
Oxidativer Stress, Cytokin- und Hitzeschockproteinexpression im Ausdauersport – Bedeutung für Regeneration, Belastungstoleranz und Immunkompetenz von Leistungssportlern

A. M. Nieß (Projektleiter)¹, E. Fehrenbach², H. Northoff², H.-H. Dickhuth¹
Universität Tübingen

¹ Medizinische Klinik und Poliklinik, Abt. Sportmedizin

² Abt. Transfusionsmedizin

VF 0407/01/25/98

1 Problem

Körperliche Belastung induziert eine Akutantwort des Immunsystems, welche eine gesteigerte Generierung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) miteinschließt (THIEBAULD/MANNES, 1997; NIESS et al., 1999). ROS und daraus resultierendem oxidativem Stress wird neben der Bedeutung bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen und dem Alterungsprozess auch eine wichtige Rolle bei der Belastungstoleranz und Regeneration im Rahmen sportlicher Belastung zugerechnet. Oxidativer Stress kann ebenso wie Hitzestress zelleigene Funktionen beeinträchtigen, so z.B. auch Migrations-, Phagozytose- oder Proliferationsfähigkeit immunkompetenter Zellen (MARINI et al., 1996). Auch DNA-Strangbrüche werden durch ROS verursacht und lassen sich wie ein Teil der funktionellen Veränderungen auch nach höheren körperlichen Belastungen in Leukozyten nachweisen. Unter verschiedenen Stresseinflüssen lässt sich eine Induktion von Stressproteinen beobachten (LOCKE, 1997; FEHRENBACH/NIESS; 1999), zu denen im engeren Sinne Hitzeschockproteine wie HSP27 und HSP70 und das spezifisch antioxidative Stressprotein Hämoxxygenase-1 (HO-1) zählen. Eine Hochregulation dieser Proteine übt positive Effekte auf den Erhalt der proliferativen Kapazität von Lymphozyten unter Einfluss von oxidativem Stress aus (MARINI et al., 1996). Neben ROS sind auch reaktive Stickstoffverbindungen (RNS) in die Induktion von oxidativem Stress involviert. Klassischer Vertreter der RNS ist Stickoxid (NO), welches in immunkompetenten Zellen durch das Enzym induzierbare NO-Synthase (iNOS) generiert werden kann. NO besitzt vielfältige Signalfunktionen, übt aber auch hemmende Wirkung auf die Zellproliferation und den oxidativen Burst der neutrophilen Granulozyten aus (GROSS, 1995). Beides ist auch nach hoher körperlicher Belastung beschrieben. NO hat weiterhin einen Einfluss auf das Auftreten von DNA-Schäden, wobei bereits physiologische Mengen entsprechende Effekte hervorrufen. Im Energiestoffwechsel umfassen die komplexen Wirkungen von NO eine Inhibierung verschiedener Schlüsselenzyme sowohl in der Atmungskette als auch Glykolyse.

Inwieweit dies bei sportlicher Belastung eine möglicherweise leistungsbeeinflussende Rolle spielt, lässt sich derzeit noch nicht beantworten.

Unklar ist, ob und bei welchen Belastungen eine Induktion von Stressproteinen und der iNOS in Leukozyten zu erwarten ist. Offene Fragen bestehen auch in Hinblick auf die möglichen Mechanismen, die einer belastungsassoziierten Expression dieser Proteine zugrunde liegen könnten. Da hier sowohl redoxsensitive Transkriptionskatoren wie NF- κ B als auch Hitzestress eine nicht unwesentliche Bedeutung besitzen, soll sowohl der Einfluss des Antioxidans α -tocopherol als auch der von erhöhten Umgebungstemperaturen mit im Gesamtprojekt untersucht werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt soll durch Untersuchung des Einflusses regelmäßiger Trainingsbelastungen auf die Expression von Stressproteinen bearbeitet werden.

2 Methode

Probanden: Männliche Ausdauerathleten und untrainierte männliche Kontrollpersonen.

