozesse in Skelettmuskel- und Endothelzellen von Mäusen beobachten, die zuvor einer längeren erschöpfenden Laufbelastung ausgesetzt waren. Ebenso an Mäusen beschreiben *Sandri et al.* (59) DNA-Schäden nach exzentrischer Muskelarbeit. Auf der anderen Seite konnte in Muskelzellen eine gesteigerte Expression antioxidativer Stressproteine wie HSP70 sowohl im Tierversuch (66) als auch beim Menschen (53) als Antwort auf akute körperliche Belastung gezeigt werden. Es ist anzunehmen, daß diese Vorgänge eine nicht unwesentliche Bedeutung bei Entstehung und Ablauf des belastungsinduzierten Muskelschadens haben (14).

Zusammenfassend besteht also eine enge Verbindung zwischen der Aktivität von Entzündungsmediatoren, Hitze und oxidativem Stress einerseits sowie Schutzmechanismen wie antioxidativen Enzymen, Vitaminen und Hitzeschockproteinen andererseits. Die bisher vorliegenden Erkenntnisse deuten darauf hin, daß die genannten Faktoren eine wesentliche Bedeutung für die Stresstoleranz bei körperlicher Belastung besitzen. Welche genaue Rolle sie im Bereich der Regeneration, der Entwicklung des Übertrainingsyndroms oder aber bei der Beeinflussung der Immunabwehr des Sportlers spielen, bedarf weiterer Validierung.

Literatur

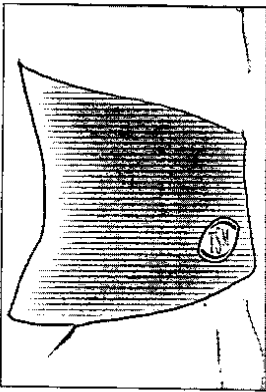
- (1) Abraham N.G., H.C. Lin, M.L. Schwartzman: The physiological significance of heme oxygenase. *Int J Biochem* 20 (1988), 543-558.
- (2) Applegate L.A., A.P. Luscher, R.M. Tyrell: Induction of heme oxygenase: A general response to oxidative stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res* 51 (1991), 974-978.
- (3) Armstrong R.B.: Initial events in exercise-induced muscular injury. *Med Sci Sports Exerc* 22 (1990), 429-435.
- (4) Aruoma O.I.: Free radicals and antioxidant strategies in sports (review). *J Nutr Biochem* 5 (1994), 370-381.



