

Andrzej Milewicz¹, Łukasz Łaczmański¹, Katarzyna Dunajska², Felicja Lwow², Joanna Urban³, Kinga Belowska-Bień³, Iwona Jędrychowska³, Ryszard Andrzejak³

¹Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

²Katedra Medycyny Sportowej, Zakład Promocji Zdrowia, Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu

³Klinika Chorób Wewnętrznych, Zawodowych i Nadciśnienia Tętniczego, Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Wpływ standaryzowanego wysiłku fizycznego na stężenie zredukowanego glutationu u kobiet po menopauzie — rola polimorfizmu receptora β_3 -adrenergicznego

Influence of standardized physical effort on reduced glutathione level in postmenopausal women — the role of β_3 -adrenergic receptor polymorphism

STRESZCZENIE

WSTĘP. Istnieją doniesienia, że polimorfizm Trp⁶⁴/Arg⁶⁴ receptora β_3 -adrenergicznego (ADRB3) wiąże się z częstszym występowaniem otyłości. Udowodniono także, że otyłość wiąże się z nasilonym stresem oksydacyjnym. Celem naszych badań była ocena związku wspomnianego polimorfizmu ADRB3 z parametrami powysiłkowego stresu oksydacyjnego u kobiet po menopauzie. **MATERIAŁ I METODY.** Badania przeprowadzono u 80 kobiet w wieku 50–60 lat, wybranych losowo spośród mieszkanek Wrocławia. U wszystkich badanych wykonano pomiary antropometryczne, badanie na zawartość tkanki tłuszczowej (*total body*) metodą DXA z użyciem aparatu DPX(+) Lunar (Stany Zjednoczone) oraz oznaczenia biochemiczne: profil lipidowy, stężenie glukozy, estradiolu i FSH z użyciem komercyjnych zestawów odczynników.

Adres do korespondencji: dr med. Katarzyna Dunajska
Katedra Medycyny Sportowej, Zakład Promocji Zdrowia
Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu
ul. Witelona 25a, 51–612 Wrocław
e-mail: dunajska@mp.pl

Copyright © 2008 Via Medica

Nadesłano: 20.03.2008 Przyjęto do druku: 20.05.2008

Wskaźnikiem stresu oksydacyjnego było stężenie zredukowanego glutationu w krwinkach oznaczone w heparynizowanej krwi pełnej kolorymetryczną metodą Beutlera. Krew do oznaczenia stresu oksydacyjnego pobierano przed, bezpośrednio po i 6 godzin po 30-minutowym wysiłku fizycznym na cykloergometrze. Genotypowanie ADRB3 przeprowadzono metodą PCR i minisekwencjonowania z użyciem aparatu ABI 310 (Applied Biosystems). **WYNIKI.** Częstość występowania genotypu Trp⁶⁴/Arg⁶⁴ w badanej populacji wyniosła 11%. Genotyp Arg⁶⁴/Arg⁶⁴ wystąpił tylko u jednej osoby. U pozostałych 88% kobiet stwierdzono genotyp Trp⁶⁴/Trp⁶⁴. Podobne w obu grupach średnie wyjściowe stężenie zredukowanego glutationu w krwinkach po 6 godzinach od wysiłku obniżało się istotnie ($p < 0,05$) jedynie w grupie z genotypem Trp⁶⁴/Trp⁶⁴. **WNIOSKI.** Polimorfizm Trp⁶⁴/Arg⁶⁴ receptora β_3 -adrenergicznego ma najprawdopodobniej wpływ na stężenie zredukowanego glutationu po standaryzowanym wysiłku fizycznym u kobiet po menopauzie.

Słowa kluczowe: polimorfizm, receptor β_3 -adrenergiczny, stres oksydacyjny, kobiety pomenopauzalne

Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii 2008, tom 4, nr 2, s. 58–63

ABSTRACT

INTRODUCTION. Some, but not all studies indicate, that the Trp⁶⁴/Arg⁶⁴ polymorphism of β_3 -adrenergic receptor (ADRB3) is associated with obesity. Furthermore, obesity is connected with enhanced oxidative stress.

