Medycyna Sportowa
© MEDSPORTPRESS, 2007; 4(6); Vol. 23, 207-214

Zaangażowanie Autorów
A – Przygotowanie projektu badawczego
B – Zbieranie danych
C – Analiza statystyczna
D – Interpretacja danych
E – Przygotowanie manuskryptu
F – Opracowanie piśmiennictwa
G – Pozyskanie funduszy

Author's Contribution
A – Study Design
B – Data Collection
C – Statistical Analysis
D – Data Interpretation
E – Manuscript Preparation
F – Literature Search
G – Funds Collection

Alina Woźniak[1(A,B,D,E)], Bartosz Woźniak[2(B,C,D)], Gerard Drewa[1(D,E)], Celestyna Mila-Kierzenkowska[1(B,F)], Andrzej Rakowski[3(A,B)], Marcin Porzych[4(E)], Krystyna Szmytkowska[5(E)]

[1] Katedra Biologii Medycznej, Collegium Medicum UMK, Bydgoszcz
[2] Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii, Collegium Medicum UMK, Bydgoszcz
[3] Cywilno-Wojskowy Związek Sportowy „Zawisza", Bydgoszcz
[4] Katedra i Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii, Collegium Medicum UMK, Bydgoszcz
[5] Oddział Chirurgii Dziecięcej z Pododdziałem Urologii i Leczenia Oparzeń, Wojewódzki Szpital im. dr J. Biziela, Bydgoszcz

WPŁYW KRIOSTYMULACJI OGÓLNOUSTROJOWEJ NA ENZYMATYCZNĄ BARIERĘ ANTYOKSYDACYJNĄ WE KRWI KAJAKARZY PODCZAS TRENINGU

THE INFLUENCE OF WHOLE-BODY CRYOSTIMULATION ON BLOOD ENZYMATIC ANTIOXIDANT BARRIER OF KAYAKERS DURING TRAINING

Słowa kluczowe: *dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, peroksydaza glutationowa, kriokomora, sport*
Key words: *superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, cryo-chamber, sport*

Summary

Background. *There is still growing interest in whole-body cryostirmulation among sportsmen, coaches and sport physicians. Successful application of cryogenic temperatures in the treatment of sports injuries is well documented and reported, but less is known about its beneficial effects in bioregenaration and overtraining prevention in sportsmen. The aim of the study was to determine the effect of whole-body cryostimulation on the activity of antioxidant enzymes in peripheral blood of kayakers during training.*

Material and methods. *Nineten kayakers of Polish Olimpic Team were subjected to 10-days training and each training session was preceded by exopsure of the whole body to extremely low temperatures in form of twice a day, 3 minutes cryochamber sessions in temperatures ranging from -120°C to -140°C. Four months before training period associated with cryostimulation, control training cycle without whole-body cryostimulation was performed. Venous blood was taken at the beginning and after the sixth and tenth day of both training cycles. The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) were estimated in erythrocytes.*

Results. *Comparing training without cryostimulation and training supported by extremely low temperatures stimulation, SOD activity was 37% ($p<0.001$) lower after the sixth day and 43% ($p<0.05$) higher after the tenth day of training with whole-body cryostimulation. There were no statistically significant changes of CAT activity both after the training without cryostimulation and with whole-body cryostimulation (the activity was slightly lower after the training preceded by cryogenic stimulation). Comparing both types of training the activity of GPx after sixth and tenth day was lower with cryostimulation. The GPx activity was 42% ($p<0.05$) lower after the sixth day and 55% ($p<0.05$) lower after next four days.*

Conclusions. *The increase of antioxidant enzymes activity after training without cryostimulation confirms intensified generation of reactive oxygen species induced by exercise. Training supported with whole-body cryostimulation facilitates preservation of prooxidant-antioxidant balance.*

Word count:	4186
Tables:	4
Figures:	0
References:	34

Adres do korespondencji / Address for correspondence
Alina Woźniak
Katedra Biologii Medycznej, Collegium Medicum, Uniwersytet Mikołaja Kopernika
85-092 Bydgoszcz, ul. Karłowicza 24, tel.: (0-52) 585-37-37, fax: (0-52) 585-37-42, e-mail: alina-wozniak@wp.pl

Otrzymano / Received *13.04.2007 r.*
Zaakceptowano / Accepted *05.07.2007 r.*

Wstęp

Celem sportowców jest osiąganie coraz lepszych wyników, dlatego ciągle poszukuje się sposobów, które przygotują zawodnika do znoszenia większych obciążeń treningowych lub też skrócą czas powrotu do utraconej formy. Ostatnio dużym zainteresowaniem zawodników, trenerów i lekarzy sportowych cieszy się kriostymulacja ogólnoustrojowa. Polega ona na stosowaniu na powierzchnię ciała temperatur poniżej -100°C w ciągu 2-3 minut [1,2].

Ogólnoustrojowe działanie niskich temperatur na organizm człowieka w celach leczniczych wprowadzono w Japonii po raz pierwszy pod koniec lat 70. XX w.. Yamauchi skonstruował komorę kriogeniczną i zastosował kriostymulację ogólnoustrojową w leczeniu schorzeń reumatycznych [3]. Działanie skrajnie niskich temperatur uruchamia mechanizmy termoregulacyjne w organizmie, od których zależą liczne korzystne efekty kriostymulacji ogólnoustrojowej [4]. Najważniejsze skutki działania temperatur kriogenicznych to zmniejszenie bólu, obrzęku, poprawa siły mięśni szkieletowych oraz zmniejszenie ich spastyczności [5], a także zwiększenie zakresu ruchu w obrębie stawów [6].