- (5) *Baehner R.L., L.A. Boxer, J.M. Allen, J. Davis*: Autooxidation as a basis for altered function by polymorphonuclear leucocytes. *Blood* 50 (1977), 327-335.
- (6) *Becker B.F., P. Massoudy, B. Permanetter, P. Raschke, S. Zahler*: Mögliche Bedeutung von Sauerstoffradikalen für den Reperfusionsschaden. *Z Kardiol* 82 (1993), 49-58.
- (7) *Benzi G.*: Aerobic performance and oxygen free radicals. *J Sports Med Phys Fitness* 33 (1993), 205-222.
- (8) *Bousquet J., P. Chanez, J. Mercier, J. Préfaut*: Monocytes, exercise and the inflammatory response. In: RJ Shephard Hrsg.: *Exercise Immunology Review* (Human Kinetics Publishers, Inc., 1996), vol. 2, pp. 35-44.
- (9) *Bury T.B., F. Pirnay*: Effect of prolonged exercise on neutrophil myeloperoxidase secretion. *Int J Sports Med* 16 (1995), 410-412.
- (10) *Bury T.B., R. Louis, M.F. Radermecker, F. Pirnay*: Blood mononuclear cells mobilization and cytokines secretion during prolonged exercises. *Int J Sports Med* 17 (1996), 156-160.
- (11) *Buttke T.M., P.A. Sandstorm*: Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 15 (1994), 7-10.
- (12) *Camhi S.L., P. Lee, A.M.K. Choi*: The oxidative stress response. *New Horizons* 3 (1995), 170-182.
- (13) *Camus G., J. Pincemail, M. Ledent, A. Juchmès-Ferir, M. Lamy, G. Deby-Dupont, C. Deby*: Plasma levels of polymorphonuclear elastase and myeloperoxidase after uphill walking and downhill running at similar energy cost. *Int J Sports Med* 13 (1992), 443-446.
- (14) *Carraro U., C. Franceschi*: Apoptosis of skeletal and cardiac muscles and physical exercise. *Aging Clin Exp Res* 9 (1997), 19-34.
- (15) *Chaudhary A.K., M. Nokubo, G.R. Reddy, S.N. Yeola, J.D. Morrow, I.A. Blair, L.J. Marnett*: Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science* 265 (1994), 1580-1581.
- (16) *Criswell D., S. Powers, S. Dodd, J. Lawler, W. Edwards, K. Renshler, S. Grinton*: High intensity training induced changes in skeletal muscle antioxidant enzyme activity. *Med Sci Exerc Sports* 25 (1993), 1135-1140.
- (17) *Daher A.H., J.D. Fortenberry, M.L. Owens, L.A. Brown*: Effects of exogenous nitric oxide on neutrophil oxidative function and viability. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16 (1997), 407-412.
- (18) *deRojas-Walker T., S. Tamir, H. Ji, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum*: Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem Res Toxicol* 8 (1995), 473-477.
- (19) *Dill D.B., D.L. Costill*: Calculation of percentage changes in volumes of blood plasma and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* 37 (1974), 247-248.
- (20) *Docke W.D., H.D. Volk, R. vonBaehr*: Relationship between the immune system and heat shock proteins. A literature review. *Allerg Immunol* 36 (1990), 209-223.
- (21) *Duarte J.A., F. Carvalho, M.L. Bastos, J.M.C. Soares, H.J. Appell*: Do invading leucocytes contribute to the decrease in glutathione concentrations indicating oxidative stress in exercised muscle, or are they important for its recovery? *Eur J Appl Physiol* 68 (1994), 48-53.
- (22) *Dufaux B., U. Order, H. Liesen*: Effect of a short maximal physical exercise on coagulation, fibrinolysis and complement system. *Int J Sports Med* 12 (1991), S38-S42.
- (23) *Essig D.A., D.R. Borger*: Induction of heme oxygenase 1 (HSP32) mRNA in skeletal muscle following contractions. *Am J Physiol* 272 (1997), C59-67.
- (24) *Fehrenbach E., F. Passek, A.M. Niess, H.H. Dickhuth, H. Northoff, H.*: Analyse der Expression von Hitzeschock/Stressproteinen nach intensiv belastendem Ausdauersport (Abstract). Abstractband Deutscher Sportärztekongreß 1997 Tübingen.
- (25) *Göllnick P.D., L.A. Bertocci, T.B. Kelso, E.H. Witt, D.R. Hodgson*: The effect of high intensity exercise on the respiratory capacity of skeletal muscle. *Pflügers Archiv (Eur J Physiol)* 415 (1990), 407-413.
- (26) *Granger D.N.*: Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia reperfusion injury. *Am J Physiol* 254 (1988), H1269-H1275.
- (27) *Gross S.S.*: Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 57 (1995), 737-769.
- (28) *Halliwell B.*: Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *Lancet* 344 (1994), 721-724.
