





# Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle meinen Dank all jenen aussprechen, die mich im Laufe meiner Studienzeit unterstützt und begleitet haben: meiner Familie, meinen Freunden, meinen Studienkollegen und den Lehrenden dieser Universität.

Von den zahlreichen Menschen die an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt waren, möchte ich mich ganz besonders bedanken bei:

A.o.Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner für die Bereitstellung des Themas sowie für die Betreuung dieser Arbeit,

Mag. Oliver Neubauer für die kollegiale und fachliche Unterstützung,

Barbara für die im Labor verbrachten Stunden, für die immerwährende Unterstützung und besonders für ihre Freundschaft,

Gernot für die Hilfe, den Rückhalt und die Geduld während der gesamten Diplomarbeit.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium ermöglicht haben: ein besonderer Dank gilt meiner Mutter die mich während den Jahren meines Studiums in vielerlei Hinsicht unterstützte.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Fragestellung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1	Oxidativer Stress und antioxidative Regulation: Grundlagen . . . . .	3
2.2	Oxidativer Stress und sportliche Aktivität . . . . .	4
2.2.1	Potentielle Entstehungsmechanismen von ROS bei körperlicher Belastung . . . . .	5
2.2.2	ROS-induzierte Schädigungsmechanismen . . . . .	8
2.2.3	Antioxidative Schutzmechanismen der Zelle . . . . .	10
2.2.4	Stand der Forschung . . . . .	12
2.3	Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität . . . . .	14
2.3.1	Reaktionsmechanismen . . . . .	16
2.3.2	ORAC-Assay . . . . .	18
2.3.3	TEAC-Assay . . . . .	23
2.3.4	FRAP-Test . . . . .	25
<b>3</b>	<b>Materialien und Methodik</b>	<b>27</b>
3.1	Studienpopulation . . . . .	27
3.2	Studienprotokoll . . . . .	28
3.3	Prinzip der Messung . . . . .	28
3.4	Material . . . . .	29
3.4.1	Chemikalien . . . . .	29
3.4.2	Proben . . . . .	29
3.4.3	Verwendete Geräte und Einstellungen . . . . .	30
3.5	Methode . . . . .	31
3.5.1	Herstellung der Lösungen . . . . .	31
3.5.2	Allgemeine Durchführung . . . . .	31
3.5.3	Auswertung . . . . .	32
3.6	Statistische Auswertung . . . . .	33

---

<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>35</b>
4.1	Validierung des FRAP-Tests . . . . .	35
4.1.1	Präzision . . . . .	35
4.1.2	Linearität . . . . .	36
4.1.3	Nachweisgrenze . . . . .	37
4.2	Vorversuche zum FRAP-Assay . . . . .	37
4.2.1	Kontrollsubstanzen . . . . .	37
4.2.2	Wellenlänge . . . . .	38
4.2.3	Reaktionskinetik . . . . .	38
4.3	Ergebnisse des FRAP-Assays der Plasmaproben . . . . .	40
4.3.1	FRAP und antioxidativ wirkende Substanzen . . . . .	42
4.3.2	FRAP und leistungsphysiologische Parameter . . . . .	44
4.3.3	FRAP und Marker für oxidativen Stress . . . . .	45
4.4	Vergleich der <i>in vitro</i> Assays FRAP, ORAC und TEAC . . . . .	45
<b>5</b>	<b>Schlussbetrachtung</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>55</b>
<b>A</b>	<b>Ergebnisse des FRAP-Assay</b>	<b>57</b>
<b>B</b>	<b>Einstellungen der Software</b>	<b>59</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>60</b>

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Oxidativer Stress . . . . .	5
2.2	Net area under the curve . . . . .	20
3.1	Zeitplan für die Blutabnahmen . . . . .	28
3.2	Fe(II)-Standardgerade . . . . .	33
3.3	Layout der befüllten 96-Well Mikrotiterplatten . . . . .	34
4.1	Linearität des FRAP-Tests . . . . .	36
4.2	Reaktionskinetik des FRAP-Assays einer Plasmaprobe . . . . .	39
4.3	Änderungen der ferric reducing antioxidant power (FRAP) . . . . .	41
4.4	Korrelation zwischen FRAP und Harnsäure der 42 Triathleten . . . . .	42
4.5	Korrelation zwischen FRAP und Bilirubin der 42 Triathleten . . . . .	43
4.6	Korrelation zwischen FRAP und Malondialdehyd bei den 42 Ironman-Triathleten . . . . .	45
4.7	FRAP, ORAC und TEAC im Vergleich von 42 Triathleten . . . . .	47
4.8	Korrelation zwischen FRAP und ORAC bei 42 Triathleten . . . . .	48



# Tabellenverzeichnis

2.1	Reaktive Sauerstoffspezies . . . . .	6
2.2	Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität . . . . .	19
3.1	Charakterisierung und trainingsphysiologische Parameter der Studienpopulation . . . . .	27
3.2	Grundeinstellungen an der FLUOstar Optima Software . . . . .	30
3.3	Pipettierschema adaptiert an 96-Well Mikroplatten . . . . .	32
4.1	Reproduzierbarkeit des FRAP-Tests . . . . .	35
4.2	p-Werte der verschiedenen Messzeitpunkte. . . . .	40
4.3	Signifikante Assoziationen zwischen FRAP und leistungsphysiologischen Parametern . . . . .	44
4.4	Beitrag von Plasmaantioxidantien an die antioxidative Kapazität . . .	46
A.1	FRAP Werte des Studienkollektivs in $\mu\text{mol/L}$ . . . . .	57
B.1	Einstellungen an der FLUOstar OPTIMA Software Version 1.20-0 . .	59



# Abkürzungsverzeichnis

$\Delta A$ .....	Absorptionsänderung
$\bar{x}$ .....	Mittelwert
$\beta$ -PE .....	$\beta$ -Phycoerythrin
%A .....	prozentuale Absorptionsabnahme
%CV .....	Variationskoeffizient
$^1O_2$ .....	Singulett-Sauerstoff
ABTS <sup>•+</sup> .....	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)
AH .....	Antioxidans
DPPH <sup>•</sup> .....	diphenylpicrylhydrazyl radical scavenging capacity
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Hydrogenperoxid
L <sup>•</sup> .....	Lipidradikal
LOO <sup>•</sup> .....	Lipidperoxyradikal
LOOH .....	Lipidhydroperoxid
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .....	Superoxidanionradikal
OH <sub>2</sub> <sup>•</sup> .....	Hydroperoxyradikal
OH <sup>•</sup> .....	Hydroxylradikal
P <sup>•</sup> .....	Substratradikal
PH .....	Substrat
R <sup>•</sup> .....	Radikal
ROO <sup>•</sup> .....	Peroxyradikal
ROOH .....	Lipidperoxid
A .....	Absorption
ADP .....	Adenosindiphosphat
AMP .....	Adenosinmonophosphat
AMVN .....	2,2'-Azobis-2,4-dimethylvaleronitril
AOPP .....	advanced oxidation protein products

APPH	2,2'-Azobis-(2-amidinopropan) dihydrochlorid
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve
B	blanc
BMI	body mass index
C	control
CAT	Katalase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
em	emission
ex	excitation
FRAP	ferric reducing ability of plasma
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid, oxidiertes Glutathion
HAT	hydrogen-atom-transfer
IAT	individual anaerobic threshold
LDL	low density lipoprotein
LH	Lipid
LT	lactate threshold
MDA	Malondialdehyd
n.s.	nicht signifikant
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
ORAC	oxygen radical antioxidant capacity
p	Signifikanzniveau
PO	power output
PUFAs	poly unsaturated fatty acids
r	Korrelationskoeffizient
RDA	recommended daily allowance
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
S	standard
SD	Standardabweichung

---

SET	.....	single-electron-transfer
SOD	.....	Superoxiddismutase
TBF	.....	total body fat
TEAC	.....	trolox equivalent antioxidant capacity
TOSC	.....	total antioxidant scavenging capacity
TPTZ	.....	2,4,6-Tripyridyl-s-triazin
TRAP	.....	total peroxy radical trapping antioxidant parameter
TÄ	.....	Troloxäquivalente
X	.....	samples



# 1 Einleitung und Fragestellung

Die antioxidative Kapazität beschreibt die Fähigkeit verschiedener Substanzen Substrate vor oxidativem Angriff zu schützen. Es gibt zahlreiche Methoden, um die Aktivität dieser antioxidativen Substanzen in Lebensmittelextrakten, Reinsubstanzen oder im Plasma zu messen. Die gesamte antioxidative Kapazität kann dabei biologisch wichtige Informationen liefern, die über die Messung einzelner Antioxidantien hinaus fehlt. Wird die Gesamtkapazität gemessen, kann mit relativ geringem Aufwand ein allgemeines Bild des Antioxidantienstatus geliefert werden. Eine weit verbreitete und einfache Methode zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität ist der FRAP- (engl.: *ferric reducing ability of plasma*) Assay. Dieser Test bestimmt die antioxidative Aktivität von Verbindungen im Hinblick auf ihre eisenreduzierende Fähigkeit.

Mit Hilfe des FRAP-Assays wurde in vorliegender Diplomarbeit die Änderung der antioxidativen Kapazität im Plasma von Ausdauersportlern (nach einem Ultraausdauerwettkampf) beurteilt.

Regelmäßiger körperlicher Aktivität wird allgemein eine gesundheitsfördernde Wirkung zugeschrieben, wobei die Prävention chronischer Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Eine sehr intensive körperliche Betätigung kann jedoch zu einer Überbelastung des Organismus führen. Sie ist mit einer vermehrten Bildung freier Radikale und der Gefahr von oxidativem Stress (Ungleichgewicht zwischen Radikalbildung und Radikalneutralisierung) verbunden. Aufgrund ihrer hohen Reaktivität können freie Radikale biologische Strukturen wie etwa Lipide, Proteine und Nukleinsäuren schädigen. In weiterer Folge sind sie an der Pathogenese verschiedener chronischer Erkrankungen wie etwa Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen beteiligt. Es stellt sich also die Frage, ob sich Ausdauersportler durch die hohe Exposition gegenüber oxidativem Stress einem erhöhten Gesundheitsrisiko aussetzen.

Freie Radikale schädigen allerdings nicht grundsätzlich, sondern nur dann, wenn ihre Wirkung nicht neutralisiert werden kann und oxidativer Stress entsteht. Verschiedene Studien zeigten, dass regelmäßiges Training über eine Stärkung antioxidativer

Schutzsysteme zu einer Toleranzentwicklung gegenüber oxidativem Stress führen kann. Die Bedeutung freier Radikale in Zusammenhang mit körperlicher Belastung sowie die Bestimmung antioxidativer Schutzsysteme ist aufgrund kontroverser Ergebnisse von großem Interesse.

Die vorliegende Arbeit entstand ausgehend von der Problemstellung der Anwendbarkeit des FRAP-Assays auf einen 96-Well Mikroplatten Reader. Mit der Methode sollte weiters die antioxidative Kapazität im Plasma von Ironman-Triathleten gemessen werden. Über die rein praktische Umsetzung dieses Vorhabens hinaus, sollte eine Evaluierung der Ergebnisse vor allem folgende Fragen beantworten:

- Wie reproduzierbar sind die durch den modifizierten FRAP-Assay gelieferten Daten?
- Welche Vorteile ergeben sich durch die Anpassung an 96-Well Mikrotiterplatten?
- Wie wirkt sich ein Ironman-Triathlon auf die antioxidative Kapazität vom Plasma aus?
- Welche Rolle spielen einzelne Antioxidantien, Marker für oxidativen Stress sowie leistungsphysiologische Parameter für die antioxidative Kapazität am untersuchten Studienkollektiv?

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Oxidativer Stress und antioxidative Regulation: Grundlagen

Freie Radikale sind Atome oder Molekülfragmente, die mindestens ein hochreaktives ungepaartes Elektron in ihrem äußersten Orbital besitzen. Aufgrund dieses ungünstigen energetischen Zustandes sind freie Radikale bestrebt, durch Elektronenentzug einen stabilen Zustand zu erreichen. Dadurch können Radikale zur Schädigung biologischer Strukturen führen und oxidative Veränderungen an Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren verursachen. Sie sind aus diesem Grund an der Pathogenese verschiedener chronischer Erkrankungen wie Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen sowie an der Entstehung von Alterungsprozessen beteiligt (Vina et al., 2000).

Die Bildung freier Sauerstoffradikale sowie reaktiver Stickstoffspezies (RNS, engl.: *Reactive Nitrogen Species*) als Folge metabolischer Prozesse ist allgemein bekannt (Urso & Clarkson, 2003). Die wichtigsten Sauerstoffradikale sind das Superoxidation-Radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) und das Hydroxylradikal ( $OH^{\cdot}$ ). Gemeinsam mit reaktiven Sauerstoffverbindungen wie Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ ) oder dem Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) werden sie als *Reactive Oxygen Species* (ROS) bezeichnet. Der wichtigste biochemische Prozess für die Bildung von ROS ist die mitochondriale Atmungskette. Weiters können ROS bei verschiedenen anderen physiologischen Reaktionen entstehen, z.B. bei der Pathogenabwehr von Bakterien und Viren durch neutrophile Granulozyten, bei der Aktivierung von Cytochrom P<sub>450</sub> oder bei der Autooxidation von Katecholaminen (Ji, 1999).