Udowodniono już i opisano korzystne działanie skrajnie niskich temperatur (w połączeniu z kinezyterapią) w leczeniu urazów ciała u sportowców, jednak nadal niewiele wiadomo o jej działaniu wspomagającym podczas treningu u sportowców. Istnieją wyniki badań, które wydają się wskazywać na opóźnione narastanie zmęczenia, czy też większą sprawność mięśni sportowców podczas treningu wspomaganego kriostymulacją [7]. Subiektywne odczucie wysiłku przez zawodnika (potwierdzone oceną w skali Borga) wskazuje na szybszą regenerację organizmu po treningu poprzedzonym kriostymulacją oraz wyższą motywację do podejmowania kolejnych obciążeń treningowych [8]. Dzięki kriostymulacji sportowcy łatwiej znoszą intensywny trening i coraz częściej łączą z tym rodzajem stymulacji swoje lepsze niż zazwyczaj wyniki sportowe.

Nadmierny wysiłek fizyczny prowadzi do stresu oksydacyjnego, czyli zaburzenia równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej w kierunku nasilenia procesów utleniania [9]. Zwiększona generacja reaktywnych form tlenu (RFT) w mięśniach szkieletowych powoduje uszkodzenia struktur komórkowych [10], które nie pozostają bez wpływu na siłę mięśni i zdolność do wykonywania określonego wysiłku. Dla zawodników walczących o lepsze wyniki sportowe, badania dotyczące procesów pro- i antyoksydacyjnych są szczególnie ważne. Wiele prac naukowych poświęcono problemom zachowania równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej po wysiłku fizycznym, jednak różnorodność uzyskiwanych wyników ciągle skłania do dalszych poszukiwań.

Wstępne badania dotyczące biochemicznych podstaw korzystnego wpływu kriostymulacji ogólnoustrojowej na organizm sportowca wskazują, że działanie skrajnie niskich temperatur może zwiększyć zdolności antyoksydacyjne organizmu [11,12].

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu kriostymulacji ogólnoustrojowej poprzedzającej codzienny trening Polskiej Kadry Olimpijskiej kajakarzy na aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy glutationowej (GPx), czyli enzymów stanowiących enzymatyczną barierę antyoksydacyjną organizmu.

Materiał i metody

W badaniach uczestniczyło 19 kajakarzy Polskiej Kadry Olimpijskiej. Charakterystykę podstawowych cech fizycznych osób badanych przedstawiono w Tabeli 1.

Kajakarzy poddano dziesięciodniowemu cyklowi treningowemu, w którym trening poprzedzony był kriostymulacją ogólnoustrojową. Kajakarze wchodzili dwa razy dziennie do kriokomory, gdzie każdorazowo przebywali przez trzy minuty w temp. od -120°C do -140°C. Cztery miesiące przed cyklem treningowym z kriostymulacją przeprowadzono trening kontrolny bez kriostymulacji.

Krew do badań pobrano z żyły łokciowej rano, na czczo, przed rozpoczęciem treningu oraz po szóstym i po dziesiątym dniu cykli treningowych. Przebieg treningu kajakarzy przedstawiono w Tabelach 2 i 3.

Trening z kriostymulacją i bez kriostymulacji u kajakarzy różniły się rodzajem ćwiczeń treningowych, czasem ich trwania oraz intensywnością treningu. Powyższe różnice wynikają z faktu, iż treningi były przeprowadzone w różnych okresach treningowych, w których sportowcy różnili się wydolnością organizmu i stopniem wytrenowania. Przebieg treningu dostosowano do aktualnej zdolności wysiłkowej sportowca. W miarę rozwoju wytrenowania stopniowo zwiększano obciążenia „zewnętrzne" (intensywność i czas trwania wysiłku). Mimo różnic, względne obciążenie (proporcja między zapotrzebowaniem na tlen

Tab. 1. Charakterystyka antropometryczna, wydolność fizyczna (VO_{2max}) i staż treningowy kajakarzy Polskiej Kadry Olimpijskiej

Tab. 1. Anthropometric characteristic, physical efficiency (VO_{2max}) and training duration concerning Polish Olympic Team kayakers

Cecha	Wartość [$\bar{x}$ ± SD]
Wiek [lata]	23,9±4,5
Wzrost [cm]	184,1±5,7
Masa ciała [kg]	83,1±5,7
VO_{2max} [ml/min/kg]	66,4±2,2
Okres trenowania [lata]	12,9±4,7

SD – odchylenie standardowe
SD – standard deviation

Tab. 2. Przebieg treningu kajakarzy podczas dziesięciodniowego cyklu treningowego bez kriostymulacji
Tab. 2. Kayakers' training protocol during a ten-day training cycle without cryostimulation