Analytik: Die Ermittlung der leukozytären Expression von HSP27, HSP70, HO-1 und iNOS wurde auf Transkriptionsebene mit Hilfe einer semiquantitativen *RT-PCR* und auf Proteinebene mittels *Durchflusszytometrie* vorgenommen. Das durchflusszytometrische Verfahren erlaubte eine zwischen den Zellpopulationen (Granulo-, Mono- und Lymphozyten) differenzierende Expressionanalyse. Mittels ELISA wurden zudem begleitende Messungen der Cytokinkonzentrationen (IL-6, IL-8, TNF- α) im Plasma vorgenommen.

Belastungsbedingungen:

- Offizieller Halbmarathonwettkampf (21.1 km, Intensität ca. 105% der individuellen anaeroben Schwelle, IAS).
- Erschöpfende Laufbandbelastung bei 110% der IAS mit und ohne vorangehender achttägiger Supplementierung mit 500 I.E. α -tocopherol (placebokontrolliert, doppelblind, cross-over mit 28 Tagen wash-out-Phase).
- 60-minütige Dauerbelastung bei 90% der IAS bei 18°C (Gruppe A) und 28°C Raumtemperatur (B); nach einer Woche Wiederholung der identischen Belastung bei 28°C (Gruppe A + B). Durchführung an trainierten nicht hitzeakklimatisierten Probanden.

3 Ergebnisse

- ◆ HSP27, HSP70 und HO-1: Deutliche Zunahme der HSP27, HSP70 und HO-1 Expression auf Proteinebene nach dem Halbmarathonwettkampf. Die höchsten Werte werden in Mono- und Granulozyten ermittelt, wobei in diesen Zellpopulationen auch 24 Stunden nach Belastung die Hochregulation auf Proteinebene anhielt. Die Dauerbelastung (60 min, 90% IAS) induzierte unter Normaltemperatur eine Hochregulation von HSP70 und HSP27, nicht jedoch der HO-1. Nach erschöpfender Laufbandbelastung (110% IAS) ließ sich keine einheitliche Expressionszunahme von HSP27, HSP70 oder HO-1 ermitteln.
- ◆ iNOS: Nach dem Halbmarathon fand sich bei acht von zehn Probanden eine Zunahme der iNOS-RNA. Drei Stunden nach erschöpfender Laufbandbelastung (110% IAS) konnten wir einen Anstieg des iNOS Proteins beobachten, der auch nach 48 Stunden noch nachweisbar war. Eine parallele Zunahme der iNOS-RNA konnte hier nicht ermittelt werden.
- ◆ Einfluss von α -tocopherol: Die nach der erschöpfenden Laufbandbelastung (110% IAS) ermittelte Zunahme des iNOS-Proteins zeigte keine eindeutige Beeinflussung durch α -tocopherol. Lediglich die nur gering induzierte Expression der granulozytären HO-1 wurde bei 50% der Probanden unter α -tocopherol gering attenuiert.
- ◆ Einfluss von zusätzlichem Hitzestress: Eine Raumtemperatur von 28°C übte im Vergleich zu 18° sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene einen additiven Effekt auf die Expression von HSP27 und HSP70 nach der Dauerbelastung (60 min, 90% IAS) aus. Dieser zusätzliche Effekt von Hitze war bei HSP27 deutlicher als bei HSP70. Die bei normothermen Bedingungen durch nur unwesentlich beeinflusste Expression des HO-1 Proteins zeigte unter 28°C eine Zunahme. Bei der Wiederholung des identischen Belastungsprocedures nach einer Woche zeigte sich in Ruhe ein erhöhter Ausgangslevel an HSP70-Expression als möglicher Hinweis auf Hitzeadaptation.
- ◆ Trainingseinfluss: Beim Vergleich zwischen Ausdauertrainierten und Untrainierten fanden wir eine niedrigere Ruhe-Expression von HSP27, HSP70 und HO-1 auf Proteinebene.