The aim of our study was evaluation of frequency of this ADRB3 polymorphism and its association with metabolic syndrome parameters and oxidative stress in postmenopausal women.

MATERIAL AND METHODS. We performed the study in 80 women, aged 50–60, selected randomly from Wrocław city population. Estimation of anthropometric parameters, total body fat — using DPX(+) Lunar, USA device and biochemical estimations such as lipid profile, glucose, estradiol and FSH serum level (using commercial kits) were carried out. Oxidative stress was estimated by measurement of reduced glutathione concentration, using Beutler colorimetric method. Blood for analysis was collected before, direct after and 6 h after the 30-minutes physical test using cycloergometer. ADRB3 genotyping was performed by PCR and minisequencing using ABI 310 sequencer (Applied Biosystems).

RESULTS. The frequency of Trp⁶⁴/Arg⁶⁴ genotype in investigated population was 11%. The Arg⁶⁴/Arg⁶⁴ genotype had only one woman. Trp⁶⁴/Trp⁶⁴ genotype had 88% of women. The reduced glutathione level similar in both groups before effort, 6 h after standardized physical effort decreased statistically significant ($p < 0.05$) only in Trp⁶⁴/Trp⁶⁴ group.

CONCLUSIONS. The Trp⁶⁴/Arg⁶⁴ polymorphism of β_3 -adrenergic receptor seems to have an influence on reduced glutathione level after standardized physical effort in postmenopausal women.

Key words: polymorphism, β_3 -adrenergic receptor, oxidative stress, postmenopausal women

Endokrynologia, Otyłość i Zaburzenia Przemiany Materii 2008, tom 4, nr 2, s. 58–63

Wstęp

Na podstawie licznych badań udowodniono, że systematyczna aktywność fizyczna o charakterze wytrzymałościowym zwiększa wydolność układu krążenia, sprzyja prozdrowotnej modyfikacji profilu lipidowego i gospodarki węglowodanowej, wpływa na zrównoważenie bilansu energetycznego i redukcję masy ciała [1–6]. Z drugiej strony wiadomo, że intensywny wysiłek fizyczny może prowadzić do uszkodzenia mięśni, a istotną rolę w tym procesie odgrywają reaktywne formy tlenu (ROS, *reactive oxygen species*). Wykazano, że w wyniku wysiłku dochodzi w mięśniach do wzmożonej peroksydacji lipidów. Reakcja ta następuje z opóźnieniem, a największe stężenie produktów peroksydacji zanotowano 6 godzin po wysiłku [7]. Podwyższone stężenie produktów peroksydacji lipidów jest spowodowane zwiększonym zużyciem tlenu podczas wysiłku fizycznego, a to pociąga za sobą wzrost produkcji anionorodnika ponadtlenkowego. Stężenie tego

rodnika jest na tyle wysokie, że dochodzi do utlenienia glutationu i w ten sposób w komórkach mięśni zmniejsza się ilość naturalnego antyoksydantu. Powstające w trakcie wysiłku fizycznego ROS, poza uszkodzeniem mięśni, powodują oksydacyjne uszkodzenia DNA. Wskazuje na to następujące po wysiłku podwyższone stężenie wydalanych z moczem oksydacyjnie zmodyfikowanych zasad DNA [8]. Ciekawym jest fakt, że mięśnie kobiet są mniej wrażliwe na uszkodzenia wywołane działaniem ROS, a u zwierząt osobniki żeńskie doświadczają stresu oksydacyjnego pod wpływem wysiłku fizycznego tylko w ograniczonym stopniu lub nie doświadczają go wcale [9]. Wydaje się, że może to być spowodowane antyoksydacyjnymi właściwościami żeńskich hormonów płciowych, głównie pochodnych estradiolu [10]. Czy w związku z tym po menopauzie zwiększa się ryzyko wystąpienia powysiłkowego stresu oksydacyjnego? Nieliczne badania odpowiadają na to pytanie twierdząco [11].