Dzień tygodnia	Rodzaj ćwiczeń treningowych	Czas i intensywność treningu
Poniedziałek	Trening ogólnorozwojowy Trening siłowy	120 min, **II** zakres 90 min, **I/II** zakres
Wtorek	Trening ogólnorozwojowy, trening wytrzymałości specjalnej Trening ogólnorozwojowy, trening wytrzymałości specjalnej	120 min, **II/III** zakres 120 min, **II/III** zakres
Środa	Trening siły maksymalnej Trening ogólnorozwojowy, trening wytrzymałości ogólnej	90 min, **III** zakres 120 min, **I/II** zakres
Czwartek	Trening ogólnorozwojowy w formie gier i zabaw sportowych Trening specjalistyczny na wodzie	120 min, **II/III** zakres 120 min, **I/II** zakres
Piątek	Trening specjalistyczny na wodzie, bieg Trening siłowy siły specjalnej	120 min, **I/II** zakres 90 min, **II/III** zakres
Sobota	Bieg Pływanie, gry i zabawy sportowe	90 min, **I/II** zakres 120 min, **II/III** zakres
Niedziela	Trening siłowy	90 min, **II/III** zakres

Trening rozpoczął się w poniedziałek
I zakres – stężenie mleczanu we krwi <4 mmol/l
II zakres – stężenie mleczanu we krwi 4-8 mmol/l
III zakres – stężenie mleczanu >8 mmol/l
Training began on Monday
I stage – concentration of blood lactate <4 mmol/l
II stage – concentration of blood lactate 4-8 mmol/l
III stage – concentration of blood lactate >8 mmol/l

podczas wykonywania pracy a maksymalnym pochłanianiem tlenu przez organizm) zawodnika podczas obu porównywanych cykli treningowych było podobne. Obciążeniem sterowano poprzez tętno sportowca. Pomiar tętna jest powszechnie stosowanym sposobem na kontrolowanie intensywności wysiłku fizycznego i tym samym dokładności treningu. Aktualny stan wytrenowania określano mierząc maksymalne pochłanianie tlenu, które warunkuje dostarczanie energii oraz próg mleczanowy, który mówi o efektywności źródeł energetycznych. Stosowano również skalę odczuwania wysiłku Borga, służącą do subiektywnej oceny ciężkości pracy. Piętnastopunktowa skala Borga (od 6 do 20 punktów) jest wiarygodnym wskaźnikiem względnego zmęczenia. Szereg prac wskazuje na jej wykorzystanie w sporcie [13,14].

Mężczyźni wchodząc do kriokomory ubrani byli tylko w spodenki, skarpety, rękawice oraz czapkę lub opaskę osłaniającą małżowiny uszne. Zabezpieczeniem przed odmrożeniem stóp były drewniane chodaki. Wejście zawodników do kriokomory odbywało się po konsultacji i kwalifikacji przez lekarza. Każdy badany informowany był o konieczności powolnego, możliwie niezbyt głębokiego oddychania przez maskę chirurgiczną, wyłożoną dodatkowo warstwą gazików, według formuły, że wdech ma być dwa razy krótszy niż wydech. Jeżeli do płuc przedostanie się w krótkim czasie większa ilość zimnego powietrza, to jego objętość podwaja się, co może spowodować opresję oddechową.

Każdorazowe wejście do kriokomory poprzedzone było kilkunastosekundową adaptacją w przedsionku kriokomory w temp. -60°C. Przez cały okres przebywania w kriokomorze zawodnicy pozostawali w kontakcie wzrokowym i słuchowym z osobą obsługującą komorę.

Trening poprzedzany kriostymulacją ogólnoustrojową przeprowadzono w Ośrodku Przygotowań Olimpijskich w Spale, zaś trening kontrolny (bez kriostymulacji) odbył się w Centralnym Ośrodku Sportu – Ośrodku Przygotowań Olimpijskich w Wałczu.

Krew do badań pobierano do probówek heparynizowanych. W erytrocytach krwi oznaczono aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy glutationowej (GPx).

Stężenie hemoglobiny w erytrocytach oznaczano metodą cyjanomethemoglobinową przy pomocy zestawów diagnostycznych firmy Polskie Odczynniki Chemiczne S.A. (Gliwice).

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej w erytrocytach oznaczano metodą Misry i Fridovicha [15]. Metoda ta oparta jest na hamowaniu samoutleniania ad-

Tab. 3. Przebieg treningu kajakarzy podczas dziesięciodniowego cyklu treningowego poprzedzonego dwukrotną w ciągu dnia kriostymulacją ogólnoustrojową
Tab. 3. Kayakers' training protocol during a ten-day training cycle preceded by twice a day whole-body cryostimulation

Dzień tygodnia	Rodzaj ćwiczeń treningowych	Czas i intensywność treningu
Poniedziałek	Trening ogólnorozwojowy Trening siłowy	120 min, I zakres 90 min, I zakres
Wtorek	Trening specjalistyczny Trening ogólnorozwojowy	120 min, I zakres 120 min, I/II zakres
Środa	Gry i zabawy sportowe Trening siłowy	120 min, I/II zakres 90 min, I/II zakres
Czwartek	Trening specjalistyczny na ergometrze kajakowym Trening ogólnorozwojowy	90 min, I zakres 120 min, I/II zakres
Piątek	Trening ogólnorozwojowy Trening siłowy	120 min, I zakres 90 min, I/II zakres
Sobota	Trening ogólnorozwojowy Trening ogólnorozwojowy	120 min, I zakres 120 min, I zakres
Niedziela	Trening siłowy	90 min, I zakres

Trening rozpoczął się w poniedziałek
I zakres – stężenie mleczanu we krwi <4 mmol/l
II zakres – stężenie mleczanu we krwi 4-8 mmol/l
Training began on Monday
I stage – concentration of blood lactate <4 mmol/l
II stage – concentration of blood lactate 4-8 mmol/l

renaliny przez enzym do adrenochromu w środowisku zasadowym.