4 Diskussion

Im Projekt konnte gezeigt werden, dass intensive Ausdauerbelastungen zu einer Induktion der leukozytären Expression von HSP27, HSP70 und HO-1 führen. Scheint dies für die HSP bereits bei moderateren Belastungen der Fall zu sein, so reagiert das spezifisch antioxidative Schutzprotein HO-1 erst bei extremerem Stress, wie er in der Studie durch einen Halbmarathonwettkampf induziert wurde. Möglicherweise wird die HO-1 erst bei einem relevanten Ausmaß an belastungsinduziertem oxidativem Stress exprimiert, was

dieses Stressprotein als spezifischen Indikator für zellulären oxidativen Stress interessant macht. Die Bedeutung der Stressproteine zum zellulären Struktur- und Funktionserhalt konnte unter verschiedenen Stresseinflüssen aufgezeigt werden. Eine gesteigerte Expression von HSP27, HSP70 und HO-1 könnte somit durchaus eine wichtige Rolle beim Erhalt der Immunfunktion unter höherer körperlicher Belastung spielen. Dem gegenüber reflektiert die bei Trainerten geringere Ruheexpression von HSP und HO-1 eine geringere Beanspruchung dieser Schutzsysteme im Ruhezustand. Die ermittelten Hinweise auf eine belastungsinduziert gesteigerte Expression der leukozytären iNOS war ein weiteres wichtiges Ergebnis unseres Projektes. In Hinblick auf die suppressive Wirkung von NO auf die Lymphozytenproliferation und die NADPH-Oxidase in Neutrophilen könnte eine gesteigerte Expression der iNOS als immunmodulierender Mechanismus im Rahmen höherer körperlicher Belastung diskutiert werden. Offen bleiben die Mechanismen, die die belastungsinduzierte Expression der Stressproteine und iNOS regulieren. Zusätzlicher Hitzestress erwies sich in unserer Studie als klarer Co-Induktor der HSP-Expression bei Ausdauerbelastung, wobei sich HSP27 als hitzesensibleres Stressprotein offenbarte. Die Hochregulation von HSP70 auch noch eine Woche nach erstmaliger Hitzebelastung reflektiert möglicherweise einen Mechanismus der Hitzeadaptation. Im Mittelpunkt weiterer Untersuchungen müsste die Beantwortung der Frage stehen, ob sich zwischen einem individuell unterschiedlichen Verhalten von Stressproteinen oder iNOS und klinischen Beobachtungen wie Neigung zu Übertrainingszuständen oder zu Infekten unter höheren Belastungen ein Zusammenhang herstellen lässt. Von Interesse ist auch, ob individuelle Unterschiede der HSP-Expression die bekannte teils deutlich ausgeprägte interindividuelle Verträglichkeit von Belastungen unter Hitzebedingungen erklären könnte.

5 Literatur

- FEHRENBACH, E.; NIESS, A.M.: The role of heat shock proteins in the exercise response. *Exerc. Immunol. Rev.* 5 (1999), 57-77
- GROSS, S.S.: Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Ann. Rev. Physiol.* 57 (1995), 737-769
- LOCKE, M.: The cellular stress responses to exercise – Role of stress proteins. *Exerc. Sports Sci. Rev.* 25 (1997), 105–136
- MARINI, M.; FRABETTI, F.; MUSIANI, D.; FRANCESCHI, C.: Oxygen radicals induce stress proteins and tolerance to oxidative stress in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 70 (1996), 337-350
- NIESS, A.M.; DICKHUTH, H.-H.; NORTHOFF, H.; FEHRENBACH, E.: Free radicals and oxidative stress in exercise – immunological aspects. *Exerc. Immunol. Rev.* 5 (1999), 22-56
- THIEBAULD, C.M.; MANNES, R.: Free radicals and inflammatory reaction. *Int. J. Sports Med.* 18 (1997), 115