- (29) *Hartmann A., S. Pfuhrer, C. Dennog, D. Germadnik, A. Pilger, G. Speit*: Exercise induced DNA effects in human leucocytes are not accompanied by increased formation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine or induction of micronuclei. *Free Rad Biol Med* (in press).
- (30) *Hartmann A., A.M. Niess, M. Grünert-Fuchs, B. Poch, G. Speit, G.*: Vitamin E prevents exercise induced DNA damage. *Mut Res* 346 (1995), 195-202.
- (31) *Hartmann A., U. Plappert, K. Raddatz, M. Grünert-Fuchs, G. Speit*: Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* 9 (1994), 269-272.
- (32) *Inoue T., Z. Mu, K. Sumikawa, K. Adachi, T. Okochi*: Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn J Cancer Res* 84 (1993), 720-725.
- (33) *Jaattela M.*: Overexpression of major heat shock protein hsp70 inhibits tumor necrosis factor induced activation of phospholipase A2. *J Immunol* 151 (1993), 4286-4294.
- (34) *Jenkins R.R., K. Krause, L.S. Schofield*: Influence of exercise on clearance of oxidant stress products and loosely bound iron. *Med Sci Sports Exerc* 25 (1993), 213-217.
- (35) *Kaufmann S.H.*: Heat shock proteins and immune response. *Immunol Today* 11 (1990), 129-136.
- (36) *Kotler K., H. Gabriel, L. Brechtel, W. Kindermann*: Reduced generation of intracellular superoxid anions after an intensive exhaustive endurance exercise. *Int J Sports Med* 17 (1996), S 35.
- (37) *Kretzschmar M., D. Müller, J. Hübscher, E. Marin, W. Klingler*: Influence of aging, training and acute exercise on plasma glutathione and lipid peroxides in man. *Int J Sports Med* 12 (1991), 218-222.
- (38) *Kurata S., M. Matsumoto, H. Nakajima*: Transcriptional control of the heme oxygenase gene in mouse M1 cells during their TPA-induced differentiation into macrophages. *J Cell Biochem* 62 (1996), 314-324.
- (39) *Kusher D.I., C.F. Ware, L.R. Gooding*: Induction of the heat shock response protects cells from lysis by tumor necrosis factor. *J Immunol* 145 (1990), 2925-2931.
- (40) *Locke M., E.G. Noble, B.G. Atkinson*: Exercising mammals synthesize stress proteins. *Am J Physiol* 258 (1990), C723-729.
- (41) *Marini M., F. Frabetti, D. Musiani, C. Franceschi*: Oxygen radicals induce stress proteins and tolerance to oxidative stress in human lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 70 (1996), 337-350.
- (42) *McKelvey-Martin V.J., H.M.L. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. DeMeo, A. Collins*: The single gel electrophoresis assay (comet assay): a european review. *Mutat Res* 288 (1993), 7-63.
- (43) *Mena P., M. Maynar, J.M. Gutierrez, J. Maynar, J. Timon, J.E. Campillo*: Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers, adaption to training. *Int J Sports Med* 12 (1991), 563-566.
- (44) *Minisini M.P., S. Kantengwa, B.S. Polla*: DNA damage and stress protein synthesis induced by oxidative stress proceed independently in the human premonocytic line U937. *Mutat Res* 315 (1994), 169-179.
- (45) *Mohr S., J.S. Stamler, B. Brune*: Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxy nitrite and related nitrosylating agents. *FEBS Lett* 348 (1994), 2, 23-27.
- (46) *Niess A.M., A. Hartmann, M. Grünert-Fuchs, B. Poch, G. Speit*: DNA damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med* 17 (1996), 397-403.
- (47) *Niess A.M., A. Hartmann, M. Baumann, K. Roecker, F. Mayer, H.H. Dickhuth*: DNA damage in leucocytes after half marathon and exhaustive treadmill running-Influence of training status. *Med Sci Sports Exerc* 29 (5) Suppl (1997), S297.
- (48) *Northoff H., S. Enkel, C. Weinstock*: Exercise, injury, and immune function. In: RJ Shephard Hrsg.: *Exercise Immunology Review*, Human Kinetics Publishers, Inc., vol. 1 (1995) pp. 1-25.
- (49) *Olive P.L., G. Frazer, J.P. Banath*: Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res* 136 (1993), 130-136.
- (50) *Passek F., A.M. Niess, S. Veihelmann, H.H. Dickhuth, H. Northoff, E. Fehrenbach*: Einfluß von Ausdauersport auf die Hämoxigenase-Expression in peripheren Leukozyten (Abstract). Abstractband Deutscher Sportärztekongreß 1997 Tübingen.
- (51) *Pincemail J., G. Camus, E. Roesgen, Y. Bertrand, M. Lisonde, G. Deby-Dupont, C. Deby*: Exercise induces pentane production and