Udowodniono także związek stresu oksydacyjnego z otyłością [12–14] — uważa się go również za jeden z głównych mechanizmów odpowiedzialnych za dysfunkcję śródbłonna u osób otyłych [14]. Wiadomo, że w patogenezie otyłości istotną rolę odgrywają czynniki genetyczne. Mutacja receptora β_3 -adrenergicznego w kodonie 64 (Trp/Arg) opisana została jako sprzyjająca powstawaniu otyłości, wcześniejszemu ujawnieniu się cukrzycy typu 2 i obniżeniu tempa metabolizmu podstawowego [15–17].

Mając na uwadze powyższe dane, autorzy artykułu podjęli badania nad oceną wpływu jednorazowego wysiłku fizycznego o charakterze wytrzymałościowym na biochemiczne parametry stresu oksydacyjnego u kobiet po menopauzie; sprawdzili także, czy polimorfizm Trp⁶⁴/Arg⁶⁴ receptora β_3 -adrenergicznego ma wpływ na zachowanie się parametrów powysiłkowego stresu oksydacyjnego. Podobne badania autorzy przeprowadzali w przeszłości [18, 19] na podstawie stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS, *Thiobarbutyric Acid Reactive Substance*) w surowicy krwi. Jednak z uwagi na to, że stężenie zredukowanego glutationu (GSH, *reduced glutathione*) w krwinkach jest najczęściej oznaczanym markerem świadczącym pośrednio o stresie oksydacyjnym [20], postanowili rozszerzyć badania o ten właśnie parametr.

Materiał i metody

Analizie poddano grupę 80 kobiet pomenopauzalnych w wieku 50–60 lat, które zostały losowo wybrane spośród mieszkanek Wrocławia, a następnie zakwalifikowane do wzięcia udziału w badaniach. Kryteria wykluczenia z badania były następujące: choroby przewlekłe wymagające szczególnej diety lub leczenia lekami hipoglikem

mizującymi, hipolipemizującymi lub steroidami, stosowanie hormonalnej terapii zastępczej, palenie tytoniu.

Badania obejmowały wywiad, badanie fizykalne (w tym pomiar ciśnienia tętniczego), pomiary antropometryczne — obwód talii, wskaźnik masy ciała (BMI, *body mass index*) oraz badanie całkowitej zawartości tłuszczu w organizmie (*total body*), które wykonano metodą absorpcjometrii podwójnej wiązki promieniowania rentgenowskiego (DXA, *Dual-Energy X-ray Absorptiometry*) za pomocą aparatu DPX+ LUNAR (Stany Zjednoczone). Ponadto pobrano krew do badania biochemicznego, hormonalnego i genetycznego. Stężenia triglicerydów, cholesterolu całkowitego, frakcji LDL, frakcji HDL i glukozy oznaczono metodami enzymatycznymi (Olympus Au 560; bioMerieux, Francja). Oznaczenie stężenia estradiolu (E2) i FSH (foliotropina [folikulostymulina]) (w celu potwierdzenia okresu pomenopauzalnego) wykonano radioimmunologiczną metodą RIA (*Radio Immuno Assay*). Oznaczenia hormonalne wykonano przy użyciu komercyjnych zestawów odczynników (*DPC Diagnostic*) (Stany Zjednoczone) w atestowanym Laboratorium Naukowym Kliniki Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami AM we Wrocławiu.

Wskaźnikiem stresu oksydacyjnego było stężenie zredukowanego glutationu w krwinkach oznaczane w heparynizowanej krwi pełnej kolorymetryczną metodą Beutlera [21]. W celu ilościowego oznaczenia hemoglobiny i karboksyhemoglobiny użyto zmodyfikowanej metody Whitehead'a i Worthingtona [22], która wykorzystuje różnice w rozpuszczalności hemoglobiny i karboksyhemoglobiny w podwyższonej temperaturze w roztworze o pH równym 5,5. Do każdej serii pomiarów wykonano krzywą standardową.