ROS sind aber nicht ausschließlich toxische Produkte des Stoffwechsels. In verschiedenen Stoffwechselprozessen übernehmen sie eine wichtige regulierende Funktion; so sind sie etwa an der Regulation des Gefäßtonus sowie bei der Signalübertragung an verschiedenen Membranrezeptoren beteiligt (Dröge, 2002; Somogyi et al., 2007). Außerdem spielen ROS in der Immunabwehr eine wichtige Rolle. Dabei kommt es

durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in den Leukozyten zur Antigenzerstörung (Koenig et al., 2001; Finaud et al., 2006).

ROS schädigen den Organismus folglich nicht grundsätzlich, sondern nur dann, wenn ihre Wirkung nicht durch antioxidative Mechanismen kompensiert wird und es zu einem Anstieg freier Radikale kommt. Dieser Vorgang wird als oxidativer Stress bezeichnet und beschreibt das gestörte Gleichgewicht zwischen Radikalbildung und Radikalneutralisation (siehe Abbildung 2.1) (Powers et al., 2004).

Um der Entstehung von oxidativem Stress entgegenzuwirken, verfügt der Organismus über verschiedene Mechanismen. Diese sind häufig miteinander gekoppelt und bilden durch ihre Wechselwirkung ein effektives antioxidatives Netzwerk (z. B. die Regenerierung von Vitamin E durch Vitamin C). Als Teil dieses Schutzsystems fungieren einerseits exogen aufgenommene Vitamine wie etwa Vitamin E,  $\beta$ -Carotin und Vitamin C, Flavonoide und Polyphenole. Andererseits verfügt der Körper auch über endogene Antioxidantien wie beispielsweise Harnsäure, Glutathion und Ubiquinone. Zusätzlich sind diverse Enzyme in das antioxidative System eingebunden. Superoxiddismutase (SOD), Katalase (CAT) sowie Glutathionperoxidase (GPX) sind wichtige Proteine in der Abwehr von freien Radikalen.

Antioxidativ wirkende Substanzen können die schädigende Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verhindern bzw. minimieren. Dabei schützen sie das Gewebe vor Oxidation, indem sie selbst oxidiert werden. Zudem unterstützen sie die Resistenz von biologischen Molekülen gegenüber ROS und fördern die Reparatur radikalinduzierter Schäden (Koenig et al., 2001).

## 2.2 Oxidativer Stress und sportliche Aktivität

Kardiovaskuläre Erkrankungen, Typ 2 Diabetes, metabolisches Syndrom und Tumorerkrankungen stellen in den Industrieländern ein wachsendes Problem dar und werden zu einer zunehmenden Herausforderung für das Gesundheitssystem. Bewegungsmangel gilt neben Fehlernährung, Nikotin- und Alkoholmissbrauch als gesicherter Risikofaktor für die Pathogenese chronischer Krankheiten (Roberts & Barnard, 2005).

Demgegenüber zeichnet sich eine regelmäßige körperliche Aktivität durch einen gesundheitsfördernden Effekt aus, wobei die Prävention und die Therapie chronischer

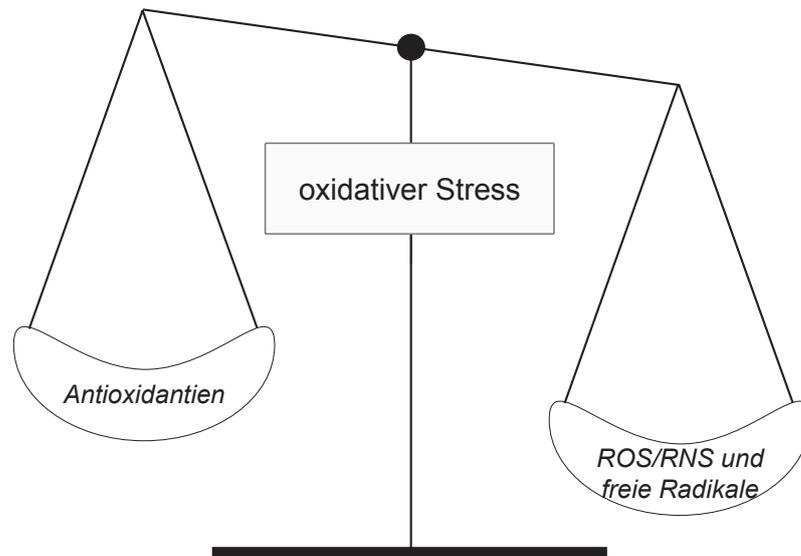


Abbildung 2.1: Oxidativer Stress ergibt sich aus dem Ungleichgewicht zwischen ROS/RNS und Antioxidantien.

Erkrankungen oft im Vordergrund stehen (Pedersen & Saltin, 2006). Eine Verminderung des Risikos für Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie ein positiver Effekt auf die Lebenserwartung konnte in verschiedenen Studien dokumentiert werden (Kujala et al., 2003; Sarna & Kaprio, 1994). Die Verbesserung der körpereigenen Abwehr gegenüber freien Radikalen wird unter anderem für den protektiven Effekt verantwortlich gemacht (Bloch & Schmidt, 2004).

Langandauernde intensive physische Belastungen hingegen konnten mit der Entstehung von oxidativem Stress im Skelettmuskel sowie in anderen Geweben in Zusammenhang gebracht werden. Verschiedene Autoren (Ji, 1999; Knez et al., 2006) gehen daher von einer Erhöhung des Risikos für die Entstehung koronarer Erkrankungen aus.

Es herrscht daher nach wie vor Unklarheit über den Einfluss von intensiver Belastung auf das antioxidative Abwehrsystem und die Entstehung von oxidativem Stress.

### 2.2.1 Potentielle Entstehungsmechanismen von ROS bei körperlicher Belastung

Koenig et al. (2001) nennen verschiedene Sauerstoffradikalquellen, die im Zusammenhang mit physischer Belastung eine Rolle spielen. Dauer, Intensität sowie Art

der körperlichen Aktivität sind dabei essentiell. Bekannte Entstehungsmechanismen von ROS bei körperlicher Belastung umfassen (1) die mitochondriale Atmungskette, (2) die Xanthinoxidase-Reaktion sowie die (3) Generierungskaskade von freien Radikalen in den Zellen des Immunsystems.

Tabelle 2.1: Reaktive Sauerstoffspezies (Clarkson & Thomson, 2000)

ROS	Bildung	Eigenschaften
Superoxidion	$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{\cdot-}$	Induziert die Bildung von ROS ( $OH_2^{\cdot}$ )
Hydroperoxyradikal	$O_2^{\cdot-} + H_2O \longrightarrow HO_2^{\cdot} + OH^-$	
Hydrogenperoxid	$HO_2^{\cdot} + e^- + H \longrightarrow H_2O_2$	Kein Radikal, aber wichtiges Oxidationsmittel; Vorstufe für die Bildung von $OH^{\cdot}$
Hydroxylradikal	$H_2O_2 + e^- \longrightarrow OH^{\cdot} + OH^-$	Starkes Oxidationsmittel in biologischen Systemen; induziert die Lipidperoxidation

**Die mitochondriale Elektronentransportkette:** Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in der mitochondrialen Atmungskette ist sowohl unter physiologischen Bedingungen sowie bei körperlicher Belastung dokumentiert (Ji, 1999). Es wird angenommen, dass etwa 2-5 % des aufgenommenen Sauerstoffs in den Mitochondrien nicht zu Wasser reduziert werden, sondern durch Elektronentransfer zu Superoxidradikale und schließlich zu Hydrogenperoxide umgewandelt werden (Bloch & Schmidt, 2004; Koenig et al., 2001). Hydrogenperoxide sind grundsätzlich keine freien Radikale, sie sind aber in der Lage, hoch reaktive Hydroxylradikale in einer Fe-katalysierten Reaktion zu bilden (siehe Tabelle 2.1). Intensive physische Beanspruchung ist mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch verbunden. Die Sauerstoffaufnahme des Organismus kann dabei um das 20-fache, die des Skelettmuskels um das 100-fache erhöht sein (gegenüber dem Ruhezustand). Dass unter diesen Bedingungen verstärkt ROS gebildet werden, ist naheliegend. Die belastungsinduzierte Zunahme der mitochondrialen Radikalproduktion konnte jedoch weder in Humanstudien noch unter physiologischen Bedingungen bestätigt werden (Bloch & Schmidt, 2004; Ji, 1999).

**Xanthinoxidase:** Die Bildung freier Radikale bei intensiver körperlicher Belastung kann zudem durch das Enzym Xanthinoxidase induziert werden. Durch die erhöhte

Muskelaktivität kann Sauerstoffmangel (Ischämie) an verschiedenen Geweben auftreten. Die Folge der Ischämie ist ein Erliegen der ATP-Synthese, da der mitochondrialen Atmungskette  $O_2$  für die ATP-Bildung fehlt. Setzt in der Regenerationsphase die Sauerstoffversorgung (Reperfusion) wieder ein, kommt es zur Freisetzung freier Radikale (Packer, 1997). Die Ursache hierfür liegt in einem verstärkten ATP-Abbau, welcher über AMP zur Bildung von Hypoxanthin führt. Weiters wird unter diesen Bedingungen die Xanthindehydrogenase in eine Oxidase umgewandelt. Unter normalen physiologischen Bedingungen katalysiert die Xanthinhydrogenase die Reaktion von Hypoxanthin zu Harnsäure und nutzt dabei NADH als Elektronenakzeptor (Knez et al., 2006). Die Xanthinoxidase hingegen metabolisiert das Hypoxanthin über Elektronentransfer auf  $O_2$ .  $H_2O_2$  und  $O_2^{\cdot -}$  werden gebildet (Sachdev & Davies, 2008; Koenig et al., 2001).

**Inflammatorische Prozesse:** Durch physische Belastung induzierte Muskelschäden können verschiedene Zellen des Immunsystems (neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) aktiviert werden, welche in der Lage sind ROS zu bilden. Eine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten kann zu einer Bildung von  $O_2^{\cdot -}$  führen, wobei diese sogenannte *oxidative burst reaction* von der NADPH-Oxidase katalysiert wird. Außerdem können neutrophile Granulozyten in Anwesenheit von Chloridionen und  $H_2O_2$  das starke Oxidationsmittel Hypochlorsäure bilden (Koenig et al., 2001). Diese Entzündungsreaktion dient der Abwehr von Krankheitserregern, welche durch die Bildung dieser ROS neutralisiert werden (Knez et al., 2006). Gleichzeitig kann durch die *oxidative burst reaction* und die Bildung von hypochloriger Säure körpereigenes Gewebe geschädigt werden. Inflammatorische Prozesse können somit zu Lipidperoxidation und einem anschließenden Integrationsverlust der Muskelzelle führen (Ji, 1999).

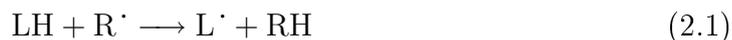
**Weitere Mechanismen zur Generierung von ROS:** Weitere Mechanismen, die zur Bildung freier Radikale bei physischer Belastung führen, sind bisher nur vereinzelt untersucht worden (Bloch & Schmidt, 2004). Koenig et al. (2001) beschreiben den Katecholaminmetabolismus als Quelle für freie Radikale. Bei dieser Reaktion führt körperliche Belastung zu einer verstärkten Katecholaminausschüttung aus dem Sympathikus. Die Autooxidation dieser Katecholamine führt zur Bildung von  $O_2^{\cdot -}$ . Außerdem werden durch Oxidation weitere freie Radikale freigesetzt (Koenig et al., 2001). Eine weitere ROS Quelle ist freies Eisen, welches bei körperlicher Belastung einerseits durch die Xanthinoxidase andererseits durch den vermehrten Abbau von Erythrozyten mobilisiert wird. Unter Anwesenheit von freiem Eisen kann in einer

Haber-Weiss Reaktion  $O_2^{\cdot -}$  zu hochreaktivem  $OH^{\cdot}$  umgewandelt werden (Knez et al., 2006). Weitere Mechanismen zur Generierung von ROS sind unter anderem das Cytochrom  $P_{450}$ -System (Ji, 1999) sowie die Autooxidation von Oxohämoglobin und Oxomyoglobin (Cooper et al., 2002).

### 2.2.2 ROS-induzierte Schädigungsmechanismen

Wie bereits in Abschnitt 2.1 erwähnt, besitzen freie Radikale ein ungepaartes Elektron und infolgedessen eine hohe Reaktivität. Sie sind in der Lage, unmittelbar mit Membranlipiden, Proteinen und Nukleinsäuren zu reagieren, die Integrität dieser Moleküle zu schädigen und dadurch die Pathogenese verschiedener Erkrankungen zu fördern. Die wichtigsten Schädigungsmechanismen werden im Folgenden aufgezählt und kurz beschrieben.

**Lipidperoxidation** Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*poly unsaturated fatty acids*; *PUFAs*) können durch ihre ausgeprägte Anzahl an Doppelbindungen mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reagieren. Dieser Prozess wird als Lipidperoxidation bezeichnet. In Anwesenheit von ROS wird einer Methylengruppe ( $-CH_2$ ) der PUFAs ein Wasserstoffatom entzogen, das Produkt ist ein hochreaktives Lipidradikal ( $L^{\cdot}$ ).



Durch die Anlagerung von  $O_2$  kommt es zur Bildung eines hochreaktiven Lipidperoxyradikal ( $LOO^{\cdot}$ ). Dieses initiiert eine autokatalytische Radikalkettenreaktion, in deren Folge weitere ungesättigte Fettsäuren oxidiert werden können (Antolovich et al., 2002).



