

I. EINLEITUNG

Körperliche Leistungen können die Struktur und Funktion von Zellen bis hin zum Zelluntergang belasten. Beim Ausdauersport verkürzt sich beispielsweise die Lebensdauer der Erythrozyten (Ernst et al. 1988, Schmidt et al. 1988). Geschädigte Erythrozyten werden vorzeitig von Zellen des retikuloendothelialen Systems in Leber, Milz und Knochenmark phagozytiert (Weiss 1985). Besonders stark geschädigte Erythrozyten hämolysieren intravasal (Ernst et al. 1988, Carlson und Mawdsley 1986). Erstmals beschrieben wurde diese Hämolyse von R. Fleischer, der bereits 1881 bei Soldaten nach anstrengendem Marsch blutig gefärbten Urin, bedingt durch das Hämoglobin zerstörter Erythrozyten, beobachtete (Fleischer 1881).

In der Folgezeit wurde diese Hämoglobinurie nach körperlicher Belastung durch zahlreiche Autoren bestätigt (Gilligan et al. 1943, Gehrman 1966, Hornbostel et al. 1975, Scheid 1977, Siegel et al. 1979, Yosimura et al. 1980, Ernst et al. 1988, Ubels et al. 1999).

Von besonderer Bedeutung für die Alterung und Hämolyse von Erythrozyten sind Schäden in der Plasmamembran, die zur Veränderung von Membranfluidität und -permeabilität führen. Bei Maximalbelastung auf Fahrradergometern und nach Ausdauerbelastungen wie z.B. Marathonlauf wurde eine Reduktion ungesättigter Fettsäuren in der Erythrozytenmembran (Sumikawa et al. 1993), eine Reduktion der Erythrozytenverformbarkeit (Ernst et al. 1988, Galea und Davidson 1983) und erhöhte Membranfragilität (Yosimura 1985, Röcker 1983, Smith et al. 1995) beschrieben. Nach einem Marathonlauf waren elektronenmikroskopische Veränderungen des Erythrozytenmembranskelettes nachweisbar. Das Membranskelettmaterial war reduziert und grobschollig verändert, die Erythrozyten vergrößert (Jordan et al. 1998). Die in ihrer Membran geschädigten Erythrozyten werden durch mechanische Belastung in den Fußsohlenkapillaren und in der Endstrombahn der sich kontrahierenden Muskulatur zerstört (Ernst et al. 1988, Miller 1990).

Membranlipide und der Membranskelettproteine durch aktive Sauerstoffformen dar (Davies et al. 1982, Jenkins 1988, Behn 1991, Sumikawa et al. 1993, Jones und Newhouse 1997, Powers et al. 1999). Diese aktiven Sauerstoffformen (reaktive oxygen species, ROS) entstehen unter pathologischen Bedingungen, die auf die räumliche bzw. funktionelle Koordinierung der einzelnen Enzyme der Atmungskette Einfluß haben. Es kommt zu einer Ablenkung von Elektronen und zur Entstehung von hochreaktiven Produkten der unvollendeten Sauerstoffreduktion (Lewin und Popov 1988). Der Sauerstoffmetabolismus ist unter physischer Belastung deutlich gesteigert und kann einen zunehmenden Austritt von ROS aus den Mitochondrien in das Cytosol verursachen (Jenkins 1988, Alessio 1992). Unter Belastung werden 3-10% des utilisierten Sauerstoffs in Radikale umgewandelt (Berg et al. 1987, Rokitzki 1989, Sjödin et al. 1990).

Zwei Faktoren beeinflussen das Ausmaß der Oxidation von Membranlipiden und Proteinen: 1. ein Anstieg von ROS und 2. die Kapazität des antioxidativen Potentials (Nohl 1982, Gutteridge und Halliwell 2000). Das antioxidative Potential besteht aus einem enzymatischen und einem nichtenzymatischen Teil. Der enzymatische Teil, bestehend aus den antioxidativen Enzymen Superoxiddismutase (Fridovich 1974), Katalase (Kappus und Sies 1981) und Glutathionperoxidase, (Kappus und Sies 1981, Deneke et al. 1985, Michiels und Remacle 1988) wird im Organismus synthetisiert und ist überwiegend intrazellulär lokalisiert. Der nichtenzymatische Teil wird von den Vitaminen A, C, E (Burton und Ingold 1983, Fukuzawa et al. 1981, Hornsby und Crivello 1983, Wispé et al. 1986, Goldfarb 1992) und Plasmabestandteilen wie Harnsäure (Burton und Ingold 1983), Transferrin, Ferritin, Lactoferrin, Coeruloplasmin, Steroiden, Katecholaminen (Lewin und Popov 1988) u.a. gebildet.