Krew do badania genetycznego (1 ml) pobierano z żyły obwodowej w obecności antykoagulantu (EDTA, *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*), a następnie przechowywano w temperaturze -20°C . Genomowe DNA izolowano z leukocytów krwi metodą kolumnkową (A&A *Biotechnology*). Badano polimorfizm W64R (zmiana tryptofanu na argininę w pozycji 64) genu receptora adrenergicznego (*ADRB3*). Do oznaczenia polimorfizmu użyto metody łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, *polymerase chain reaction*) oraz minisekwencjonowania (*SNaPshot kit firmy Applied Biosystems*). W pierwszym etapie amplifikowano fragment genu o wielkości 367 par zasad. Do amplifikacji użyto zestawu PCR Core Kit firmy QIAGEN oraz następującej sekwencji starterów:

Fw: 5'-TTCCTTCTTTCCCTACCGCC-3'

Rv: 5'-GCAGCCAGTGGCGCCCAACGG-3'

Reakcję amplifikacji przeprowadzono w następujących warunkach:

- denaturacja początkowa w temperaturze 95°C przez 3 minuty;
- 35 cykli:

- denaturacja w temperaturze 95°C przez 30 sekund;
- przyłączenie w temperaturze 55°C przez 45 sekund;
- wydłużanie w temperaturze 72°C przez 30 sekund;
- wydłużanie końcowe w w temperaturze 72°C przez 10 minut.

Minisekwencjonowanie polega na prowadzeniu reakcji PCR w obecności startera 5'-ATGGTCTG-GAGTCTCGGAGTCC-3' (zaprojektowanego tak, by kończył się jedną parą zasad przed miejscem polimorfizmu) oraz znakowanych fluorescencyjnie dideoksynukleotydów. W wyniku reakcji powstał produkt o jeden nukleotyd dłuższy od startera znakowany odpowiednim fluoroforem. Rozdział produktów prowadzono przy użyciu Analizatora ABI 310 (*Applied Biosystems*). Do określenia wielkości produktów reakcji użyto programu GeneScan 3.1.2 (*Applied Biosystems*).

U wszystkich badanych przeprowadzono 30-minutowy wysiłek fizyczny na cykloergometrze Corival V₂ (Lode BV, NL) z prędkością 50–55 obrotów/min, przy obciążeniu na poziomie 30–50% należnego maksymalnego zużycia tlenu ($\text{VO}_{2\text{max}}$) i przy współczynniku oddechowym (RER , *respiratory exchange ratio*) = VCO_2/VO_2 na poziomie 0,7–0,75. Do redukcji masy ciała u osób otyłych proponuje się taki właśnie poziom intensywności, ponieważ procentowy udział wolnych kwasów tłuszczowych w pokrywaniu zapotrzebowania metabolicznego jest wtedy największy [23]. Należyne $\text{VO}_{2\text{max}}$ obliczano indywidualnie na podstawie wzoru Wassermana [24], natomiast wysiłkowe VO_2 oceniano metodą kaloryetrii pośredniej przy użyciu spirometru CPFS/DTM USB z komputerowym programem analizy danych Breeze Suite 6.2. ATS/ERS z opcją VO 2000 (*Medical Graphics Corp.*, Stany Zjednoczone).

Normalność rozkładu danych sprawdzono testem Shapiro-Wilka. Z uwagi na rozkład odbiegający od normalnego, różnice między zmiennymi ciągłymi analizowano za pomocą nieparametrycznego testu U Manna-Whitneya, a między danymi jakościowymi — za pomocą testu χ^2 . Poziom istotności statystycznej ustalono na $p < 0,05$.

Badania przeprowadzono zgodnie z zasadami zawartymi w Deklaracji Helsińskiej, po uzyskaniu akceptacji Komisji Etycznej przy Akademii Medycznej we Wrocławiu, a wszystkie osoby wyraziły świadomą zgodę na udział w badaniach.