Pomiary absorbancji wykonano przy 480 nm wobec próby ślepej. Absorbancję w próbie kontrolnej i badanej mierzono co minutę. Obserwowane zmiany w próbie zawierającej enzym odnoszono następnie do analogicznych czasowych zmian w kontroli, które winny wynosić 0,025 jednostki absorbancji na minutę. Jednostkę aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w podanych warunkach oznaczania definiuje się jako ilość enzymu, która powoduje 50% hamowanie reakcji, przy maksymalnym przyroście absorbancji o 0,025 jednostki na minutę na prostoliniowym odcinku tworzenia się adrenochromu.

Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej wyrażono w U/g Hb.

Aktywność katalazy oznaczono metodą Beersa i Sizera [16]. Zasada tej metody oparta jest na obniżeniu się absorbancji roztworu nadtlenku wodoru (H_2O_2) rozkładanego przez enzym. Zmniejszenie absorbancji jest wprost proporcjonalne do obniżającego się stężenia H_2O_2 w roztworze. Na podstawie molowego współczynnika absorbancji tej substancji można obliczyć ilość rozłożonego nadtlenku wodoru w określonym czasie, co pozwala na uzyskanie międzynarodowej jednostki aktywności enzymu (IU).

Pomiary absorbancji wykonano przy długości fali λ=240 nm, wykorzystując oprogramowanie kinetyczne firmy Varian. Aktywność CAT wyrażono w IU/g Hb.

Aktywność peroksydazy glutationowej oznaczono metodą Paglia i Valentine [17]. GPx jest enzymem, który katalizuje utlenianie zredukowanego glutationu (GSH) w reakcji z nadtlenkiem wodoru. Utleniony glutation (GSSG) jest następnie redukowany wskutek działania egzogennej reduktazy glutationowej przy udziale zredukowanej formy fosforanu dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH). NADPH jest koenzymem poniższej reakcji.

Miarą aktywności GPx była ilość µmoli utlenionego NADPH w czasie 1 minuty.

W obliczeniach wykorzystano molowy współczynnik absorbancji NADPH przy 340 nm.

Aktywność peroksydazy glutationowej wyrażono jako U/g Hb.

Gęstość optyczną prób mierzono na spektrofotometrze „Cary 100" firmy Varian (USA). Używane odczynniki pochodziły z firmy Sigma (Sigma-Aldrich Sp. z o.o. Polska) oraz z Przedsiębiorstwa Polskie Odczynniki Chemiczne S.A. (Gliwice).

Wszystkie osoby uczestniczące w eksperymencie zostały poinformowane o celu prowadzonych badań i wyraziły na nie pisemną zgodę. Badania uzyskały akceptację Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej w Bydgoszczy (KB/132/2002).

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej. Hipotezę o równości dwóch średnich testowano przy pomocy testu ANOVA. Za istotne uznano zmiany na poziomie istotności $p<0,05$. Wyznaczono współczynniki korelacji między badanymi parametrami. Zweryfikowano również hipotezę statystyczną o istotności tych współczynników.

Tab. 4. Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), katalazy (CAT) oraz peroksydazy glutationowej (GPx) we krwi kajakarzy po treningu bez kriostymulacji i treningu z kriostymulacją ogólnoustrojową

Tab. 4. The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) in blood of kayakers after training without cryostimulation and training with whole-body cryostimulation

Badany parametr	Przed rozpoczęciem treningu	Trening bez kriostymulacji		Trening poprzedzony dwukrotną w ciągu dnia kriostymulacją	
		Po szóstym dniu	Po dziesiątym dniu	Po szóstym dniu	Po dziesiątym dniu
[U/g Hb]	1111,8±99,5	1952,1±514,4***	893,9±86,9†††	1238,4±228,8†††	1281,6±163,8††††‡
[10^4 [U/g Hb]	71,6±14,5	84,3±20,4	64,1±12,6	65,3±20,9	62,9±25,2
[U/g Hb]	7,9±3,3	29,1±9,9***	22,9±8,9***	16,9±6,2*†	10,3±4,1††††‡

Wyniki przedstawiono jako $\bar{x}$ ±SD
* różnica istotna statystycznie w porównaniu z badaniem przed rozpoczęciem treningu (*p<0,05; ***p<0,001)
† różnica istotna statystycznie w porównaniu z badaniem po szóstym dniu treningu bez kriostymulacji (†p<0,05; †††p<0,001)
‡ różnica istotna statystycznie w porównaniu z badaniem po dziesiątym dniu treningu bez kriostymulacji (‡p<0,05)

Results are presented as $\bar{x}$ ±SD
* statistically significant difference in comparison with the test before training (*p<0.05; ***p<0.001)
† statistically significant difference in comparison with the test after the sixth day of training without cryostimulation (†p<0.05; †††p<0.001)
‡ statistically significant difference in comparison with the test after the tenth day of training without cryostimulation (‡p<0.05)

Wyniki

Po szóstym dniu treningu bez kriostymulacji ogólnoustrojowej aktywność SOD była wyższa o 76% (p<0,001) niż aktywność tego enzymu przed rozpoczęciem treningu (Tab. 4). Po dziesiątym dniu z kolei aktywność SOD obniżyła się o 54% (p<0,001) w porównaniu do aktywności po szóstym dniu i nie różniła się istotnie statystycznie od aktywności zmierzonej przed treningiem.