Bei Rücken-, Gelenk- und Muskelschmerzen



Rückenbandage Nr. 3113

TSM-Bandagen *die blauen mit dem*

Die neuartigen Bandagen zur Behandlung chronischer, sport- und altersbedingter Verletzungen speziell des Rücken- u. Kniebereiches (allgem. Rückenschmerzen, Hexenschuß, Arthrosen, instabile Bänder u. ä.) beschleunigen den Heilungsprozeß, ermöglichen eine fühlbare Schmerzlinderung und vermeiden lokale Unterkühlungen.

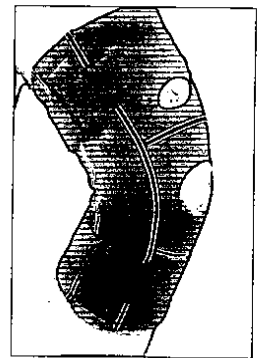
Kostenlose Information über das Gesamtprogramm

AET - GmbH Postfach 133, 84070 Au

Tel.: 0 87 52/8 61 40 Fax: 0 87 52/14 24



Die atmungsaktiven, schweißabführenden, hautfreundlichen Bandagen bewirken verbesserte Durchblutung und intensivere Stoffwechselfvorgänge. Optimale Formgebung und ausgezeichnete Trageigenschaften ermöglichen die z. T. notwendige Langzeit-Anwendung.



Kniebandage mit Stahlschiene, Best.-Nr. 3171, verordnungsf., Pos.-Nr. 05.04.02.0050

neutrophil activation in humans. Effects of propranolol. *Eur J Appl Physiol* 61 (1990), 319-322.

(52) Polla B.S., S. Kantengwa, G.J. Gleich, M. Kondo, C.M. Reimert, A.F. Junod: Spontaneous heat shock protein synthesis by alveolar macrophages in intestinal lung disease associated with phagocytosis of eosinophils. *Eur Respir J* 6 (1993), 483-488.

(53) Puntschart A., M. Vogt, H.R. Widmer, H. Hoppeler, R. Billeter: Hsp70 expression in human skeletal muscle after exercise. *Acta Physiol Scand* 157 (1996), 411-417.

(54) Pyne D.B.: Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med* 17(1994), 245-258.

(55) Robertson J.D., R.J. Maughan, G.G. Dutchie, P.C. Morrice: Increased blood antioxidant systems of runners in response to training load. *Clin Sci* 80 (1991), 611-618.

(56) Ryan A.J., C.V. Gisolfi, P.L. Moseley: Synthesis of 70K stress protein by human leukocytes: effects of exercise in the heat. *J Appl Physiol* 70 (1991), 466-471.

(57) Salo D.C., C.M. Donovan, K.J. Davies: HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radic Biol Med* 11 (1991), 239-246.

(58) Samelman T.R., S.E. Alway: Heat shock protein expression after training in the plantaris muscle of Fischer 344 rats. *Med Sci Sports Exerc* 28 (Suppl), (1996).

(59) Sandri M., U. Carraro, M. Podhorska-Okolov, C. Rizzi, P. Arslan, D. Monti, C. Franceschi: Apoptosis, DNA damage and ubiquitin expression in normal and mdx muscle fibers after exercise. *FEBS Letters* 373 (1995), 291-295.

(60) Sen C.K., T. Rankinen, S. Väisänen, R. Raumamaa: Oxidative stress after human exercise: effect of N-acetylcysteine supplementation. *J Appl Physiol* 76 (1994), 2570-2577.

(61) Shephard R.J., S. Rhind, P.N. Shek: Exercise and the Immune System (Review). *Sports Med* 18 (1994), 340-369.