Durch ihren hohen Anteil an PUFAs sind vor allem Membranen von diesen oxidativen Schäden betroffen. Eine Lipidperoxidation verursacht somit eine Abnahme der Fluidität und Semipermeabilität von Zellmembranen und führt letztendlich zu einem

vollständigen Verlust der Barrierefunktion. Finaud et al. (2006) nennen die Lipidperoxidation als wichtigen Risikofaktor für die Entstehung von Arteriosklerose. Oxidative Veränderungen betreffen in diesem Zusammenhang vor allem LDL-Partikel in der Intima der Arterie. Gesteigerte Lipidperoxidationen konnten außerdem in mehreren Studien in Verbindung mit einer intensiven körperlichen Belastung beobachtet werden. Hinweise auf einen Zusammenhang mit physischer Belastung geben verschiedene Lipidperoxidationsprodukte wie etwa Malondialdehyd oder Thiobarbitursäure (Sen, 2001; Packer, 1997).

**Proteinoxidation** Ebenso wie Lipide können auch Proteine durch ROS oxidiert und in ihrer Funktion beeinträchtigt werden. Als Folge des oxidativen Angriffs treten Proteinfragmentierungen sowie Verlust von Aminosäuren auf. Diese Schädigungsmechanismen betreffen sowohl strukturelle Proteine als auch Enzyme. Eine oxidative Modifikation der Proteine kann letztendlich eine Veränderung von Zellrezeptoren verursachen. Darüber hinaus können weitere regulatorische Prozesse der Zellen wie etwa die Signalübertragung beeinträchtigt werden (Sen, 2001). Proteincarbonylgruppen, welche durch Oxidationsreaktionen an Proteinen bzw. Aminosäuren vermehrt auftreten, sind anerkannte Marker für die Proteinoxidation (Finaud et al., 2006; Packer, 1997). Eine Proteinschädigung kann außerdem mit Hilfe von AOPP (engl.: *Advanced Oxidation Protein Products*) sowie NO (Stickstoffmonoxid) detektiert werden (Neubauer et al., 2008).

**Nukleinsäureoxidation** Es gibt Hinweise, dass durch körperliche Belastung oxidative Modifikationen an Nukleinsäuren hervorgerufen werden. Freie Sauerstoffradikale (ROS) sind in der Lage DNA-Strangbrüche zu induzieren. Obwohl zelluläre DNA-Reparaturmechanismen vorliegen, kann deren Kapazität durch ROS beeinträchtigt werden. Oxidative DNA-Schäden werden als mögliche Ursache der Tumorentstehung sowie für Zellalterungsprozesse diskutiert (Finaud et al., 2006). Ein wichtiger Marker für Nukleinsäureoxidation ist das 8-Hydroxy-Guanosin im Urin (Sen, 2001; Packer, 1997).

Die genannten durch freie Radikale induzierten Schädigungen können durch antioxidative Schutzmechanismen des Organismus kompensiert werden. Der Entstehung von oxidativem Stress kann somit entgegen gewirkt werden (Koenig et al., 2001).

### 2.2.3 Antioxidative Schutzmechanismen der Zelle

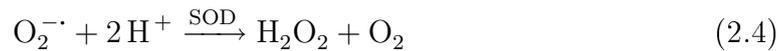
Die Zelle verfügt über verschiedene Möglichkeiten freie Radikale abzufangen und dessen Wirkung zu neutralisieren. Gemeinsam mit der Generierung freier Radikale bestimmt diese antioxidative Kapazität der Zelle das Ausmaß von oxidativem Stress (Ji, 1999).

Antioxidantien sind Substanzen, welche die Eigenschaft besitzen, Substrate vor Oxidation zu schützen. Reaktive Spezies können mit antioxidativ wirkenden Substanzen reagieren, wobei sie reduziert werden und nicht mehr für die Oxidation des Substrats zur Verfügung stehen. Weiters gibt es Antioxidantien, die in der Lage sind als sogenannte Quencher zu wirken (z. B.  $\beta$ -Carotin ist in der Lage Singulett-Sauerstoff abzufangen). Antioxidativ wirkende Stoffe lassen sich in *enzymatische Antioxidantien* und *nicht enzymatische Antioxidantien* unterteilen. Die nicht enzymatischen Antioxidantien werden wiederum in *exogene Vitamine* und *endogene Antioxidantien (mit geringem Molekulargewicht)* eingeteilt. Allen gemeinsam ist eine postulierte protektive Wirkung: Sie verhindern die Bildung bzw. Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies, sie unterstützen die Resistenz biologischer Moleküle gegenüber ROS und beseitigen radikalinduzierte Schäden (Koenig et al., 2001). Hohe Dosierungen von Antioxidantien in Form von Supplementen können jedoch auch negative Auswirkungen zeigen. Ein Antioxidans kann in diesem Fall zum Prooxidans werden (Knez et al., 2007).

**Nicht enzymatische Antioxidantien** Antioxidativ wirkende Vitamine wie etwa  $\alpha$ -Tocopherol, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Carotin müssen dem menschlichen Organismus über die Nahrung zugeführt werden (Ji, 1999). Tocopherole weisen in der Lipidphase eine hohe antioxidative Wirkung auf. Sie wirken als gute Radikalfänger für Peroxylradikale (Knez et al., 2006), welche vor allem in der mitochondrialen Membran generiert werden. Die Übertragung eines H-Atoms von Tocopherol auf das Radikal führt zur Bildung eines stabilen Lipidhydroperoxid. Durch diesen Vorgang kann die Radikalkettenreaktion abgebrochen werden (siehe Lipidperoxidation, Abschnitt 2.2.2). Tocopherole sind deshalb, wie sich in Tierversuchen zeigte, für die Zellfunktion während körperlicher Belastung von essentieller Bedeutung (Ji, 1999). Durch ihre wasserlösliche Eigenschaft wirkt Ascorbinsäure als Radikalfänger vor allem im Zytosol und in extrazellulären Flüssigkeiten. Sie kann aufgrund ihrer chemischen Struktur mit  $O_2^{\cdot -}$  und  $OH^{\cdot}$  im Plasma reagieren und Erythrozyten vor oxidativen Schäden schützen. Außerdem ist Ascorbinsäure in der Lage Tocopherolradikale zu regenerieren (Ji, 1999). Die nicht enzymatischen Antioxidantien umfassen neben den

Vitaminen auch sekundäre Pflanzenschutzstoffe (z. B. Polyphenole) sowie endogene niedermolekulare Substanzen (z. B. Billirubin, Harnsäure oder Glutathion). So wird beispielsweise in verschiedenen Quellen ein protektiver Effekt von reduziertem Glutathion (GSH) gegenüber oxidativem Stress beschrieben (Ji, 1999; Finaud et al., 2006; Sen, 2001). GSH kann als Substrat für die Glutathion-Peroxidase (siehe Reaktionsgleichung 2.6) fungieren, wobei  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduziert wird (Sachdev & Davies, 2008). Außerdem kann es als Radikalfänger mit reaktiven Sauerstoffverbindungen wie etwa  $\text{OH}^\cdot$  und Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) direkt reagieren. Als starkes Reduktionsmittel besitzt Glutathion zudem die Fähigkeit Tocopherolradikale und Semihydroascorbinsäuren zu reduzieren (Powers et al., 2004) und folglich die Zelle vor Lipidperoxidation zu schützen (Ji, 1999). Eine weitere wichtige Substanz in diesem Zusammenhang ist die Harnsäure. Bei körperlicher Belastung kommt es zu einem verstärkten ATP-Verbrauch der Muskulatur. ATP wird zu AMP und über Hypoxanthin weiter zu Harnsäure abgebaut (vgl. mit Abschnitt 2.2.1, Hypoxanthinoxidase). Sie kann demnach als Folge eines gesteigerten Purinmetabolismus gebildet werden. Harnsäure ist eines der wichtigsten Antioxidantien im Plasma sowie im Muskel. Sie ist in der Lage in das Muskelgewebe zu diffundieren und es vor Oxidation zu schützen. Außerdem besitzt sie die Fähigkeit freies Eisen zu binden und dadurch Vitamin C und Vitamin E sowie Lipide vor Oxidation zu schützen. Auch dem Bilirubin, wird eine Bedeutung als antioxidativ wirksame Substanz in Körperflüssigkeiten zugeschrieben. Es ist in der Lage die Lipidperoxidation zu hemmen, indem es Elektronen auf freie Radikale überträgt (Finaud et al., 2006).

**Enzymatische Antioxidantien** Es konnte gezeigt werden, dass bei akuter körperlicher Belastung die Aktivität antioxidativ wirkender Enzyme stark zunimmt (Ji, 1999). Diese belastungsinduzierte Anpassung beschränkt sich nicht nur auf die Aktivitätszunahme enzymatischer Antioxidantien, vielmehr kann sie zu einer erhöhten genetischen Expression der Enzyme führen. Sportphysiologische Untersuchungen belegen eine Verstärkung dieses Effekts durch regelmäßiges Ausdauertraining (Bloch & Schmidt, 2004). Andererseits konnten Knez et al. (2007) bzw. Neubauer et al. (2008) zeigen, dass eine langandauernde Belastung auch eine Abnahme der Aktivität antioxidativer Enzyme (Inaktivierung durch zu „viel“ oxidativen Stress) induzieren kann. Wichtige Enzyme in diesem Kontext sind die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase (CAT) und die Glutathionperoxidase (GPX). Die Aktivitätszunahme der SOD bei intensiver körperlicher Belastung stellt einen wichtigen Abwehrmechanismus gegenüber einer erhöhten Produktion von  $\text{O}_2^{\cdot-}$  dar (Urso & Clarkson, 2003). Diese Reaktion konnte in verschiedenen Geweben beobachtet werden (Ji, 1999).

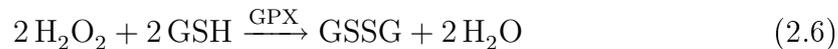


Im Organismus liegen zwei verschiedene Isoformen der SOD vor, die Mn-haltige Superoxiddismutase in den Mitochondrien und die Cu/Zn-haltige Superoxiddismutase im Zytosol (Finaud et al., 2006).

Eine Aktivitätszunahme bei intensiver körperlicher Belastung wurde ebenso bei der Glutathionperoxidase sowie bei der Katalase diskutiert, obwohl Untersuchungen zu diesem Effekt bisher keine eindeutigen Ergebnisse lieferten (Ji, 1999). Die Katalase katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff und ist vor allem in den Peroxisomen lokalisiert.



Die Glutathionperoxidase reduziert ebenfalls  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$ . Reduziertes Glutathion (GSH) dient als Elektronenakzeptor und wird in oxidiertes Glutathion (GSSG) übergeführt (Finaud et al., 2006).



Eine erhöhte Affinität von Hydrogenperoxid zur Glutathionperoxidase begünstigt diese Reaktion im Vergleich zu Reaktion 2.5 (Powers et al., 1999).

## 2.2.4 Stand der Forschung

Obwohl es eine Vielzahl von Studien über den Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Ausdauersport gibt, kann die Frage nach deren Wechselwirkung noch nicht eindeutig beantwortet werden. Verschiedene Autoren konnten nach intensiver Ausdauerbelastung Anzeichen eines umgehenden Anstiegs von oxidativem Stress nachweisen. In den Arbeiten von Mastaloudis et al. (2004) bzw. Knez et al. (2007) wurden bei Teilnehmern eines Ultramarathons bzw. Ironman-Triathlons Produkte der Lipidperoxidation wie etwa Malondialdehyd sowie  $\text{F}_2$ -Isoprostan als Marker für oxidative Schäden untersucht. Im Gegensatz dazu konnten Margaritis et al. (1997) keine Zunahme von oxidativem Stress bei Athleten nach einem Langdistanz-Triathlon beobachten.

Neben der Frage nach einem prinzipiellen Zusammenhang zwischen körperlicher Belastung und oxidativem Stress, ergeben sich im sportphysiologischen Kontext weitere Forschungsfragen. So werden in der Literatur Adaptierungsmechanismen an oxidativem Stress durch Training oder die Wirkung einer Supplementierung von Antioxidantien kontrovers diskutiert.

Untersuchungen von Liu et al. (1999) und Skenderi et al. (2008) belegen, dass körperliches Training eine Adaptierung endogener antioxidativer Schutzsysteme fördert und somit zu einer erhöhten Toleranz gegenüber freien Radikalen führt. Eine quantitative Zunahme von enzymatischen Antioxidantien im Organismus konnte daher nachgewiesen werden, obwohl die genauen Anpassungsprozesse sowie die Effizienz dieser Schutzsysteme bis heute nicht vollständig geklärt sind.

Eine Konzentrationsanstieg nicht enzymatischer Antioxidantien wie etwa Vitamin C, Vitamin E oder Harnsäure im Plasma konnte ebenfalls beobachtet werden. Eine erhöhte Zufuhr während der Belastung und die Mobilisierung aus körpereigenen Speichern sowie der Purinmetabolismus sind mögliche Erklärungen für diesen Anstieg (Mastaloudis et al., 2004; Finaud et al., 2006).

Der positive Effekt exogener Antioxidantien bei einer erhöhten Bildung freier Radikale legt eine Supplementierung bei körperlicher Belastung nahe. Studien bewerteten die zusätzliche Gabe von Antioxidantien jedoch unterschiedlich: Mastaloudis et al. (2004) weisen positive Auswirkungen der Supplementierung (1000 mg/d Ascorbinsäure und 300 mg/d RRR- $\alpha$ -Tocopherylacetat über einen Zeitraum von 6 Wochen) nach; während Nieman et al. (2002) keine Auswirkungen (1500 mg/d Ascorbinsäure für 7 Tage) und Knez et al. (2007) aufgrund prooxidativer Effekte negative Auswirkungen der Supplementierung ( $558 \pm 350$  mg/d Vitamin C für  $0,8 \pm 0,6$  Jahre und  $702 \pm 756$  mg/d Vitamin E für  $1,6 \pm 0,8$  Jahre) bei Ironman Athleten beschreiben. Eine langfristige Supplementierung hoher Dosen an Antioxidantien kann nach dem gegenwärtigen Wissensstand nicht empfohlen werden. Kontraproduktive Effekte sowie gesundheitliche Risiken sind nicht auszuschließen (Nieß et al., 2008).

Widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf oxidativem Stress und Ausdauerbelastung sind vor allem auf methodische Unterschiede zurückzuführen. So finden sich in der Literatur eine Vielzahl unterschiedlicher Methoden zur Erfassung des oxidativen Stresses, Unterschiede im Studiendesign (Jenkins, 2000; Koenig et al., 2001) sowie Unterschiede in Dauer, Belastungsintensität und Art der sportlichen Aktivität (Knez et al., 2006; Finaud et al., 2006). Um den Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und Ausdauerbelastung sowie den Einfluss von Training auf den Schutz vor freien Radikalen erklären zu können, bedarf es noch weiterer Untersuchungen.

Gleichzeitig unterstreichen schlechte Vergleichbarkeit und methodische Unterschiede einzelner Studien die Notwendigkeit eines einheitlichen Verfahrens zur Bestimmung von oxidativem Stress bzw. Antioxidantienstatus.

## 2.3 Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität

Oxidativer Stress, Antioxidantienstatus sowie die belastungsinduzierte Schädigung von Biomolekülen können durch verschiedene Testmethoden bestimmt werden (Packer, 1997; Finaud et al., 2006). Ansatzmöglichkeiten sind

- die direkte Messung freier Radikale über Elektron-Spin-Resonanz,
- die Messung von oxidativen Schäden an Lipiden, Proteinen und DNA,
- die Bestimmung des Status einzelner Antioxidantien,
- die Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität.

Die antioxidative Kapazität bezeichnet die Fähigkeit verschiedener Substanzen Substrate vor oxidativem Angriff zu schützen. Wird die Gesamtkapazität an Antioxidantien gemessen, kann mit relativ geringem Aufwand ein allgemeines Bild des Antioxidantienstatus geliefert werden.

Antioxidantien in der Zelle, Zellmembran und der extrazellulären Flüssigkeit können mobilisiert werden, um die Reaktivität von ROS zu neutralisieren. Blut spielt in diesem Zusammenhang als Transportmedium eine zentrale Rolle (Ghiselli et al., 2000). Antioxidativ wirkende Stoffe sind im Blutplasma suspendiert und können dadurch mit relativ geringem Aufwand bestimmt werden. Der Antioxidantienstatus im Plasma resultiert aus der Interaktion verschiedener antioxidativer Schutzmechanismen. Wie bereits in Abschnitt 2.2.3 beschrieben, unterstützt beispielsweise Ascorbinsäure die Regenerierung von  $\alpha$ -Tocopherol. Ein weiteres Beispiel ist die Rückgewinnung von oxidiertem Ascorbinsäure durch Glutathion. Durch die Isolierung und individuelle Analyse einzelner Antioxidantien kann solchen Interaktionen nicht Rechnung getragen werden. Außerdem erweist sich die Analyse isolierter Antioxidantien als arbeits- und kostenintensiv, weshalb sich die meisten Studien auf eine enge Auswahl studienrelevanter Substanzen beschränken (Prior & Cao, 1999; Llesuy et al., 2001). Die Quantifizierung der Gesamtaktivität aller Antioxidantien im Plasma erscheint

dem gegenüber vorteilhaft. Diese antioxidative Gesamtkapazität gibt ein allgemeines Bild über die Fähigkeit des Organismus Radikale abzufangen (Antolovich et al., 2002). Wechselwirkungen zwischen Radikalfängern werden durch die antioxidative Gesamtkapazität berücksichtigt.

Das grundlegende Prinzip der antioxidativen Kapazität ist die Bestimmung der Oxidationsresistenz einer Probe unter Einfluss einer radikalgenerierenden Substanz. Es gibt eine Vielzahl etablierter Methoden zur Erfassung der antioxidativen Kapazität im Plasma sowie in Lebensmittelextrakten. Die Testverfahren weisen jedoch Unterschiede bezüglich verwendeter Radikalquellen, Proben, Reaktionsbedingungen und Auswertung auf. Jede Methode ermöglicht lediglich eine Aussage in Bezug auf die speziellen Reaktionen und Bedingungen, die in dem entsprechenden Test Anwendung finden (Huang et al., 2005; Frankel & Meyer, 2000; Prior et al., 2005).

Einzelne Tests stehen in enger Relation zum eingesetzten Radikalinitiator, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss (Ghiselli et al., 2000). Letztendlich kann mit jeder einzelnen Methode die antioxidative Kapazität nur in Bezug auf ein bestimmtes Radikal ermittelt werden: Beispielsweise ermöglicht der ORAC (*oxygen radical antioxidant capacity*)-Test die Messung der antioxidativen Kapazität gegenüber Peroxylradikale, während der TOSC (*total antioxidant scavening capacity*)-Assay auch Hydroxylradikale einbezieht (siehe Tabelle 2.2).

Weiters müssen die physiologischen und pathophysiologischen Rahmenbedingungen bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Die antioxidative Kapazität kann einerseits aus der Absorption exogener Antioxidantien (Prior & Cao, 1999) andererseits aus der Adaptierung endogener Schutzmechanismen resultieren. Außerdem bedeutet eine erhöhte antioxidative Kapazität nicht immer einen erhöhten Schutz vor freien Radikalen. So zeigt sich bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz häufig eine erhöhte antioxidative Kapazität im Plasma. Der Anstieg kommt fast ausschließlich durch den pathologisch hohen Plasma-Harnsäurespiegel zustande. Beide Parameter, die totale antioxidative Kapazität ebenso wie die Harnsäure, nehmen nach einer Hämodialyse stark ab (Jackson et al., 1995). In diesem Fall können die hohen Harnsäurewerte als Reaktion auf oxidativen Stress betrachtet werden.

Eine geringe antioxidative Kapazität ist nicht zwangsläufig als negativ zu bewerten, da sich in ihr letztlich die Exposition des Organismus gegenüber ROS widerspiegeln kann. Ein niedriger Antioxidantien Spiegel kann demnach Ausdruck einer Anpassung an geringe ROS Konzentrationen im Plasma sein (Prior & Cao, 1999).

Die Übertragbarkeit der antioxidativen Gesamtkapazität auf in-vivo-Systeme wurde von Breusing & Grune (2008) und Sies (2007) kritisiert. Die Autoren weisen auf einen nicht vernachlässigbaren Beitrag von antioxidativ wirkender Enzyme hin, der bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität nicht berücksichtigt wird. Zudem bleiben bestimmte in-vivo Stoffwechselprozesse, in denen antioxidativ wirkende Substanzen abgebaut werden, unberücksichtigt. Außerdem unterscheiden sich die Radikalquellen der verschiedenen Testverfahren von der Radikalbildung in-vivo. Die Beschränkung auf nur eine aktive Radikalquelle erweist sich als defizitär bei der Beschreibung biologischer Systeme.

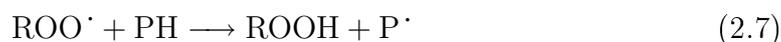
Demnach ist die Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität durch eine einzelne Messmethode als kritisch zu bewerten. Für eine umfassende Bewertung von oxidativem Stress und Antioxidantienstatus ist die Verwendung verschiedener Messmodelle erforderlich, die (1) die antioxidative Gesamtkapazität messen und zudem (2) die Bestimmung isolierter Antioxidantien sowie (3) Biomarker für oxidativer Schädigung umfassen (Finaud et al., 2006; Prior & Cao, 1999).

### 2.3.1 Reaktionsmechanismen

Messmethoden zur Erfassung der antioxidativen Kapazität werden aufgrund ihres Reaktionsmechanismus in zwei Gruppen eingeteilt (Prior et al., 2005):

- auf H-Transfer basierte Testmethoden (hydrogen-atom-transfer, HAT)
- auf Elektronen-Transfer basierte Testmethoden (single-electron-transfer, SET)

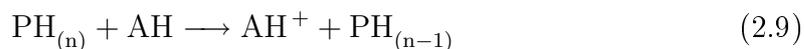
*HAT-Tests* ermitteln die Radikalfängerkapazität eines Antioxidants über Wasserstoffübertragung. Der H-Transfer ist ein Schlüsselprozess bei der Radikalkettenreaktion (siehe Lipidperoxidation, Abschnitt 2.2.2). Durch ihn wird die Kettenreaktion unterbrochen. Demnach ist die antioxidative Kapazität in den HAT-Assays ein Maß für die Unterbrechung der Radikalkettenreaktion.



Die meisten HAT-Assays basieren auf einem kompetitiven Reaktionsmechanismus. Antioxidantien (AH) konkurrieren mit dem Substrat (PH) um die Peroxylradikale (Huang et al., 2005). Die in der biologischen Probe enthaltenen Antioxidantien schützen ein chromogenes Substrat vor dem Angriff freier Radikale. Es wird das Ausmaß, mit dem diese Oxidation verhindert wird, bestimmt und mit Hilfe eines standardisierten Antioxidans (in der Regel Trolox) quantifiziert (Prior & Cao, 1999). HAT-Assays weisen folgende Komponenten auf: (1) eine Azoverbindung bildet die Radikalquelle; (2) ein chromogenes Substrat (UV- oder Fluoreszenzprobe) wird dem oxidativen Angriff ausgesetzt und verändert seine optischen Eigenschaften; (3) eine antioxidativ wirkende Probe (Huang et al., 2005). Die Veränderung der optischen Eigenschaften wird gemessen und in Relation zu der standardisierten Referenzprobe angegeben.

HAT-Reaktionen sind meist pH-unabhängig und unabhängig vom eingesetzten Lösungsmittel und weisen eine kurze Reaktionsdauer auf. In Anwesenheit von reduzierenden Substanzen (beispielsweise reduzierender Metalle) kann es zu Komplikationen sowie einer Überschätzung der Reaktivität kommen (Prior et al., 2005). Protein kann die Testreaktion ebenfalls störend beeinflussen, indem es die Aktivität niedermolekularer Antioxidantien maskiert (Prior et al., 2003).

*SET-Tests* messen die Fähigkeit von Antioxidantien Elektronen zu übertragen und dabei Oxidantien wie etwa Metalle, Carbonyle und freie Radikale zu reduzieren (Prior et al., 2005). Zwei Komponenten sind an der Reaktion beteiligt: (1) eine antioxidative Probe (AH) und (2) ein Oxidationsmittel bzw. Substrat (PH). SET-Tests beruhen auf folgender Redoxreaktion:



Ein einzelnes Elektron wird somit vom Antioxidans auf das Oxidans übertragen. Eine daraus resultierende Absorptionsänderung (bzw. Farbreaktion) vom reduzierten Substrat wird photometrisch gemessen. Dieser Absorptionswert wird zur Quantifizierung für die reduzierende Kapazität des Antioxidans verwendet (Huang et al., 2005).

SET-Reaktionen sind pH-abhängig und weisen meist eine, im Vergleich zu HAT-Tests, längere Reaktionsdauer auf. SET basierte Methoden sind äußerst empfindlich auf Ascorbinsäure, Harnsäure sowie Polyphenole. Spurenelemente und Kontaminantien wie beispielsweise Metalle können zu einer geringen Reproduzierbarkeit und hoher Variabilität der Ergebnisse führen (Prior et al., 2005).

In der Praxis werden HAT-Reaktionen gegenüber den SET-Tests häufig bevorzugt, da Peroxylradikale als Oxidantien eingesetzt werden. Peroxylradikale entstehen als Produkte der Lipidperoxidation auch in organischem Gewebe; dadurch besteht eine hohe Ähnlichkeit zwischen Testreaktion und in-vivo Prozessen. Eine gute Charakterisierung der antioxidativen Kapazität ist möglich (Prior et al., 2005).

Trotzdem ist, wie bereits erwähnt, die Anwendung verschiedener Methoden von Vorteil. Um ein möglichst gesamtheitliches Bild des Antioxidantienstatus zu erhalten, sollten sowohl die Radikalfängerkapazität (über HAT-Tests) als auch die Reduktionsfähigkeit (über SET-Tests) berücksichtigt werden.

Tabelle 2.2 gibt eine Übersicht über die meist eingesetzten Methoden zur Erfassung der antioxidativen Kapazität. Im folgenden Abschnitt werden die für diese Arbeit relevanten Methoden näher erläutert.

### 2.3.2 ORAC-Assay

**Prinzip:** Der von Cao et al. (1993) entwickelte ORAC-Assay (engl.: oxygen radical absorbance capacity) ist eine weit verbreitete Testmethode zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität. Dabei wird (1)  $\beta$ -Phycoerythrin ( $\beta$ -PE) als Indikatorprotein, (2) 2,2'-Azobis-(2-amidinopropan) dihydrochlorid (AAPH) als Peroxylradikalquelle und (3) Trolox (eine wasserlösliche Vitamin E analoge Verbindung ohne Phytlyseitenkette) zur Erstellung einer Kalibriergerade eingesetzt. Beim ORAC-Test wird die antioxidative Kapazität einer Probe gegenüber Peroxylradikalen bei 37 °C fluorometrisch gemessen. Das als Radikalgenerator eingesetzte AAPH bildet durch thermische Zersetzung Peroxylradikale. Diese oxidieren das fluoreszierende  $\beta$ -Phycoerythrin und führen zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Durch die Anwesenheit von Antioxidantien wird der Abbau des  $\beta$ -Phycoerythrin verzögert, da ein Teil der Peroxylradikale neutralisiert wird. Diese Verzögerung dient als Messgröße für die antioxidative Kapazität (Huang et al., 2002b; Ou et al., 2001).