Po treningu poprzedzonym kriostymulacją ogólnoustrojową nie wykazano znamiennych statystycznie zmian aktywności SOD w porównaniu z aktywnością przed rozpoczęciem treningu.

Porównując trening bez kriostymulacji i trening wspomagany działaniem skrajnie niskich temperatur wykazano, że aktywność SOD była niższa o 37% (p<0,001) po szóstym dniu i wyższa o 43% (p<0,05) po dziesiątym dniu, gdy trening poprzedzała kriostymulacja ogólnoustrojowa.

Nie wykazano istotnych statystycznie zmian aktywności CAT zarówno po treningu bez kriostymulacji, jak i po treningu kojarzonym z kriostymulacją ogólnoustrojową (Tab. 4). Porównując oba rodzaje treningów zaobserwowano jednak, że aktywność CAT była nieznacznie niższa, zarówno po szóstym, jak i po dziesiątym dniu, gdy trening poprzedzała stymulacja w kriokomorze.

Trening bez kriostymulacji spowodował przeszło trzykrotny wzrost aktywności GPx po szóstym dniu (p<0,001). Po dziesiątym dniu aktywność tego enzymu nieznacznie obniżyła się, ale była prawie trzykrotnie wyższa (p<0,001) niż przed rozpoczęciem treningu (Tab. 4).

Trening kojarzony z kriostymulacją ogólnoustrojową spowodował po pierwszych sześciu dniach ok. dwukrotny wzrost aktywności GPx (p<0,05). Po kolejnych czterech dniach aktywność tego enzymu obniżyła się nieznacznie w porównaniu z szóstym dniem i nie różniła się istotnie statystycznie od aktywności zmierzonej przed rozpoczęciem treningu.

Porównując oba rodzaje treningów, zarówno po szóstym, jak i po dziesiątym dniu, aktywność GPx była niższa, gdy trening poprzedzała kriostymulacja ogólnoustrojowa. Po szóstym dniu aktywność GPx była niższa o 42% (p<0,05), a po kolejnych czterech dniach o 55% (p<0,05).

Wykazano istotną statystycznie ujemną korelację między aktywnością SOD i GPx w erytrocytach kajakarzy po dziesiątym dniu treningu bez kriostymulacji ogólnoustrojowej (r=-0,82; p<0,05).

Dyskusja

Po pierwszych sześciu dniach treningu kontrolnego bez kriostymulacji ogólnoustrojowej wykazano wzrost aktywności SOD i GPx. Zwiększona aktywność SOD świadczy o nasilonej generacji anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot -}$), który jest substratem katalizowanej przez SOD reakcji dysmutacji [18,19]. Wzrost aktywności GPx dowodzi nasilonego wytwarzania nadtlenku wodoru. SOD, katalizując reakcję dysmutacji $O_2^{\cdot -}$, staje się jednocześnie źródłem H_2O_2. Powstały H_2O_2 może utleniać hemoglobinę do jej formy ferrylowej (HbF^{4+}), która jest silnym czynnikiem indukującym peroksydację lipidów [20].

O zwiększonej peroksydacji lipidów błon erytrocytów w tej grupie kajakarzy podczas treningu świadczą badania, w których po szóstym dniu wykazano wzrost stężenia dialdehydu malonowego (MDA) (wyrażony poziomem substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym – TBARS) oraz tendencję do wzrostu stęże-

nia sprzężonych dienów – CD [21]. Sprzężone dieny oraz dialdehyd malonowy są jednymi z produktów procesu peroksydacji lipidów.

Zwiększona aktywność enzymów antyoksydacyjnych często występuje po wysiłku fizycznym czy też treningu, w efekcie nasilonej generacji RFT. Wysiłek fizyczny biegaczy średniodystansowych na bieżni mechanicznej o wzrastającej intensywności aż do odmowy, a u wioślarzy test 2000 m na ergometrze wioślarskim spowodowały wzrost aktywności SOD zarówno podczas wysiłku, jak i po 30-minutowej restytucji [20]. W erytrocytach piłkarzy i niewytrenowanych mężczyzn wyższa aktywność SOD występuje po upływie godziny od wysiłku supramaksymalnego (Wingate test) [22]. Wyższa aktywność SOD i GPx w erytrocytach kajakarzy nie może być efektem nasilonej syntezy tych enzymów, gdyż komórki te nie posiadają jądra. Przypuszcza się, że wzrost aktywności dysmutazy ponadtlenkowej jest efektem braku inhibitorów lub obecności aktywatorów tego enzymu [23].

W rozkładzie nadtlenku wodoru uczestniczy CAT i GPx. Po treningu fizycznym istotne statystycznie zmiany aktywności wykazano tylko w przypadku GPx, zaś aktywność CAT nie uległa zmianie. Obserwowana różnica może wynikać z faktu, że GPx nie tylko redukuje H_2O_2, ale uczestniczy również w usuwaniu nadtlenków organicznych [24]. GPx reaguje także z nadtlenoazotynem [25]. Prezentowane wyniki badań pozostają w zgodzie z badaniami innych autorów, którzy także podkreślają istotną rolę GPx w usuwaniu H_2O_2 w erytrocytach [26].