Wyniki

W pierwszej kolejności sprawdzano zgodność rozkładu polimorfizmu z prawem Hardy'ego-Weinberga (tab. 1).

Tabela 1. Ocena zgodności rozkładu polimorfizmu Trp⁶⁴/Arg⁶⁴ receptora β_3 -adrenergicznego z prawem Hardy'ego-Weinberga

	n (%)	Częstość genotypu			Częstość allelu	
		Trp ⁶⁴ /Trp ⁶⁴	Trp ⁶⁴ /Arg ⁶⁴	Arg ⁶⁴ /Arg ⁶⁴	pTrp ⁶⁴	pArg ⁶⁴
Wartości otrzymane	80 (100%)	70 (88%)	9 (11,1%)	1 (0,9%)	0,93	0,07
Wartości wynikające z prawa Hardy'ego-Weinberga	80 (100%)	69,6 (87%)	10,08 (12,6%)	0,32 (0,4%)	–	–

Tabela 2. Porównanie parametrów antropometrycznych i biochemicznych w zależności od polimorfizmu ADRB3 u badanych kobiet

	Trp ⁶⁴ /Trp ⁶⁴ (n = 70)		Trp ⁶⁴ /Arg ⁶⁴ (n = 9)		p*
	Średnia	SD	Średnia	SD	
Wiek (lata)	55,8	2,4	57,2	1,6	ns
Ciśnienie tętnicze skurczowe [mm Hg]	128	18	137	20	ns
Ciśnienie tętnicze rozkurczowe [mm Hg]	82	10	85	10	ns
BMI [kg/m ²]	27,5	4,9	30,1	5,0	ns
Tk. tłuszczowa całkowita (%)	36,8	5,4	40,6	6,2	ns
Glukoza [mg/dl]	89,3	9,8	93,9	7,8	ns
Cholesterol całkowity [mg/dl]	247,9	48,6	243,9	44,3	ns
Triglicerydy [mg/dl]	108,0	45,2	124,0	42,8	ns
Cholesterol frakcji HDL [mg/dl]	72,2	18,5	60,3	15,3	<0,05
Cholesterol frakcji LDL [mg/dl]	154,1	46,2	147,6	50,7	ns
Karboksyhemoglobina (%Hb)	1,7	0,7	2,0	0,7	ns

*p — w teście U Manna-Whitneya, ns (*non significant*): p > 0,05; GSH (*reduced glutathione*) — zredukowany glutation; SD (*standard deviation*) — odchylenie standardowe, BMI (*body mass index*) — wskaźnik masy ciała

Wartości $\chi^2 = 1,56$, df = 2 i p < 0,457717 wskazują na zgodność rozkładu polimorfizmów z prawem Hardy'ego-Weinberga.

Charakterystykę poszczególnych grup kobiet przedstawiono w tabeli 2. Poszczególne grupy genotypowe grupy genotypowe nie różniły się żadnym z badanych parametrów. Podobne w obu grupach średnie wyjściowe stężenie zredukowanego glutationu w krwinkach po 6 godzinach od wysiłku obniżało się istotnie (p < 0,05) jedynie w grupie z genotypem Trp⁶⁴/Trp⁶⁴, natomiast u kobiet z genotypem Trp⁶⁴/Arg⁶⁴ pozostawało na tym samym poziomie (tab. 3).

Dyskusja

Na podstawie badań autorzy stwierdzili, że polimorfizm Trp⁶⁴/Arg⁶⁴ genu receptora β_3 -adrenergicznego ma najprawdopodobniej wpływ na stężenie zredukowanego glutationu po wysiłku fizycznym. Podobne w obu grupach średnie wyjściowe stężenie zredukowanego glutationu w krwinkach po 6 godzinach od wysiłku obniżało się istotnie (p < 0,05) jedynie w grupie z genoty-