Zur Quantifizierung der antioxidativen Kapazität wird die Fläche unter der gemessenen Fluoreszenzkurve (area under the curve, AUC) ermittelt und die Blindwertfläche (Substrat ohne Antioxidantien) abgezogen (siehe Abbildung 2.2). Der ORAC-Test erfasst durch die Integration der Kurve sowohl das Ausmaß als auch die Dauer der Fluoreszenzabnahme durch Antioxidantien in einer Messgröße. Alle Ergebnisse werden auf Trolox bezogen und in Troloxäquivalenten (TÄ) angegeben (Ou et al., 2001).

Tabelle 2.2: Methoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität

Testverfahren	Bezeichnung	Messung von	Reaktion
ORAC (Cao et al., 1993)	Oxygen Radical Antioxidant Capacity	antioxidative Kapazität gegenüber Peroxylradikalen	HAT
FRAP (Benzie & Strain, 1996)	Ferric Reducing Ability of Plasma Ferric Reducing Antioxidant Power	eisenreduzierende Fähigkeit von Antioxidantien	SET
TRAP (Wayner et al., 1987)	Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Parameter	antioxidative Kapazität gegenüber Peroxylradikalen	HAT
DPPH <sup>•</sup> (Brand-Williams et al., 1995)	Diphenylpicrylhydrazyl Radical Scavenging Capacity	antioxidative Kapazität einer Probe gegenüber DPPH <sup>•</sup>	SET
TOSC (Winston et al., 1998)	Total Antioxidant Scavenging Capacity	antioxidative Kapazität gegenüber Peroxylradikalen, Hydroxylradikalen und Peroxynitrit	HAT
TEAC (Miller et al., 1996)	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity	antioxidative Kapazität gegenüber ABTS <sup>•+</sup>	SET/HAT

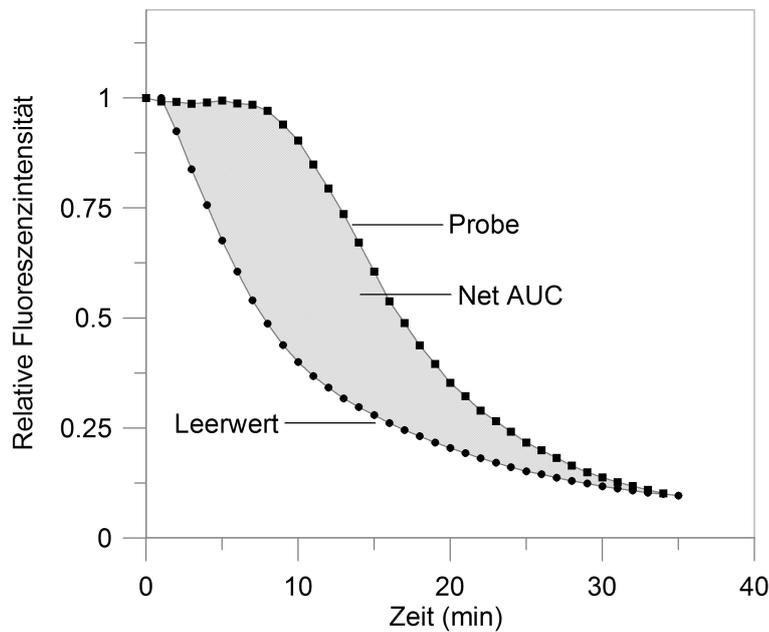


Abbildung 2.2: „Net area under the curve“ zur Quantifizierung der antioxidativen Kapazität

Die ursprüngliche Version des ORAC-Tests (Cao et al., 1993) wurde mehrfach modifiziert. Wie bereits erwähnt, wird im ORAC-Assay von Cao et al. (1993)  $\beta$ -PE als fluoreszierende Probe verwendet. Spätere Publikationen kritisieren den Einsatz dieser fluoreszierenden Verbindung und nennen verschiedene Nachteile (Huang et al., 2005; Prior et al., 2005):

- $\beta$ -Phycoerythrin variiert bezüglich seiner Zusammensetzung, woraus eine unterschiedliche Reaktivität gegenüber Peroxylradikalen resultiert.
- Es finden unspezifische Wechselwirkungen mit antioxidativen Polyphenolen durch Proteinbindung statt, Messwerte für Substanzen dieser Art fallen dadurch deutlich niedriger aus.
- Die Photostabilität unter den Reaktionsbedingungen ist nicht gewährleistet.

Aus diesen Gründen wird in dem nach Ou et al. (2001) modifizierten Test Fluorescein eingesetzt, welches sich durch hohe Photostabilität auszeichnet. Der ORAC-Assay lässt sich dadurch leicht auf 96-Well Mikroplatten adaptieren (Huang et al., 2002b).

Ein weiterer Kritikpunkt ist der Zeitaufwand bei der Analyse großer Probenkollektive. Deswegen wurden einige Modifikationen vorgenommen, um insbesondere das

analytische Verfahren zu automatisieren. Durch die Verwendung eines *COBAS FARA II*-Analysegeräts konnte die Messmethode erstmals semiautomatisiert durchgeführt werden (Cao et al., 1995) und dadurch eine erhöhte Probendurchsatzrate erzielt werden. Nachdem die Produktion von COBAS FARA II durch den Hersteller eingestellt wurde, wurden neue Gerätesysteme für die Automatisierung des ORAC-Assays notwendig. Huang et al. (2002b) entwickelten den *High throughput ORAC assay*, der von der Herstellung der Proben bis zur Messung vollständig automatisiert ist. Der Test wurde in 96-Well Mikrotiterplatten durch ein *Mehrkanal-Liquid-Handling-System* (Pipettierroboter) durchgeführt. Gemessen wurde mit Hilfe eines *Microplate-Fluorometers*. Dieses automatische System ermöglicht die Analyse von etwa 130 Proben pro Tag. Dabei werden nicht nur Analyse- bzw. Arbeitszeit verkürzt, sondern auch Fehlermöglichkeiten bei der Herstellung der Proben minimiert. Für den Einsatz eines vollautomatisierten ORAC Tests ist jedoch die Verfügbarkeit eines Pipettierroboters sowie eines Mikroplattenreaders Voraussetzung. Die Arbeit von Price et al. (2006) liefert trotz traditioneller Probenherstellung und manuellem Pipettieren hoch reproduzierbare Ergebnisse. Dieser manuell durchgeführte ORAC-Assay (manuelles Pipettieren der Proben) kann in Verbindung mit einem 96-Well Platten Reader ebenfalls einen hohen Probendurchsatz gewährleisten.

Modifizierungen am originalen ORAC-Assay (Cao et al., 1993) wurden vorgenommen, um neben der (üblichen) hydrophilen auch die lipophile antioxidative Kapazität von Plasmaproben zu erfassen. Die lipophile Fraktion des Plasmas kann beispielsweise durch Einsatz eines lipophilen Radikalgenerators (AMVN, 2,2'-Azobis-2,4-dimethylvaleronitril) sowie von BODIPY (fluoreszierende Probe) erfasst werden (Aldini et al., 2001). Huang et al. (2002a) verändern den wasserlöslichen ORAC-Assay, indem sie methyliertes  $\beta$ -Cyclodextrin als Lösungsmittel für lipophile Antioxidantien einsetzen. Prior et al. (2003) beschreiben eine weitere Möglichkeit, in der lipophile und hydrophile Phase durch Extraktion getrennt werden. Diese Methode ermöglicht eine gleichzeitige Messung von lipophiler und hydrophiler antioxidativer Kapazität. APPH wird dabei als Radikalinitiator und Fluorescein als fluoreszierende Probe eingesetzt (Prior et al., 2003).

**Auswertung des ORAC-Tests** Zur Bestimmung der ORAC-Werte wird die Reaktionskinetik über einen Zeitraum von  $\geq 30$  min aufgenommen. Im Minutentakt wird die Fluoreszenzabnahme [485 nm (ex), 525 nm (em)] bei 37 °C und einem pH Wert von 7,4 gemessen (Huang et al., 2005). Zur Berechnung des ORAC-Werts wird die *Area under the curve* (Fläche unter der Fluoreszenzabnahme-Kurve) durch

numerische Integration ermittelt (Huang et al., 2002b). Sie wird für die Standardsubstanz (Trolox in unterschiedlichen Konzentrationen), für die Plasmaprobe und den Blindwert nach folgender Formel berechnet.

$$AUC = 0,5 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + f_3/f_0 + \dots + f_4/f_0 + f_5/f_0 \quad (2.10)$$

$f_0$  = Anfangsfluoreszenz gemessen bei 0 min

$f_i$  = detektierte Fluoreszenz bei der Zeit  $i$

Die *Net area under the curve* erhält man durch:

$$AUC_{net} = AUC - AUC_{Blindwert} \quad (2.11)$$

Die  $AUC_{net}$  des Standardantioxidans Trolox lässt sich gegen die eingesetzte Konzentration auftragen und ergibt einen linearen Zusammenhang (Huang et al., 2002b). Mit Hilfe der Trolox-Eichgeraden werden die Troloxäquivalente nach folgender Gleichung bestimmt:

$$ORAC(\mu mol/L) = \frac{AUC_{net}(Probe)}{AUC_{net}(Trolox)} \cdot c(Trolox) \quad (2.12)$$

**Vorteile des ORAC-Tests** Der ORAC-Test stellt ein Modell für die Reaktion zwischen Antioxidantien und Radikalen in Lebensmitteln sowie in Plasmaproben dar. Wie bereits erwähnt, kann durch den Einsatz verschiedener Radikalquellen bzw. Lösungsvermittler neben der hydrophilen auch lipophile antioxidative Kapazität bestimmt werden (Prior et al., 2005). Außerdem ermöglicht die Bestimmung der AUC sowohl die Verhinderung der Radikalentstehung durch Antioxidantien als auch die Dauer dieser Hemmung in die Berechnung einzubeziehen.

**Nachteile des ORAC-Tests** Die ORAC-Reaktion ist temperatursensitiv, wobei schon geringe Temperaturschwankungen im Testverfahren zu einer eingeschränkten Reproduzierbarkeit führen können. Eine Inkubation des Reaktionspuffers auf 37°C vor Zugabe des Radikalgenerators APPH kann Schwankungen zwischen den Tests reduzieren. Der Arbeits- bzw. Zeitaufwand, der vor allem auf die mangelnde Verfügbarkeit verschiedener Analysegeräte (Pipettierroboter, Fluorometer) zurückzuführen ist, wird ebenfalls als Nachteil des ORAC-Assays diskutiert (Prior et al., 2005).

### 2.3.3 TEAC-Assay

**Prinzip** Der von Miller et al. (1993) entwickelte TEAC-Test (engl.: *trolox equivalent antioxidant capacity*) ist ein etabliertes Verfahren zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Plasmaproben, Lebensmittelextrakten sowie in isolierten Antioxidantien. Der TEAC-Wert beschreibt die Fähigkeit von Antioxidantien Radikale über Wasserstofftransfer abzufangen sowie über Elektronentransfer zu reduzieren (Antolovich et al., 2002). Bei diesem Test wird die Absorptionsänderung (bzw. Absorptionsabnahme) des Radikalkations ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonat)) in Anwesenheit von Antioxidantien bestimmt. Das Farbstoffradikal wird bei 734 nm photometrisch gemessen. Zur Generierung von ABTS<sup>•+</sup> wird Metmyoglobin durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktiviert, wodurch Ferrylmyoglobin gebildet wird. Das Ferrylmyoglobin-Radikal oxidiert anschließend das ABTS zu dem blaugrün gefärbten kationischen ABTS-Radikal. Durch Zugabe eines Antioxidans wird das ABTS<sup>•+</sup> abgefangen und eine Entfärbung der Reaktionslösung (Dekolorisationstest) induziert (Re et al., 1999; Van Den Berg et al., 1999). Beim TEAC-Test wird Trolox als Referenzsubstanz eingesetzt. Die antioxidative Kapazität wird, wie bereits beim ORAC-Assay, in Troloxäquivalente ausgedrückt (Magalhaes et al., 2008; Antolovich et al., 2002).

Der TEAC-Test wurde im Laufe der Jahre modifiziert und adaptiert. Modifikationen betreffen vor allem die Bildung von ABTS<sup>•+</sup>, die eingesetzte Wellenlänge sowie den Zeitpunkt der Messung (Prior et al., 2005).

Bei früheren Tests wird das ABTS-Radikal in Anwesenheit von Antioxidantien gebildet. Dabei wird nicht allein das Abfangen freier Radikale durch Antioxidantien, sondern auch die Hemmung der Radikalbildungsreaktion erfasst. Eine Überschätzung der antioxidativen Kapazität kann daraus resultieren (Van Den Berg et al., 1999). Re et al. (1999) hingegen generieren und quantifizieren das ABTS<sup>•+</sup>-Kation vor Zusatz der antioxidativ wirkenden Probe. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass nur die Fähigkeit eines Antioxidans zum Abfangen freier Radikale beobachtet wird. Außerdem verwenden die Autoren eine alternative Radikalquelle. Kaliumpersulfat wird für die Bildung des ABTS<sup>•+</sup> eingesetzt.