W erytrocytach kajakarzy, po treningu kojarzonym z kriostymulacją ogólnoustrojową, nie występują znamienne statystycznie zmiany aktywności SOD i CAT. Aktywność GPx natomiast była istotnie statystycznie wyższa w erytrocytach kajakarzy po szóstym dniu treningu z dwukrotną w ciągu dnia kriostymulacją. Porównując aktywność SOD, CAT i GPx po treningu z kriostymulacją i treningu bez kriostymulacji można stwierdzić, że była ona najczęściej niższa, gdy trening poprzedzono stymulacją w kriokomorze. Fakt ten może świadczyć o zmniejszonej generacji RFT lub o zwiększonym udziale nieenzymatycznych zmiataczy w usuwaniu RFT. Jednorazowa trzyminutowa kriostymulacja ogólnoustrojowa spowodowała jednak u niewytrenowanych mężczyzn istotny statystycznie wzrost aktywności SOD i GPx (badania własne, dane niepublikowane), co świadczy o nasilonym wytwarzaniu RFT. Możliwe, że indukowany kriostymulacją stres oksydacyjny wywołuje korzystne zmiany adaptacyjne w komórkach organizmu, co chroni je przed zaburzeniem równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej podczas treningu fizycznego.

Możliwe, że wpływ na obserwowane zmiany aktywności enzymów antyoksydacyjnych miała różna adaptacja organizmu sportowców do treningu. Trening bez kriostymulacji i trening poprzedzony działaniem skrajnie niskich temperatur przeprowadzono bowiem w różnych okresach treningowych, w których kajakarze różnili się stopniem wytrenowania. Istnieją prace, które wskazują, że trening zmniejsza podatność erytrocytów na uszkodzenia wywołane stresem oksydacyjnym [27]. Związane z wytrenowaniem zmiany adaptacyjne w obrębie enzymatycznej bariery antyoksydacyjnej polegają jednak głównie na zwiększonej „spoczynkowej" aktywności enzymów antyoksydacyjnych [28,29]. Różnice w aktywności tych enzymów ponadto widoczne są u osób znacznie różniących się stopniem wytrenowania, np. u sportowców i u osób niewytrenowanych. W niniejszej pracy aktywność SOD, CAT i GPx w erytrocytach kajakarzy przed rozpoczęciem treningu kontrolnego i treningu z udziałem zabiegów kriogenicznych była taka sama, a zastosowane w trakcie treningu obciążenie względne było podobne.

Schładzanie organizmu w kriokomorze indukuje w organizmie szereg reakcji nasilających generację RFT. Jednym z tych mechanizmów może być wzmożone utlenianie katecholamin. Katecholaminy, pochodne fenyloalaniny, takie jak dopamina, adrenalina i noradrenalina, będące ważnymi regulatorami metabolizmu, są niekwestionowanym źródłem RFT [30]. Czynnikiem zwiększającym aktywność układu współczulnego może być stres wywołany wysiłkiem fizycznym lub psychicznym, niektóre jednostki chorobowe oraz leki. Wykazano również, że pobyt w komorze kriogenicznej powoduje wzrost stężenia adrenaliny i noradrenaliny w surowicy krwi zdrowych kobiet i mężczyzn [6]. Produkty utleniania katecholamin w obecności reduktazy cytochromu P-450, jonów metali czy też $O_2^{\cdot -}$ ulegają redukcji do ortosemichinonów i hydrochinonów, dając jako produkt tych reakcji RFT [30]. Jednoelektronowe utlenianie hydrochinonu powoduje powstanie anionorodnika ponadtlenkowego i rodnika semichinonowego [31].

Innym potencjalnym źródłem RFT, w wyniku stymulacji skrajnie niskimi temperaturami, jest reakcja katalizowana przez oksydazę ksantynową. Enzym ten powstaje w warunkach niedotlenienia wskutek modyfikacji, prawdopodobnie proteolitycznej, dehydrogenazy ksantynowej [25]. Pobyt w kriokomorze związany jest ze skurczem naczyń krwionośnych. Po wyjściu następuje ich rozkurcz i masywne przekrwienie tkanek.

W warunkach wzmożonego dopływu krwi i tlenu oksydaza zaczyna przekazywać elektrony do tlenu zamiast na NAD^+, czemu towarzyszy powstawanie $O_2^{\cdot -}$ i H_2O_2 [25].

Wzmożona generacja RFT następuje również w efekcie pobudzenia metabolizmu brunatnej tkanki tłuszczowej. W tkance tej występują liczne mitochondria i wysokie stężenie cytochromów [25]. W następstwie działania skrajnie niskich temperatur dochodzi do uruchomienia mechanizmów termoregulacyjnych, w tym m.in. do aktywacji brunatnej tkanki tłuszczowej. W tkance tej dochodzi do zwiększonego zużycia tlenu, nasilenia procesów mitochondrialnego utleniania i tym samym wzmożonej generacji RFT. Nasilone wytwarzanie RFT ma miejsce również w peroksysomach tej tkanki.

Mimo dodatkowych, potencjalnych źródeł RFT generowanych w efekcie działania na organizm skrajnie niskich temperatur aktywność enzymów bariery antyoksydacyjnej była niższa, gdy trening wspomagano kriostymulacją ogólnoustrojową. Może to świadczyć o tym, że poprzedzanie treningu niskimi temperaturami ułatwia zachowanie równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej. Interesujący jest również fakt, że po kriostymulacji ogólnoustrojowej wykazuje się wzrost liczby retikulocytów we krwi obwodowej, mogący być skutkiem uwalniania rezerw szpikowych bądź stymulacji ich wzrostu [5]. Retikulacyty to niedojrzałe postacie krwinek czerwonych, powstałe z erytroblastów w procesie erytropoezy.