Unter körperlicher Belastung steigt die ROS Konzentration (Alessio 1992, Davies et al. 1982, Jenkins 1988, Jenkins und Goldfarb 1992, Jenkins et al. 1992). Infolgedessen wird das antioxidative System vermehrt belastet. Reduktionsmittel werden verbraucht und das antioxidative System kann überlastet werden. Bei Dekompensation des Systems entwickelt sich ein oxidativer Prozeß, der zur Zellzerstörung führen kann (Lewin und Popov 1988).

Nach Ausdauerbelastung wurden im Plasma erhöhte Konzentrationen von dem Lipidperoxidationsprodukt Malondialdehyd (MDA) gefunden (Kanter et al. 1988, Lochner 1994, Leaf et al. 1997), allerdings gibt es auch Berichte, wie z.B. den über

einen 21,1 km Halbmarathon (Duthie et al. 1990), bei dem diese Beobachtungen nicht bestätigt werden konnte. Auch wurden nach körperlicher Belastung erhöhte Konzentrationen von Pentan und Ethan, weiterer Lipidperoxidationsprodukte, in der Ausatemluft gemessen (Dillard et al. 1978, Leaf et al. 1999). Diese Beobachtungen weisen auf einen Zusammenhang zwischen körperlicher Belastung, Lipid - und Proteinoxidation und Zellmembranschädigung hin.

Spitzenbelastungen führen zu Gewebsschädigung und Zelluntergang und können Ursache für den Anstieg von intrazellulär lokalisierten Enzymen wie Kreatinkinase (CK) und Laktatdehydrogenase (LDH) im Plasma sein (Diamond et al. 1983, Hagerman et al. 1984, Jaffe et al. 1984, Apple et al. 1985). Körperliche Aktivitäten ohne Spitzenbelastung und Zelluntergänge können allerdings ebenfalls zum Anstieg intrazellulärer Enzyme führen (Janssen et al. 1986). Dieser Anstieg wird mit Schäden in der Plasmamembran und einer hieraus resultierenden Permeabilitätsänderung für intrazelluläre Proteine erklärt (Kanter et al. 1988). Der Enzymkonzentrationsanstieg nach Belastung wurde als Indikator für Permeabilitätserhöhung der geschädigten Membran benutzt (Armstrong 1984). Nach Marathonläufen wurde eine Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationsanstiegen von MDA, CK und Laktatdehydrogenase beschrieben (Kanter et al. 1988). Diese Beobachtungen weisen ebenfalls auf einen Zusammenhang zwischen Belastung, Lipid - und Proteinoxidation und Zellmembranschädigung hin (Davies et al. 1982, Kanter et al. 1988).

Haptoglobin als Transportprotein für Hämoglobin und Bilirubin als Abbauprodukt des Hämoglobins sind gute Indikatoren für intravasale Hämolyse. Studien mit kanadischen Ausdauerläufern (Clement und Asmundson 1982) und Rekruten in der Grundausbildung (Lindeman et al. 1978) zeigten eine Abnahme der Plasmahaptoglobinkonzentration und eine Zunahme der Bilirubinkonzentration. Beide Studien ergeben ebenfalls einen Hinweis auf Schäden an der Erythrozytenmembran unter körperlicher Belastung.