Das ABTS-Radikal weist außerdem mehrere Absorptionsmaxima bei 415, 645, 734 und 815 nm auf, welche bei der Absorptionsmessung Anwendung finden können (Re et al., 1999). Die Messung erfolgt meistens bei 734 nm, da Interferenzen mit anderen absorbierenden Komponenten minimiert werden können (Antolovich et al., 2002; Magalhaes et al., 2008).

Der Messzeitraum des TEAC-Tests liegt zwischen 1 und 6 min (Re et al., 1999). Um einzelne Proben miteinander vergleichen zu können, ist es jedoch wichtig einen einheitlichen Zeitpunkt für die Messung zu wählen.

**Auswertung des TEAC-Assays** Die antioxidative Kapazität bzw. der TEAC-Wert wird als prozentuale Absorptionsabnahme (%A) des ABTS<sup>+</sup>-Radikals bei 734 nm ausgedrückt (Re et al., 1999). Wie bei ORAC wird die Differenz aus den Absorptionsänderungen (%ΔA) von Probe und Blindwert gebildet (z. B. nach 6 min Reaktionszeit). Das Ergebnis wird mit der Absorptionsänderung einer Trolox-Standardlösung bekannter Konzentration, die parallel getestet wurde, verglichen (Miller et al., 1996). Mit Hilfe der Geradengleichung lässt sich die prozentuale Absorptionsänderung (%) in TEAC-Werte [mmol/l] umrechnen.

$$TEAC(\mu\text{mol}/L) = \frac{\% \Delta A(\text{Probe})}{\% \Delta A(\text{Trolox})} \cdot c(\text{Trolox}) \quad (2.13)$$

Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung der antioxidativen Kapazität im TEAC wurde von Re et al. (1999) vorgeschlagen: Der Autor empfiehlt die Reaktionskinetik durch die AUC in die Berechnung einzubeziehen. Die Veränderung der Absorptionswerte im Zeitverlauf kann dadurch beobachtet werden.

**Vorteile des TEAC-Tests** Der TEAC-Test ist eine einfache Methode zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität (Huang et al., 2005). Er kann durch Einsatz eines ethanolischen Lösungsmittels die hydrophile und lipophile antioxidative Kapazität erfassen (Re et al., 1999; Van Den Berg et al., 1999). Das ABTS<sup>•+</sup>-Radikal reagiert in kurzer Zeit ( $\leq 30$  min) mit den zur Verfügung stehenden Antioxidantien. Außerdem ist der TEAC-Test für einen weiten pH-Bereich einsetzbar. Effekte des pH-Wertes auf antioxidativ wirkende Mechanismen können durch diesen Test analysiert werden (Prior et al., 2005).

**Nachteile des TEAC-Tests** ABTS<sup>•+</sup> ist kein physiologisches Radikal (Prior et al., 2005), weshalb die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf in-vivo Systeme kritisiert wird. Außerdem kann ein Antioxidans nur dann ABTS<sup>•+</sup> reduzieren, wenn es ein niedrigeres Redoxpotential als dieses aufweist (Prior et al., 2005).

### 2.3.4 FRAP-Test

Der von Benzie & Strain (1996) entwickelte FRAP-Test hat sich als Verfahren zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Plasmaproben etabliert. Er misst die reduktive Fähigkeit antioxidativ wirkender Substanzen auf  $\text{Fe}^{3+}$ . Dabei entsteht eine intensive blaue Farbe, dessen Absorptionsmaximum bei 593 nm liegt. Die Absorptionsänderung wird über einen Zeitraum von 4 min gemessen. Die Methode basiert auf einer Elektronentransferreaktion und gehört demnach zu den SET-Tests. Das bei der Reduktion gebildete gefärbte  $\text{Fe}^{2+}$ -Komplex wird photometrisch bestimmt.

Das FRAP-Assay misst die Antioxidantien als Reduktionsmittel mit Hilfe einer colorimetrischen Reaktion. Es handelt sich dabei um eine direkte Bestimmung der antioxidativen Kapazität. Andere Assays bedienen sich indirekter Methoden. Sie messen die Hemmung freier Radikale über Antioxidantien, wobei die ROS zuvor im Reaktionssystem gebildet werden müssen. Die Ergebnisse hängen hierbei stark von der Art des eingesetzten Radikals ab (Benzie & Strain, 1998).

Wie bereits erwähnt wurde der FRAP-Test in seiner ursprünglichen Version für die Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Plasmaproben eingesetzt (Benzie & Strain, 1996). In weiterer Folge wurde der FRAP-Test aufgrund seiner simplen Anwendung auf Lebensmittelextrakte, Getränke sowie isolierten Antioxidantien appliziert (Tsao et al., 2003; Benzie & Szeto, 1999; Benzie & Strain, 1998). Die Adaptierung des Testverfahrens an einen 96-Well Mikroplattenreader erlaubt eine schnelle und effiziente Bestimmung der antioxidativen Kapazität (Firuzi et al., 2005; Tsao et al., 2003).

In den folgenden Kapiteln wird der FRAP-Assay als Testverfahren zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität näher erläutert.

Ziel der Diplomarbeit war die Implementierung des FRAP-Assays am Department für Ernährungswissenschaften. Anwendung fand dann der etablierte Test bei einem FWF-Projekt zu Ultraausdauersport.



# 3 Materialien und Methodik

## 3.1 Studienpopulation

Das vom FWF geförderte Forschungsprojekt *Risikobeurteilung von Ironman Triathleten* des Departments für Ernährungswissenschaften (Universität Wien) umfasst ein Studienkollektiv von 48 männlichen, nichtprofessionellen, gesunden Triathleten, die beim *Ironman Austria 2006* (3,8 km Schwimmen, 180 km Radfahren und 42,2 km Laufen) an den Start gingen. 42 Studienteilnehmer schlossen die Studie ab und wurden in die statistische Auswertung einbezogen. Alle Studienteilnehmer wurden im Rahmen eines Aufklärungsgesprächs über die Untersuchungen informiert und gaben schriftlich ihr Einverständnis ab. Die Studie wurde von der Ethikkommission der medizinischen Universität Wien (AKH) überprüft und genehmigt. Die Charakterisierung der Studienpopulation und deren Trainingszustand werden in Tabelle 3.1 gezeigt (Neubauer et al., 2008).

Tabelle 3.1: Charakterisierung und trainingsphysiologische Parameter der Studienpopulation

Alter (Jahren)	35,3 ± 7,0
Größe (cm)	180,6 ± 5,6
Gewicht (kg)	75,1 ± 6,4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23,0 ± 1,2
Körperfett, TBF (%)	11,8 ± 4,1
Peak power output, Peak PO (W <sub>peak</sub> )	56,6 ± 6,2
Individual anaerobic threshold, IAT (W)	219,4 ± 43,5
Relative IAT (W/kg)	2,9 ± 0,5
Training 6 Monate vor dem Ironman Triathlon	
Netto-Ausdauertrainingszeit, WNET (h/week)	10,7 ± 2,6
Gesamte Wettkampfdauer (h:min:s)	10 : 51 : 52 ± 01 : 01 : 22

Die Daten stellen den Mittelwert ± SD dar, N=42

## 3.2 Studienprotokoll

Im Rahmen der Untersuchung (neubauer:2008a) wurden 48 Triathleten (n=48), bei denen sowohl chronische als auch akute Erkrankungen ausgeschlossen werden konnten, mit BMI im Normbereich und Nicht-Raucher untersucht. Außerdem wurde ein Grenzwert für die Aufnahme an antioxidativ wirkenden Vitaminen und Mineralstoffen (in Form von Supplementen zusätzlich zur Basisernährung) auf täglich maximal 100% der RDA festgelegt (Zeitraum = 6 Wochen vor Wettkampf bis zur letzten Blutabnahme, 19 Tage nach Wettkampf). Das Studienkollektiv wurde vor jeder Blutabnahme einem medizinischen Screening unterzogen. Der ernährungsphysiologische Status wurde mittels eines *Food and supplementation food questionnaire* und einem *24-Stunden Recall* festgestellt. Außerdem wurde das Training 6 Monate vor dem Ironman-Triathlon bis zum Ende der Studie dokumentiert. Die Blutproben wurden zu folgenden Zeitpunkten entnommen: 2 Tage vor dem Ironman Triathlon, unmittelbar nach dem Wettkampf (20 min), 1, 5 und 19 Tage nach dem Triathlon (Vgl. mit Abbildung 3.1).

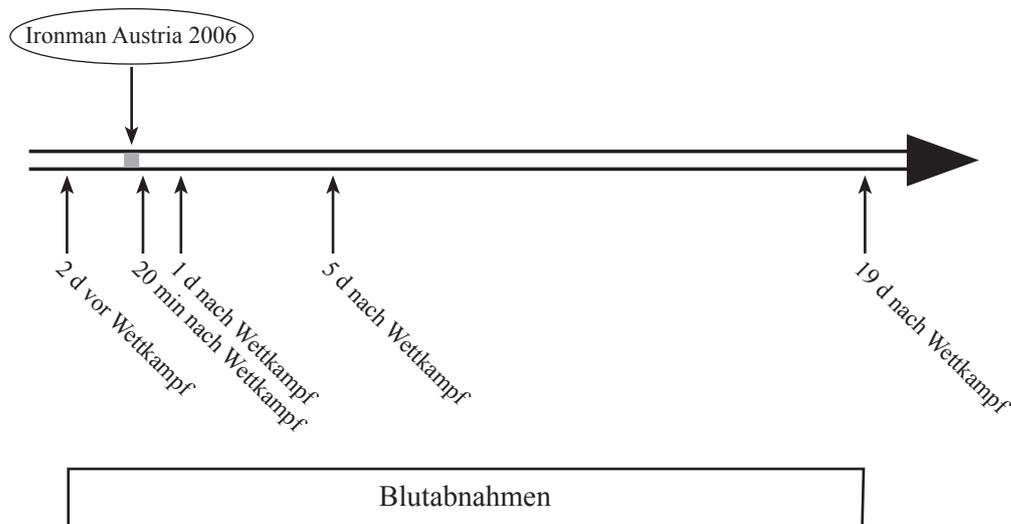


Abbildung 3.1: Zeitplan für die Blutabnahmen

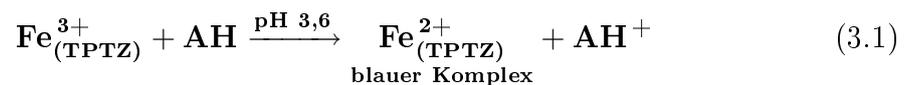
## 3.3 Prinzip der Messung

Der von Benzie & Strain (1996) entwickelte FRAP-Assay (FRAP = *Ferric Reducing Ability of Plasma*) stellt ein einfaches Verfahren zur Messung der antioxidativen Ka-

pazität im Plasma dar. Der Test nutzt die Fähigkeit von antioxidativ wirkenden Substanzen dreiwertiges Eisen zu reduzieren, die im  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -Tripyridyltriazin(TPTZ)-Redoxsystem durch die Bildung eines intensiv blau gefärbten Eisen(II)-Komplex sichtbar gemacht wird.  $\text{Fe}^{2+}$  wird photometrisch bei seinem Absorptionsmaximum von 593 nm detektiert. Die Reaktion läuft im sauren Milieu bei pH 3,6 ab.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode zur besseren Handhabung und Vereinfachung modifiziert (Vergleiche mit 2.3.4): Ein Reaktionszeitfenster von 6 min wurde gewählt (Benzie & Strain, 1998); die Wellenlänge wurde auf 540 nm festgelegt, wobei auf die Filterverfügbarkeit des Gerätes Rücksicht genommen werden musste. Die Methode wurde zudem an einen *96-Well Mikrotiterplattenreader* angepasst, um eine höhere Probendurchsatzrate zu erreichen (Tsao et al., 2003).

Trotz seiner ursprünglichen Definition als *Ferric Reducing Ability of Plasma* wird er heute auch für Lebensmittelextrakte sowie Reinsubstanzen eingesetzt und deswegen oft auch als *Ferric Reducing Antioxidant Power Assay* bezeichnet.



## 3.4 Material

### 3.4.1 Chemikalien

Reagenzien	Chem. Formel	Hersteller
Natriumacetat-Trihydrat	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Fluka Chemicals, Switzerland
Essigsäure	$\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$	Fluka Chemicals, Switzerland
2,4,6-Tripyridyl-s-triazin (TPTZ)	$\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$	Fluka Chemicals, Switzerland
Chlorwasserstoffsäure	HCl	Riedl-de Haen, Germany
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Riedl-de Haen, Germany
Eisen(II)-sulfat-heptahydrat	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Fluka Chemicals, Switzerland

### 3.4.2 Proben

**Standardlösung und Antioxidantien** Zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden wurden wässrige  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösungen mit bekannter Konzentration im Bereich von 100

bis 2500  $\mu\text{mol/L}$  verwendet. Mit Hilfe der Geraden konnte auf die Konzentration bzw. antioxidative Kapazität der Probe ( $\mu\text{mol/L}$ ) geschlossen werden. Als Kontrollsubstanzen dienten wässrige Antioxidantienlösungen wie etwa aus Ascorbinsäure (*Sigma Chemicals, USA*), Trolox und Harnsäure (*Sigma Chemicals, USA*).

**Blutproben** 5 Blutproben pro Patient wurden untersucht. Die antioxidative Kapazität wurde in EDTA- bzw. Heparinplasmaproben photometrisch gemessen. Die Blutproben wurden bei max. 4°C gelagert und dann in einer Zentrifuge bei 3000 U/min und 4°C für 20 min zentrifugiert. Die Proben wurden aliquotiert und bei -80°C eingefroren (Neubauer et al.).