Z retikulocytów powstają erytrocyty – dojrzałe krwinki czerwone. Wzrost liczby retikulocytów musiał wpłynąć na aktywność oznaczanych enzymów antyoksydacyjnych, lecz mimo wzrostu ich poziomu, aktywność oznaczanych w erytrocytach enzymów była najczęściej niższa po treningu wspomaganym stymulacją w kriokomorze.

Podobne zmiany aktywności enzymów bariery antyoksydacyjnej przedstawiają również inne prace. Aktywność SOD nie zmieniła się istotnie statystycznie w erytrocytach dziesięciu kajakarzy Polskiej Kadry Olimpijskiej po piątym i po dziesiątym dniu treningu z dwukrotną w ciągu dnia ekspozycją na skrajnie niskie temperatury [11]. Aktywność CAT obniżyła się istotnie po dziesiątym dniu treningu, zaś aktywność GPx wzrosła znamiennie statystycznie po piątym dniu treningu, a następnie po dziesiątym dniu obniżyła się. Wzrost aktywności GPx zdaniem autorów pracy świadczy o wzmożonej generacji H_2O_2, która może wynikać np. z dwuelektronowej redukcji tlenu w reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantynową. Oksydaza ksantynowa redukuje cząsteczkę tlenu zarówno jedno-, jak i dwuelektronowo. Podczas redukcji jednym elektronem produktem reakcji jest $O_2^{\cdot-}$, a w efekcie dwuelektronowej redukcji jest to H_2O_2.

W piśmiennictwie naukowym brakuje informacji o wpływie skrajnie niskich temperatur działających zarówno miejscowo, jak i ogólnoustrojowo na aktywność enzymów antyoksydacyjnych w organizmie sportowca. Nieliczne tylko badania, prowadzone głównie na zwierzętach, dotyczą procesów pro- i antyoksydacyjnych po działaniu „zimna". Nie były to jednak temperatury kriogeniczne [32,33]. Po długotrwałym przebywaniu małych ssaków w niskiej temperaturze (+8°C±3°C) następuje wzrost aktywności CAT w mięśniach szkieletowych, mięśniu sercowym i nerkach oraz wzrost aktywności GPx w mięśniu sercowym [32]. Wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych jest prawdopodobnie efektem zwiększonego metabolizmu komórkowego pod wpływem niskiej temperatury i w konsekwencji nasilonej generacji RFT. Nie stwierdzono jednak istotnych statystycznie zmian aktywności SOD. Istnieją natomiast zależne od temperatury otoczenia różnice w aktywności CAT oraz cytoplazmatycznej i mitochondrialnej SOD w komórkach mięśnia sercowego szczurów po kilkutygodniowym treningu tych zwierząt na bieżni [33]. Trening szczurów na bieżni, przebiegający w dwóch różnych warunkach termicznych (w temperaturze +23°C oraz w temperaturze od +4 do +8°C), udowodnił, że aktywność CAT po treningu była niższa w niskiej temperaturze niż w temp. +23°C. Po wysiłku fizycznym w niższej temperaturze aktywność Cu, ZnSOD była również niższa, zaś aktywność MnSOD wyższa, w porównaniu z treningiem w temperaturze +23°C [33]. Wpływ niskiej temperatury w postaci pływania w wodzie o temp. +13°C na system obrony antyoksydacyjnej u myszy wykazali również Akhalaya i wsp. [34]. Autorzy oznaczali we krwi zwierząt m.in. aktywność SOD, CAT oraz stężenie cerulaplazminy. Po upływie jednej godziny, po ekspozycji na niską temperaturę, wykazali wzrost zdolności antyoksydacyjnych i jednocześnie adaptacyjnych organizmu, który utrzymywał się jeszcze po upływie doby od zakończenia pływania. Powyższe doświadczenia nie były jednak przeprowadzane w temperaturze kriogenicznej, dlatego nie można ich bezpośrednio odnieść do wyników prezentowanych w niniejszej pracy. Dowodzą one jednak, że temperatura otoczenia wpływa na aktywność enzymów antyoksydacyjnych.

Wnioski

1. Wysiłkowi fizycznemu towarzyszy zwiększone wytwarzanie reaktywnych form tlenu.
2. Wspomaganie treningu ogólnoustrojowym działaniem skrajnie niskich temperatur sprzyja zachowaniu równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej u kajakarzy.

Wniosek praktyczny

Kojarzenie treningu z kriostymulacją ogólnoustrojową zmniejsza wrażliwość sportowców na bodźce treningowe i redukuje ujemne skutki wysiłku fizycznego, co przyczynia się do uzyskania dobrych wyników sportowych