pem Trp⁶⁴/Trp⁶⁴, co świadczy o zwiększonej obronie antyoksydacyjnej, a pośrednio o nasileniu stresu oksydacyjnego u tych kobiet. Biorąc jednak pod uwagę małą liczbę uczestników badania, wyniki te należałoby interpretować bardzo ostrożnie. Poważnym mankamentem opisywanych badań jest także występowanie w grupie badanej tylko 1 przypadku homozygoty recesywnej. Na tej podstawie nie można wnioskować o wpływie genotypu Arg⁶⁴/Arg⁶⁴ na czynniki fenotypowe. Uprzednio badane przez autorów artykułu w większej grupie osób, średnie stężenie substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w surowicy krwi, podobnie zwiększało się istotnie (p < 0,05) bezpośrednio po wysiłku i utrzymywało się na podwyższonym poziomie po 6 godzinach w obu grupach genotypowych [18, 19]. Pomijając aspekt genotypu, należy zadać pytanie, dlaczego we wszystkich badaniach autorów pracy po tak niewielkim wysiłku (na poziomie 30% VO₂max) dochodziło do zwiększenia parametrów stresu oksydacyjnego? Czyżby wysiłek ten był mimo wszystko zbyt duży dla niewytrenowanych, prowadzących w większości siedzący tryb życia kobiet? Najprawdopodobniej tak. Wynika z tego, że sporadyczna lub

Tabela 3. Średnie stężenie zredukowanego glutationu przed, bezpośrednio po i 6 godzin po teście wysiłkowym u kobiet z różnymi genotypami ADRB3 (w grupie z genotypem Trp⁶⁴/Trp⁶⁴ poziom GSH obniżał się istotnie statystycznie po 6 godzinach od wysiłku)

	Trp ⁶⁴ /Trp ⁶⁴ (n = 70)		Trp ⁶⁴ /Arg ⁶⁴ (n = 9)		p*
	Średnia	SD	Średnia	SD	
GSH w 0' [mg/dl erytr.]	38,7	5,8	40,3	5,8	ns
GSH bezpośrednio po teście [mg/dl erytr.]	39,5	6,5	40,1	6,7	ns
GSH 6 h po teście [mg/dl erytr.]	31,6	14,2	41,4	6,7	0,05

*p — w teście U Manna-Whitneya; ns (*non significant*): p > 0,05; GSH (*reduced glutathione*) — zredukowany glutation; SD (*standard deviation*) — odchylenie standardowe

zbyt intensywna aktywność fizyczna może być mniej korzystna niż niepodjęcie jej w ogóle, co potwierdzają liczne publikacje zajmujące się tym problemem [25–27].

Wyniki badań opisanych w niniejszej pracy są także zgodne z doniesieniami innych autorów o braku związku badanego polimorfizmu z otyłością [28, 29]. Zaobserwowano natomiast niewielką różnicę w średnich stężeniach triglicerydów i cholesterolu frakcji HDL między grupą kobiet z genotypem Trp⁶⁴/Arg⁶⁴ a grupą kobiet z genotypem Trp⁶⁴/Trp⁶⁴ na niekorzyść tej pierwszej. Obserwacje te są zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy wykazali, że osoby z polimorfizmem Trp⁶⁴/Arg⁶⁴ mają nieprawidłowy profil lipidowy i trudności w redukcji masy ciała [30, 31]. W innych badaniach, dotyczących wpływu systematycznego wysiłku fizycznego z równoczesnym stosowaniem diety niskokalorycznej na otyłość u dziewcząt, wykazano obniżenie masy tłuszczowej, stężenia cholesterolu całkowitego i frakcji LDL oraz parametrów stresu oksydacyjnego, takich jak TBARS i H₂O₂ w osoczu krwi. Obserwowano wzrost stężenia cholesterolu frakcji HDL, natomiast

w całkowitej zdolności antyoksydacyjnej nie wykazano istotnych korzystnych zmian. Autorzy uważają, że zmieniiony profil lipidowy był czynnikiem obniżającym wskaźniki stresu oksydacyjnego [32]. W kolejnym badaniu oceniano spoczynkowe stężenie zredukowanego glutationu i aktywność reduktazy glutationu oraz peroksydację lipidów i kinazy kreatynowej w osoczu w grupie sportowców wyczynowych-biatlonistów (7 mężczyzn i 7 kobiet), jednak nie potwierdzono zależności między wydolnością tlenową (VO₂max) a poziomem wskaźników stresu oksydacyjnego [33].