### 3.4.3 Verwendete Geräte und Einstellungen

Die Absorptionsmessungen wurden an einem Mikroplattenlesegerät der Firma BMG Labortechnologies (Deutschland) durchgeführt. Die Temperatureinstellung am Gerät betrug 37°C. Ein Absorptionsfilter mit einer Exzitationswellenlänge von 540 nm wurde gewählt. Die Messdaten wurden mit der Software FLUOstar Optima Software Version 1.20-0 verarbeitet. Die Lösungen wurden auf unbeschichtete 96-Well Mikroplatten mit einer Eppendorfpipette aufgetragen (Bibby Sterlin, UK) aufgetragen.

Tabelle 3.2: Grundeinstellungen an der FLUOstar Optima Software (siehe Angang B.1)

Testname	FRAP
Verwendete Mikroplatten	96-Well Mikrotiterplatten
Messmode	Absorption
Wellenlänge	540 nm
Temperatur	37°C
Beginn der Messung	1 s
Anzahl der Messungen	10
Intervall zwischen den Messungen	36 s
Mischen	5 s vor der ersten Messung

## 3.5 Methode

### 3.5.1 Herstellung der Lösungen

- Acetatpuffer (300 mmol/L); pH 3,6:  
3,1 g  $C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$  und 16 ml konzentrierte Essigsäure wurden in einem Liter destilliertem Wasser gelöst.
- TPTZ-Lösung (10 mmol/L in 40 mmol/L HCl):  
31,2 mg 2,4,6-Tripyridyl-s-triazin und 585  $\mu$ l HCl wurden in 100 ml destilliertem Wasser angesetzt.
- $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ -Lösung (20 mmol/L):  
54,1 mg Eisen(III)-chlorid in 100 ml destilliertem Wasser lösen.
- FRAP-Lösung:  
25 ml Acetatpuffer wurden mit 2,5 ml Eisen(III)-chlorid und mit 2,5 ml TPTZ-Lösung versetzt (10:1:1). Die Lösung wurde *täglich frisch hergestellt* und im Wasserbad bei 37°C aufbewahrt.
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  -Lösung (2500 mmol/L):  
5,56 mg Eisen(II)-sulfat in 100 ml destilliertem Wasser lösen. Die Eisen(II)-sulfatstammlösung wurde anschließend mit destilliertem Wasser auf die Konzentrationen 2000, 1500, 1250, 1000, 500, 250, 100  $\mu$ mol/L verdünnt.
- Trolox, Ascorbinsäure, Harnsäure:  
Erstellung von verschiedenen Verdünnungsreihen im Konzentrationsbereich 100 - 2500  $\mu$ mol/L. Die Empfindlichkeit von Ascorbinsäure gegen Sauerstoff und Licht erforderten eine tägliche Herstellung der Lösung.

### 3.5.2 Allgemeine Durchführung

Mit Hilfe einer Eppendorfpipette wurden 10  $\mu$ l Blutplasma in die Vertiefungen (Wells) der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zugabe von 30  $\mu$ l Wasser und 300  $\mu$ l FRAP-Lösung wurde die Messung unmittelbar gestartet. Der Zeitraum zwischen Pipettieren der FRAP-Lösung und dem Beginn der Messung sollte für die Proben möglichst gleich sein. Auf keinen Fall sollte mehr als eine Minute zwischen Einbringung der FRAP-Lösung und der Messung liegen. Der Mikroplattenreader ist so programmiert, dass zunächst 5s geschüttelt und dann im Intervall von 36 s, 6 min lang gemessen wird. Nach 6 min erhielt man den Endwert, der gegen einen Blindwert (40  $\mu$ l Wasser

Tabelle 3.3: Pipettierschema adaptiert an 96-Well Mikroplatten

In „well“ pipetieren	Standard [µl]	Blindwert [µl]	Kontrolle [µl]	Probe [µl]
Eisen(II)-lösungen	10	-	-	-
Trolox/Ascorbinsäure/Harnsäure	-	-	10	-
EDTA-bzw. Heparinplasma	-	-	-	10
Aqua dest.	30	40	30	30
Frap-Reagenz	300	300	300	300

und 300 µl FRAP-Reagenz) aufgetragen wurde. Zur Quantifizierung der Konzentration (bzw. antioxidativen Kapazität) diente eine in den 96-er Mikrotiterplatten parallel angesetzte Fe(II)-Standardreihe; zur Kontrolle wurden verschiedene Konzentrationen einer Ascorbinsäure bzw. Trolox-Lösung (100 - 2500 µmol/L) eingesetzt. Die Platte wurde während der gesamten Reaktions- bzw. Messzeit bei 37 °C inkubiert. Das FRAP-Reagenz wurde außerdem vor Einsatz im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt.

Bei der praktischen Durchführung hat es sich bewährt, mit zwei Platten parallel zu arbeiten. Während der Messung einer Charge konnte bereits eine zweite Platte befüllt werden. Dadurch konnte die tägliche Probendurchsatzrate optimiert werden (Siehe Abbildung 3.3).

### 3.5.3 Auswertung

Aus der Differenz der Extinktionswerte der Standardlösungen und den Extinktionen des Blindwertes (bei 2500, 2000, 1500, 1000, 500, 250, 100 µmol/L) wurde eine Standardgerade (siehe Abbildung 3.2) erstellt. Nachdem die Absorptionsänderung zwischen Probe und Blindwert berechnet wurde, konnte diese auf die Kalibriergerade übertragen und die Konzentration (µmol/L) der Probe ermittelt werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Berechnung der FRAP-Werte bietet folgender Ansatz:

$$\text{FRAP-Wert}(\mu\text{mol/L}) = \frac{\Delta A_{540\text{nm}}^{\text{Probe}}}{\Delta A_{540\text{nm}}^{\text{Standard}}} \cdot \text{Konz. der Standardlösung} \quad (3.2)$$

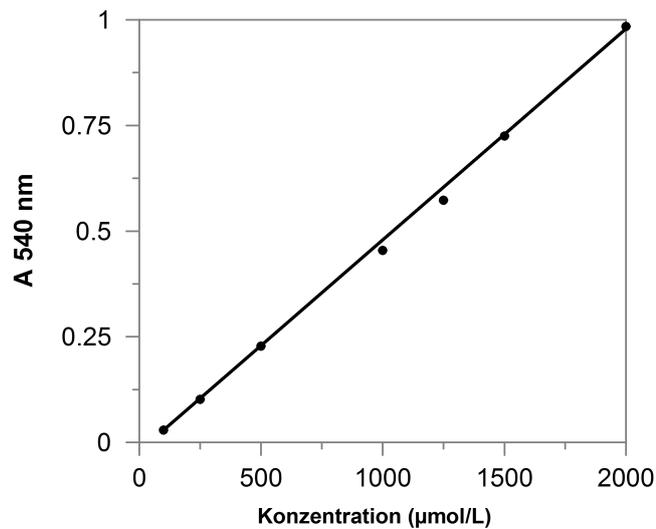


Abbildung 3.2: Fe(II)-Standardgerade zur Erfassung der antioxidativen Kapazität der untersuchten Substanzen.

## 3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows, Version 15.0. Dabei kamen der gepaarte t-Test sowie die einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Post Hoc Test zum Einsatz. Korrelationen wurden nach Pearson berechnet. Die Ergebnisse sind im Falle der Untersuchungen zur antioxidativen Kapazität als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Das Signifikanzniveau wurde bei  $*p < 0,05$  als „signifikant“, bei  $**p < 0,01$  als „höchst signifikant“ und bei  $***p < 0,001$  als „extrem signifikant“ festgelegt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	K	K	P02 <sub>4</sub>	P02 <sub>4</sub>	P05 <sub>4</sub>	P05 <sub>4</sub>	P08 <sub>4</sub>	P08 <sub>4</sub>	P11 <sub>4</sub>	P11 <sub>4</sub>
B	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	K	K	P02 <sub>5</sub>	P02 <sub>5</sub>	P05 <sub>5</sub>	P05 <sub>5</sub>	P08 <sub>5</sub>	P08 <sub>5</sub>	P11 <sub>5</sub>	P11 <sub>5</sub>
C	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	K	K	P03 <sub>1</sub>	P03 <sub>1</sub>	P06 <sub>1</sub>	P06 <sub>1</sub>	P09 <sub>1</sub>	P09 <sub>1</sub>	P12 <sub>1</sub>	P12 <sub>1</sub>
D	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	K	K	P03 <sub>2</sub>	P03 <sub>2</sub>	P06 <sub>2</sub>	P06 <sub>2</sub>	P09 <sub>2</sub>	P09 <sub>2</sub>	P12 <sub>2</sub>	P12 <sub>2</sub>
E	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	K	K	P03 <sub>3</sub>	P03 <sub>3</sub>	P06 <sub>3</sub>	P06 <sub>3</sub>	P09 <sub>3</sub>	P09 <sub>3</sub>	P12 <sub>3</sub>	P12 <sub>3</sub>
F	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	K	K	P03 <sub>4</sub>	P03 <sub>4</sub>	P06 <sub>4</sub>	P06 <sub>4</sub>	P09 <sub>4</sub>	P09 <sub>4</sub>	P12 <sub>4</sub>	P12 <sub>4</sub>
G	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	K	K	P03 <sub>5</sub>	P03 <sub>5</sub>	P06 <sub>5</sub>	P06 <sub>5</sub>	P09 <sub>5</sub>	P09 <sub>5</sub>	P12 <sub>5</sub>	P12 <sub>5</sub>
H	Fe <sup>2+</sup>	Fe <sup>2+</sup>	K	K								

(a)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	P01 <sub>1</sub>	P01 <sub>1</sub>	P04 <sub>1</sub>	P04 <sub>1</sub>	P07 <sub>1</sub>	P07 <sub>1</sub>	P10 <sub>1</sub>	P10 <sub>1</sub>	P13 <sub>1</sub>	P13 <sub>1</sub>
B	B	B	P01 <sub>2</sub>	P01 <sub>2</sub>	P04 <sub>2</sub>	P04 <sub>2</sub>	P07 <sub>2</sub>	P07 <sub>2</sub>	P10 <sub>2</sub>	P10 <sub>2</sub>	P13 <sub>2</sub>	P13 <sub>2</sub>
C	B	B	P01 <sub>3</sub>	P01 <sub>3</sub>	P04 <sub>3</sub>	P04 <sub>3</sub>	P07 <sub>3</sub>	P07 <sub>3</sub>	P10 <sub>3</sub>	P10 <sub>3</sub>	P13 <sub>3</sub>	P13 <sub>3</sub>
D	B	B	P01 <sub>4</sub>	P01 <sub>4</sub>	P04 <sub>4</sub>	P04 <sub>4</sub>	P07 <sub>4</sub>	P07 <sub>4</sub>	P10 <sub>4</sub>	P10 <sub>4</sub>	P13 <sub>4</sub>	P13 <sub>4</sub>
E	B	B	P01 <sub>5</sub>	P01 <sub>5</sub>	P04 <sub>5</sub>	P04 <sub>5</sub>	P07 <sub>5</sub>	P07 <sub>5</sub>	P10 <sub>5</sub>	P10 <sub>5</sub>	P13 <sub>5</sub>	P13 <sub>5</sub>
F	B	B	P02 <sub>1</sub>	P02 <sub>1</sub>	P05 <sub>1</sub>	P05 <sub>1</sub>	P08 <sub>1</sub>	P08 <sub>1</sub>	P11 <sub>1</sub>	P11 <sub>1</sub>	K	K
G	B	B	P02 <sub>2</sub>	P02 <sub>2</sub>	P05 <sub>2</sub>	P05 <sub>2</sub>	P08 <sub>2</sub>	P08 <sub>2</sub>	P11 <sub>2</sub>	P11 <sub>2</sub>	K	K
H	B	B	P02 <sub>3</sub>	P02 <sub>3</sub>	P05 <sub>3</sub>	P05 <sub>3</sub>	P08 <sub>3</sub>	P08 <sub>3</sub>	P11 <sub>3</sub>	P11 <sub>3</sub>	K	K

(b)

Abbildung 3.3: Layout der befüllten 96-Well Mikrotiterplatten. **Fe<sup>2+</sup>**, Eisen(II)-lösungen; **K**, Kontrollen; **P**, Plasmaproben; **B**, Bindwert.

# 4 Ergebnisse und Diskussion

## 4.1 Validierung des FRAP-Tests

### 4.1.1 Präzision

Zur Überprüfung von Reproduzierbarkeit und Präzision des FRAP-Tests wurden die Intraassay- sowie Interassay-Variationskoeffizienten ermittelt. Die Intraassayvarianz gibt den Grad der Streuung innerhalb eines Versuchsansatzes an. Die 10er-Bestimmung ( $n=10$ ) wurde an einer Referenzplasmaprobe durchgeführt. Die Interassayvarianz zeigt die Messwertstreuung eines Testverfahrens an verschiedenen Messtagen. Die Bestimmung erfolgte anhand der täglichen Messung einer Troloxkontrolllösung ( $1000 \mu\text{mol/L}$ ) im Duplikat ( $n=2$ ) in einem Zeitraum von 5 Tagen. Mittelwerte ( $\bar{x}$ ), Standardabweichung ( $SD$ ) sowie Variationskoeffizient ( $\%CV$ ) sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Tabelle 4.1: Reproduzierbarkeit des FRAP-Tests (Intraday und Interday Varianz). Mittelwert ( $\bar{x}$ ) und Standardabweichung ( $SD$ ) in  $\mu\text{mol/L}$ .