Die Schädigungen des Erythrozytenmembranskelettes nach Ausdauerbelastung, die sich elektronenmikroskopisch durch Zellvergrößerung, Schwellung und Verformung mit Reduzierung und grobscholliger Veränderung des Membranskelettmaterials darstellen (Jordan et al. 1998), ähneln den Veränderungen bei bestimmten hereditären hämolytischen Anämien (hereditäre Sphärocytose und hereditäre Elliptocytose) und hereditären aplastischen Anämien (Fanconi Anämie) (Agre et al. 1982). Hereditäre Spherocytose und hereditäre Elliptocytose sind durch spezifische

Defekte oder Konzentrationsreduktion einzelner Skelettproteine der Erythrozytenmembran (α -Spectrin, β -Spectrin, Ankyrin, band 3 und Protein 4.2) charakterisiert (Kanzaki et al. 1991, Eber 1991, Tse und Lux 1999, Giuliani et al. 1999, Straface et al. 2000, Bichis und Huber 2000). Fanconis Anämie ist gekennzeichnet durch eine aplastische Anämie mit Spectrinveränderungen (Straface et al. 2000) und genetischer Defekte, die das enzymatische antioxidative Potential reduzieren (Besso 2000), hiermit verbundener Hypersensitivität der DNS gegenüber cross-linking Reagenzien und defekten DNS Reparatur Mechanismen (Mathur et al. 2000). In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob der reduzierten mechanischen Belastbarkeit und der ähnlichen morphologischen Veränderungen der Erythrozyten unter körperlicher Belastung bzw. als Kennzeichen der oben beschriebenen Anämien möglicherweise vergleichbare pathobiochemische Veränderungen des Erythrozytenmembranskelettes zu Grunde liegen.

Von besonderem Interesse bei der Erforschung der Membranschäden ist daher die Klärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Oxidationsprozessen und körperlicher Belastung. Sollte eine Beziehung zwischen beiden Mechanismen bestehen, wäre eine Belastungsabhängigkeit mit einem Anstieg von Peroxidationsprodukten bei steigender Leistung zu erwarten.

Im Rahmen dieser Arbeit soll daher untersucht werden, in welchem Ausmaß körperliche Belastung das Gleichgewicht zwischen Lipid - und Proteinoxidation und antioxidativem Potential beeinflusst und ob tatsächlich eine Belastungsabhängigkeit zu beobachten ist. Die in der Literatur vorliegenden Daten über Membranschäden durch Lipidperoxidation entstammen Versuchen mit Ausdauerbelastung mit moderater Leistung und langer Versuchsdauer. Im Rahmen dieser Arbeit soll untersucht werden, ob auch bei kürzerer, aber intensiver Belastung Schäden auftreten.

Es wird die Überprüfung der folgenden Arbeitshypothesen angestrebt:

1. Oxidative Schäden an Membranlipiden und – proteinen treten auch bei kürzerer, aber intensiver Belastung auf.
2. Unter Dauerleistung besteht eine Abhängigkeit des Ausmaßes der Schädigung an Membranlipiden und – proteinen von der Belastungsintensität.

An ausdauertrainierten Sportlern soll mit Ergometrierversuchen bei verschiedenen Leistungen ermittelt werden, ob und bei welchen Belastungen oxidative Schäden auftreten. Hierzu wurde ein Modellversuch entwickelt, bei dem unter definierter körperlicher Leistung Parameter der Lipidperoxidation, Spectrinoxidation und des antioxidativen Potentials bestimmt werden. Die körperliche Belastung wurde anhand der Laktatkinetik, der Herzfrequenz und der subjektiv empfundenen Belastung eingeschätzt. Die niedrige Belastung sollte ca. 50-60 % (steady state, aerober Stoffwechsel), die hohe Belastung ca. 70 - 80 % (deutlich über dem maximalen Laktat steady state, teilweiser anaerober Stoffwechsel) der maximalen Sauerstoffaufnahme entsprechen.

Gemessen wurde Malondialdehyd als Indikator der Lipidperoxidation von Membranlipiden, H_2O_2 - induzierte Chemolumineszenz als Indikator der Proteindenaturation durch freie Radikale (Abakumov et al. 1988, Rommain et al. 1989, Roldan et al. 1989, Popov et al. 1989, Sheu et al. 1997) und Spectrinveränderungen mittels Gelelektrophorese als Indikator von oxidativen Schäden an Zellgerüstproteinen. Als Parameter der protektiven Mechanismen wurden antioxidative Kapazität, harnsäureunabhängige antioxidative Kapazität und Ascorbinsäure bestimmt. Als Hämolyseparameter wurden Haptoglobin und Bilirubin bestimmt.