(62) Shibahara S., M. Sato, R.M. Muller, T. Yoshida: Structural organisation of the human

heme oxygenase gene and the function of its promoter. *Eur J Biochem* 179 (1989), 557-563.

(63) Shinkai S., S. Shore, P.N. Shek, R.J. Shephard: Acute exercise and immune function. *Int J Sports Med* 13 (1992), 452-461.

(64) Sies H.: Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 69 (1991), 965-968.

(65) Sjödin B., Y. Hellsten-Westing, F.S. Apple: Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Medicine* 10 (1990), 236-254.

(66) Skidmore R., J.A. Gutierrez, V. Guerriero, Jr, K.C. Kregel: HSP70 induction during exercise and heat stress in rats: role of internal temperature. *Am J Physiol* 268 (1995), R 92-97.

(67) Smith L.L.: Acute inflammation: the underlying mechanism in delayed onset muscle soreness? *Med Sci Sports Exerc* 23(1991), 542-551.

(68) Stocker R.: Induction of hem oxygenase as a defense against oxidative stress. *Free Radic Res Commun* 9 (1990), 101-112.

(69) Stuehr D.J., C.F. Nathan: Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor cells. *J Exp Med* 169 (1989), 1543-1555.

(70) Surez-Pinzon W.L., K. Strynadka, R. Schultz, A. Rabinovitch: Mechanism of cytokine-induced destruction of rat insulinomacells: the role of nitric oxide. *Endocrinology* 134 (1994), 1006-1010.

(71) Suzuki Y.J., H.J. Forman, A. Sevanian: Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Rad Biol Med* 22 (1997), 269-285.

(72) Tacchini L., G. Pogliaghi, L. Radice, E. Anzoni, A. Bernelli-Zazzera: Differential activation of heatshock and oxidation-specific stress genes in chemically induced oxidative stress. *Biochem J* 309 (1995), 453-459.

(73) Thiebault C.M., R. Mannes: Free radicals and inflammatory reaction. *Int J Sports Med* 18 (1997), S115.

(74) Turman M.A., D.A. Kahn, S.L. Rosenfeld, C.A. Apple, C.M. Bates: Characterization of human proximal tubular cells after hypoxic preconditioning: Constitutive and hypoxia-induced expression of heat shock proteins HSP70

(A,B, and C), HSC70, and HSP90. *Biochem Mol Med* 60 (1997), 49-58.

(75) Vile G.F., S. Basu-Modak, K.C. Waltner et al.: Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1994), 2607-2610.

(76) Vogt B.A., J. Alam, A.J. Croatt, G.M. Vercellotti, K.A. Nath: Acquired resistance to acute oxidative stress. Possible role of heme oxygenase and ferritin. *Lab Invest* 72 (1995), 474-483.

(77) Wallen E.S., P.L. Moseley: Increases in heat shock protein 70 are associated with intracellular but not extracellular superoxide generation. *Med Sci Sports Exerc* 26 Suppl (1994), S133.

(78) Wallerath T., I. Gath, W.E. Aulitzky, J.S. Pollock, H. Kleinert, U. Forstermann: Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets. *Thromb Haemost* 77 (1997), 163-167.

(79) Weiss S.J.: Tissue destruction by neutrophil. *N Engl Med* 320 (1989), 365-376.

(80) Wink D. A., J. Laval: The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and vivo. *Carcinogenesis* 15 (1994), 2125-2129.

Anschrift für die Autoren

Dr. rer. nat. Elvira Fehrenbach
Abteilung Transfusionsmedizin mit
Blutbank, Universität Tübingen
Waldhörnlestr. 22
D-72072 Tübingen
Fax.-Nr.: 07071-296593

Dr. med. Andreas M. Niess
Medizinische Klinik und Poliklinik
Abteilung Sportmedizin Universität
Hölderlinstr. 11
D-72074 Tübingen
Fax.-Nr.: 07071-295162