Stwierdzone przez autorów artykułu częstości występowania poszczególnych genotypów są podobne do przedstawionych w innych badaniach przeprowadzonych wśród osób rasy kaukaskiej. W dużym badaniu zrealizowanym w Niemczech wśród 1259 uczestników genotyp Trp⁶⁴/Trp⁶⁴ wystąpił u 88,3% badanych, genotyp Trp⁶⁴/Arg⁶⁴ u 10,8%, a genotyp Arg⁶⁴/Arg⁶⁴ u 0,8% badanych [29].

Podsumowując, polimorfizm Trp⁶⁴/Arg⁶⁴ receptora β₃-adrenergicznego ma najprawdopodobniej wpływ na stężenie zredukowanego glutationu po standaryzowanym wysiłku fizycznym u kobiet po menopauzie.

Piśmiennictwo

- Krysztofak H., Mamcarz A.: Fizjologiczne podstawy obciążenia wysiłkiem — wysiłek na receptę. *Kardiologia Polska* 1996; 44: 147–155.
- Hickner R.C., Racette S.B., Binder E.F., Fisher J.S., Kohrt W.M.: Suppression of whole body and regional lipolysis by insulin: effects of obesity and exercise. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999; 84: 3886–3897.
- Loucks A.B.: Exercise Training in the Normal Female. W: Warren P. M., Constantini N.W. (red.). *Sports Endocrinology*. Human Press Inc., Totowa New York 2000; 165–180.
- Merians D.R., Haskell W.L., Vranizan K.M., Phelps J., Woods P.D., Superko R.: Relationship of Exercise, Oral Contraceptive Use, and Body Fat to Concentrations of Plasma Lipids and Lipoprotein Cholesterol in Young Women. *Am. J. Med.* 1985; 78: 913–919.
- Russel R.P., Pratt M., Blair S.N. i wsp.: Physical activity and public health. *JAMA* 1995; 273: 402–407.
- Schneider S.H., Gulerina P.S. *Diabetes and Exercise*. W: Warren P.M., Constantini N.W. (red.). *Sports Endocrinology*. Human Press Inc., Totowa, New York 2000; 227–238.
- Ji L.L.: Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1999; 222: 283–292.
- Tsai K., Hsu K.M. i wsp.: Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31: 1465–1472.
- Tiidus P.M.: Can estrogens diminish exercise induced muscle damage? *Can. J. Appl. Physiol.* 1995; 20: 26–38.
- Bar P.R., Amelink G.J.: Protection against muscle damage exerted by oestrogen: hormonal or antioxidant action? *Biochem. Soc. Trans.* 1997; 25: 50–54.
- Vincent H.K., Vincent K.R., Bouguignon C., Braith R.W.: Obesity and postexercise oxidative stress in older women. *Med. Sci. Sport. Exerc.* 2005; 37: 213–219.
- Urakawa H., Katsuki A., Sumida Y. i wsp.: Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88: 4673–4676.
- Dandona P., Mohanty P., Ghanim H. i wsp.: The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation and protein carbonylation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 86: 355–362.
- Williams I.L., Wheatcroft S.B., Shah A.M., Kearney M.T.: Obesity, atherosclerosis and the vascular endothelium: mechanism of reduced nitric oxide bioavailability in obese humans. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2002; 26: 754–764.