Piśmiennictwo

1. Yamauchi T, Nogami S, Miura K. Various applications of extreme cryotherapy and strenuous exercise program-focusing on chronic rheumatoid arthritis. Physioth Rehabil 1981; 5: 35-39.
2. Księżopolska-Pietrzak K. Krioterapia w osteoporozie. Pol Merk Lek 1998; 28: 222-224.
3. Wisłowska M. Krioterapia w chorobach reumatycznych. Problemy Lek 1990; 1: 115-119.
4. Birkner E, Sieroń A, Beck B i wsp. Zastosowanie temperatur kriogenicznych w medycynie. Wiad Lek 2003; 56: 53-56.
5. Biały D, Zimmer K, Zagrobelny Z. Krioterapia ogólnoustrojowa w sporcie. Medycyna Sportowa 1999; 15 (5): 21-24.
6. Zagrobelny Z, Halawa B, Jezierski Cz, Wawrowska A. Wpływ jednorazowego schładzania całego ciała w komorze kriogenicznej na wybrane wskaźniki hemodynamiczne i stężenia hormonów w surowicy u osób zdrowych. Pol Tyg Lek 1993; 48: 303-305.
7. Woźniak A, Mila-Kierzenkowska C, Drewa T i wsp. Aktywność wybranych enzymów lizosomalnych w surowicy krwi kajakarzy po kriostymulacji ogólnoustrojowej. Medycyna Sportowa 2001; 17 (8): 322-327.
8. Chwalbińska-Moneta J. Wpływ kriostymulacji ogólnoustrojowej na niektóre reakcje wysiłkowe u sportowców. Sport Wyczynowy 2003; 5-6: 461-462.
9. Jenkins RR. Exercise and oxidative stress methodology: a critique. Am J Clin Nutr 2000; 72 (Suppl.): 670-674.
10. Ebbeling CB, Clarkson PM. Exercise-induced muscle damage and adaptation. Sports Med 1989; 7: 207-234.
11. Woźniak A, Drewa G, Woźniak B i wsp. Effect of cryogenic temperatures and exercise on antioxidant enzymes activity in erythrocytes of kayakers. Biol Sport 2002; 19: 63-72.
12. Dugue B, Smolander J, Westerlund T i wsp. Acute and long-term effects of winter swimming and whole-body cryotherapy on plasma antioxidative capacity in healthy women. Scand J Clin Lab Invest 2005; 65: 395-402.
13. Borg GA. Psychophysical bases of perceived exertion. Med Sci Sports Exerc 1982; 14: 377-381.
14. Chatard JC, Wilson B. Drafting distance in swimming. Med Sci Sports Exerc 2003; 35: 1176-1181.

15. Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. J Biol Chem 1972; 247; 3170-3175.
16. Beers RF, Sizer IW. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. J Biol Chem 1952; 194: 133-140.
17. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J Lab Clin Med 1967; 70: 158-169.
18. Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev 1994; 74: 139-162.
19. Woźniak A. Signs of oxidative stress after exercise. Biol Sport 2003; 20: 93-112.
20. Zembroń-Łacny A, Szyszka K. Obrona antyoksydacyjna (dysmutaza ponadtlenkowa, glutation) a poziom produktów peroksydacji lipidów we krwi sportowców. Medicina Sportiva 1998; 2: 231-238.
21. Woźniak A, Woźniak B, Drewa G, Mila-Kierzenkowska C, Rakowski A, Porzych M. Peroksydacja lipidów we krwi kajakarzy po kriostymulacji ogólnoustrojowej i treningu fizycznym. Medycyna Sportowa 2007; 23 (1): 15-22.
22. Woźniak A, Drewa G, Rakowski A, Woźniak B, Krzyżyńska-Malinowska E. Wpływ supramaksymalnego wysiłku fizycznego na stężenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym oraz na aktywność niektórych enzymów antyoksydacyjnych we krwi piłkarzy i niewytrenowanych mężczyzn. Medycyna Sportowa 2001; 17 (3): 109-113.
23. Ohno H, Yahata T, Yamashita K i wsp. Effect of physical training on immunoreactive γ-glutamyltransferase in human plasma. Enzyme 1988; 39: 110-114.
24. Takebe G, Yarimizu J, Saito Y i wsp. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. J Biol Chem 2002; 277: 41254-41258.
25. Bartosz G. Druga twarz tlenu. Warszawa 2003.
26. Giulivi C, Hochstein P, Davies KJA. Hydrogen peroxide production by red blood cells. Free Radic Biol Med 1994; 16: 123-129.
27. Petibois C, Déléris G. Erythrocyte adaptation to oxidative stress in endurance training. Arch Med Res 2005; 36: 524-531.
28. Mena P, Maynar M, Gutierrez JM, Maynar J, Timon J, Campillo JE. Erythrocyte free radical scavenger enzymes in bicycle professional racers. Adaptation to training. Int J Sports Med 1991; 12: 563-566.
29. Drewa G, Woźniak A, Chęsy G, Rakowski A, Woźniak B. Effect of exercise on the activities of selected antioxidant enzymes in the erythrocytes of weightlifters. Biol Sport 1998; 15: 75-79.
30. Kruk A, Kładna A. Wpływ ćwiczeń fizycznych na metabolizm katecholamin. Medycyna Sportowa 1998; 14 (6): 9-16.
31. Gutierrez PL. The metabolism of quinone-containing alkylating agents: free radical production and measurement. Front Biosci 2000; 5: 629-638.
32. Selman C, McLaren JS, Himanka MJ, Speakman JR. Effect of long-term cold exposure on antioxidant enzyme activities in a small mammals. Free Radic Biol Med 2000; 28: 1279-1285.
33. Harris MB, Starnes JW. Effects of body temperature during exercise training on myocardial adaptations. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 280: 2271-2280.
34. Akhalaya MY, Platonov AG, Baizhumanov AA. Short-term cold exposure improves antioxidant status and general resistance of animals. Bull Exp Biol Med 2006; 141: 26-29.