15. Clement K., Vaisse C., Manning B.S. i wsp.: Genetic variation in the beta3 adrenergic receptor and an increased capacity to gain weight in patients with morbid obesity. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333: 322–354.
16. Walston J., Silver K., Bogardus C. i wsp.: Time of onset of non-insulin-dependent diabetes mellitus and genetic variation in the beta3 adrenergic receptor gene. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333: 343–347.
17. Widen E., Lehto M., Kanninen T. i wsp.: Association of a polymorphism in the beta3-adrenergic receptor gene with features of the insulin resistance syndrome in Finns. *N. Engl. J. Med.* 1995; 333: 348–351.
18. Lwow F., Dunajska K., Tworowska U. i wsp.: Post-exercise oxidative stress and obesity in postmenopausal women: The role of beta(3)-adrenergic receptor polymorphism. *Gynecol. Endocrinol.* 2007; 23 (10): 597–603.
19. Dunajska K., Lwow F., Tworowska U., Jedrzejuk D., Milewicz A.: Relationship of beta(3)-adrenergic receptor polymorphism with metabolic syndrome and oxidative stress parameters in postmenopausal women. *Endokrynologia Polska* 2007; 58 (3): 201–206.
20. Jenkins R.R.: Exercise and oxidative stress methodology: a critique. *Am. J. Clin. Nutr.* 2000; 72 (supl.): 670S–674S.
21. Beutler E.: The Glutathione Instability Of Drug Sensitive Red Cells. *J. Lab. Clin. Med.* 1957; 49: 84–95.
22. Whitehead T.P., Worthington B.: The Determination Of Carboxyhemoglobin. *Clin. Chim. Acta* 1961; 6: 356.
23. Thamer C., Machann J., Bachmann O. i wsp.: Intramyocellular lipids: anthropometric determinants and relationships with maximal aerobic capacity and insulin sensitivity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003; 88: 1785–1791.
24. Wasserman K., Hansen J.E., Sue D.Y. i wsp.: Principles of exercise testing and interpretation. Lea & Febiger, Philadelphia 1987; 73.
25. Cazzola R., Russo-Volpe S., Cervato G., Cestaro B.: Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. *Eur. J. Clin. Invest.* 2003; 33 (10): 924–930.
26. Svensson M.B., Ekblom B., Cotgreave I.A. i wsp.: Adaptive stress response of glutathione and uric acid metabolism in man following controlled exercise and diet. *Acta Physiol. Scand.* 2002; 176 (1): 43–56.
27. Banerjee A.K., Mandal A., Chanda D., Chakraborti S.: Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol. Cell. Biochem.* 2003; 253 (1–2): 307–312.
28. Matsushita H., Kurabayashi T., Tomita M. i wsp.: Effects of uncoupling protein 1 and beta3-adrenergic receptor gene polymorphisms on body size and serum lipid concentrations in Japanese women. *Maturitas* 2003; 45: 39–45.
29. Büettner R., Schäffler A., Arndt H. i wsp.: The Trp64Arg polymorphism of the beta 3-adrenergic receptor gene is not associated with obesity or type 2 diabetes mellitus in a large population-based Caucasian cohort. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998; 83: 2892–2897.
30. Shiwaku K., Nogi A., Anuurad E. i wsp.: Difficulty in losing weight by behavioral intervention for women with Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 2003; 27: 1028–1036.
31. Okumura K., Matsui H., Ogawa Y. i wsp.: The polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene is associated with reduced low-density lipoprotein particle size. *Metabolism* 2003; 52: 356–361.
32. Karolkiewicz J., Szcześniak Ł., Kasprzak Z., Nowak A.: Kompleksowe oddziaływanie systematycznej aktywności fizycznej i diety redukcyjnej na wybrane parametry równowagi prooksydacyjno-antyoksydacyjnej otyłych dziewcząt. *Medicina Sportiva* 2002; 6: 209–216.
33. Hubner-Woźniak E., Lutostawska G., Panczenko-Kresowska B., Pośnik J.: Spoczynkowe stężenie nadtlenków lipidowych w osoczu, zredukowanego glutationu i aktywność reduktazy glutationu w krwinkach czerwonych u kobiet i mężczyzn trenujących białon. *Medicina Sportiva* 2000; 4: 257–264.