	$n$	$\bar{x}$	$SD$	$\%CV$
<b>Intraday (Referenzplasma)</b>	<b>10</b>	<b>812,6</b>	<b>36,75</b>	<b>4,52</b>
Tag 1 (Trolox)	2	2078,2	34,86	1,68
Tag 2 (Trolox)	2	1986,2	66,47	3,35
Tag 3 (Trolox)	2	2044,5	78,21	3,83
Tag 4 (Trolox)	2	2119,2	44,97	2,12
Tag 5 (Trolox)	2	2213,2	77,50	3,50
<b>Interday (Trolox)</b>	<b>5</b>	<b>2088,3</b>	<b>85,15</b>	<b>4,08</b>

Der FRAP-Test ist demnach sehr reproduzierbar, sowohl Intraday- als auch Interdayvariationskoeffizient liegen unter 5%. Vergleichbare Werte für Intraday- bzw. Interdayvariationskoeffizient (2,6% bzw. 4,0%) zeigen sich in den Untersuchungen von

Firuzi et al. (2005), welche den FRAP-Test ebenfalls an 96-Well Mikrotiterplatten adaptierten.

Die hohe Präzision bzw. Reproduzierbarkeit zeichnen den FRAP-Test gegenüber komplexeren Methoden zur Erfassung der antioxidativen Kapazität (z. B. ORAC-Assay) aus.

### 4.1.2 Linearität

Die Linearität der Methode wurde mittels einer  $\text{Fe}^{2+}$ -Standardlösung sowie einer Troloxlösung geprüft. Im Konzentrationsbereich von 100 - 2000  $\mu\text{mol/L}$  konnte ein linearer Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration gezeigt werden. Die Korrelationskoeffizienten waren in jedem Ansatz sowohl bei Trolox als auch bei der  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung  $\geq 0,99$  (Siehe Abbildung 4.1).

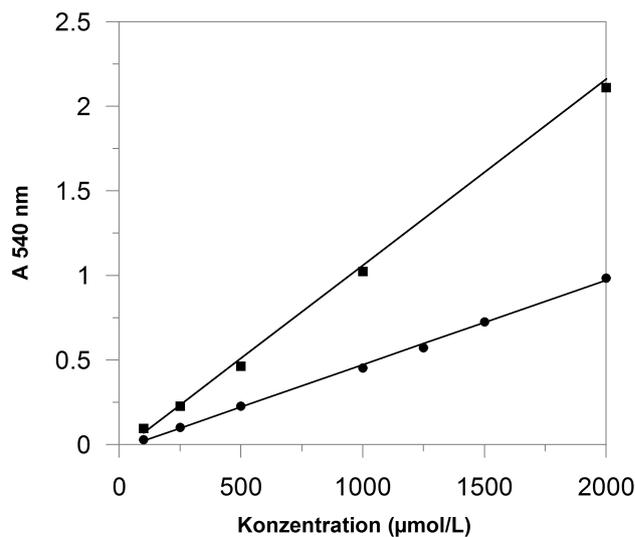


Abbildung 4.1: Linearität des FRAP-Tests. Dosis-Wirkungsbeziehung einer  $\text{Fe}^{2+}$ -Lösung (●) und einer Troloxlösung (■)

Abbildung 4.1 zeigt nicht nur die lineare Dosis-Wirkungsbeziehung der Lösungen, sondern verdeutlicht auch den Aktivitätsunterschied (unterschiedliche Steigung der Geraden) zwischen den zwei Lösungen. Die relative Aktivität von Trolox liegt etwa bei 2, d.h. 1 mol Trolox ist in der Lage 2 mol  $\text{Fe}^{3+}$  zu reduzieren. So zeigt beispielsweise eine Konzentration von 1000  $\mu\text{mol/L}$  Trolox einen Absorptionswert von 1; Das kommt einer  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration von 2000  $\mu\text{mol/L}$  gleich (Siehe 4.1). Ein Troloxäquivalent entspricht also zwei  $\text{Fe}^{2+}$ -äquivalenten (FRAP).

Troloxäquivalente haben sich als Standardeinheit für die antioxidative Kapazität durchgesetzt. Eine Umrechnung der FRAP-Werte erfordert demnach die Berücksichtigung dieses Aktivitätsfaktors. Benzie & Strain (1996) zeigen, dass die relative Aktivität von Ascorbinsäure,  $\alpha$ -Tocopherol und Harnsäure ebenfalls bei 2 liegt. Die Aktivität von Bilirubin beträgt 4, die von Albumin ist sehr gering. Die geringe Aktivität von Albumin im FRAP-Assay wurde von Benzie & Strain (1998) positiv bewertet, da Proteine die Erfassung der antioxidativen Kapazität störend beeinflussen können (Prior et al., 2003).

### 4.1.3 Nachweisgrenze

Benzie & Strain (1998) definieren die untere Nachweisgrenze des FRAP-Wertes bei 2  $\mu\text{mol/L}$ .

## 4.2 Vorversuche zum FRAP-Assay

Der im Rahmen dieser Diplomarbeit etablierte FRAP-Assay basiert auf der von Benzie & Strain (1996) entwickelten Originalmethode. Sowohl Messwellenlänge als auch der Messzeitpunkt wurden jedoch modifiziert, um die Methode an den Mikroplattenreader *Fluostar Optima* zu adaptieren. Die Einstellungen am Gerät ließen Messungen am Absorptionsmaximum nicht zu, weshalb an der verfügbaren Wellenlänge von 540 nm gemessen wurde. Außerdem wurden die Absorptionsänderung  $\Delta A_{540}$  nicht über einen Zeitraum von 4 min (Benzie & Strain, 1996), sondern von 6 min bestimmt (Benzie & Strain, 1998). Im Rahmen der Vorversuche konnten adäquate Kontroll- bzw. Referenzsubstanzen für den FRAP-Assay identifiziert werden.

### 4.2.1 Kontrollsubstanzen

Auswahl und Einsatz geeigneter Kontrollsubstanzen ist bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität von großer Bedeutung. Durch die laufende Messung von Kontrollen soll während der Tests die Zuverlässigkeit von Ergebnissen gewährleistet werden. Kontrollsubstanzen sollen eine hohe Stabilität aufweisen sowie strukturverwandt mit den zu untersuchenden Substanzen sein. Die Vielfalt an Testverfahren sowie verschiedene Problemstellungen im Studiendesign machen den Einsatz verschiedener Referenzsubstanzen notwendig. Trolox hat sich dabei aufgrund seiner Wirksamkeit in hydrophilen und lipophilen Systemen bewährt (Nenadis et al., 2007)

und wurde auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Im Rahmen der Vorversuche wurden unter anderem auch Harnsäure und Ascorbinsäure auf ihre Eignung als Kontrolle untersucht. Der Einsatz von Harnsäure wird aufgrund ihres schlechten Löslichkeitsverhaltens ausgeschlossen. Obwohl die Suspension rund 2 Stunden in einem Ultraschallbad behandelt wurde, löste sich Harnsäure nicht vollständig. Untersuchungen an Ascorbinsäure zeigten, dass sie aufgrund ihrer schnellen Abbaukinetik nicht geeignet ist. Durch den raschen Abbau der Lösung wäre eine tägliche Herstellung der Kontrollsubstanz erforderlich. Eine Bestätigung dieser Ergebnisse zeigt sich auch in der Arbeit von Nenadis et al. (2007).

### 4.2.2 Wellenlänge

Die Absorptionsmessung von Kontroll- und Standardlösungen sowie der Plasma-proben erfolgte im Mikroplattenreader *Fluostar Optima* bei einer Wellenlänge von 540 nm. Der von Benzie & Strain (1996) entwickelte FRAP-Test musste an die zu Verfügung stehenden optischen Filter angepasst werden. Das Absorptionsmaximum des  $\text{Fe}^{2+}$ -komplexes liegt bei 593 nm. Zur Auswahl standen zwei Filter für Wellenlängen von 540 und 620 nm. Durch eine photometrische Bestimmung des Absorptionsspektrums der  $\text{Fe}^{2+}$ (TPTZ)-Lösung konnte bei 540 nm eine höhere Absorption nachgewiesen werden. Von einer Verwendung des 620 nm Filters wurde demnach abgesehen.

### 4.2.3 Reaktionskinetik

Die Reaktionskinetik hängt stark von der zu untersuchenden Probe sowie von Testbedingungen ab und kann nicht allgemein definiert werden. Pulido et al. (2000) zeigen, dass bei bestimmten Antioxidantien wie etwa Polyphenole erst nach 30 Minuten das Ende der FRAP-Reaktion ersichtlich ist. Eine Beobachtung der Reaktionskinetik im Reaktionsverlauf ist demnach notwendig.

Für die automatisierte Durchführung des FRAP-Tests schlagen Benzie & Strain (1996) eine Reaktionsdauer von 4 Minuten vor, da die Absorption nach dieser Zeit stabil ist. In einer späteren Publikation (Benzie & Strain, 1998) empfehlen dieselben Autoren ein Zeitfenster von 6 Minuten für den manuell bei Raumtemperatur durchgeführten FRAP-Assay. Harnsäure weist bei der manuellen Durchführung eine etwas langsamere Reaktionskinetik auf, demnach ist eine längere Reaktionszeit erforderlich (Benzie & Strain, 1998).

Die Frage nach der optimalen Reaktionsdauer bei gegebenen Testbedingungen kann durch die vorliegende Literatur nicht eindeutig beantwortet werden; sie sollte daher im Rahmen der Untersuchungen geklärt werden. Die zeitliche Änderung der Absorption der Referenzplasmaprobe wurde in Intervallen von 36 s (in einem Zeitraum von 6 min) gemessen. Abbildung 4.2 zeigt den Verlauf der Reaktion der Referenzplasmaprobe mit dem Eisen-TPTZ-Redoxsystem. Die Extinktion nimmt anfangs relativ rasch zu und erreicht etwa nach 288 s (= 4,48 min) ein Plateau.

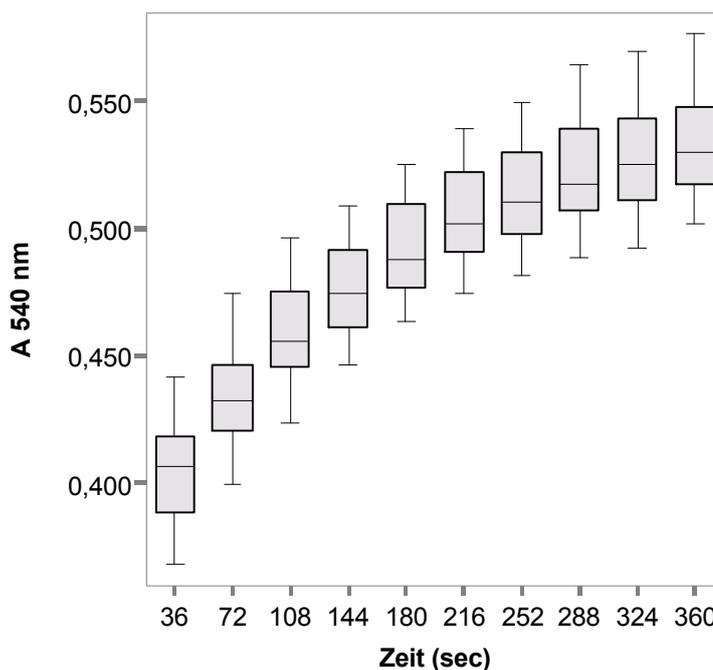


Abbildung 4.2: Reaktionskinetik des FRAP-Assays einer Plasmaprobe. Boxplots der FRAP-Werte einer 10er Bestimmung durchgeführt an einer Referenzplasmaprobe.

Die statistische Auswertung des Absorptionsverlaufs in der Zeit erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA und anschließendem LSD-Test (Post Hoc Test). Die p-Werte (Irrtumswahrscheinlichkeit der Null-Hypothese) zu den verschiedenen Messzeitpunkten sind in Tabelle 4.2 angegeben. Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Messzeitpunkten wurden als statistisch signifikant eingestuft, wenn der p-Wert  $< 0,05$  war. In der vorliegenden Untersuchung konnte beobachtet werden, dass die Reduktion des Eisen-TPTZ-Komplexes bereits vor den 6 min abgeschlossen war. Ab 288 s waren die Absorptionsänderungen pro Zeitintervall nicht mehr signifikant ( $p > 0,05$ ), sodass man von einer abgeschlossenen Reaktion sprechen konnte.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Bestimmung des FRAP-Wertes bei den vorliegenden Testbedingungen die Extinktion nach 6 Minuten herangezogen. Der

Abschluss der Reaktion ist zu diesem Zeitpunkt gesichert. Aus den Ergebnissen der Voruntersuchungen zeigt sich auch, dass eine Verkürzung des Zeitfensters auf 5 Minuten für eine weitere Optimierung des FRAP-Tests zulässig wäre.

Tabelle 4.2: p-Werte der verschiedenen Messzeitpunkte.

Zeit(s)	36	72	108	144	180	216	252	288	324	360
<b>36</b>										
<b>72</b>	0,000									
<b>108</b>	0,000	0,000								
<b>144</b>	0,000	0,000	0,006							
<b>180</b>	0,000	0,000	0,000	0,022						
<b>216</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,040					
<b>252</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	<b>n.s.</b>				
<b>288</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	<b>n.s..</b>			
<b>324</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,036	<b>n.s.</b>		
<b>360</b>	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	<b>n.s.</b>	<b>n.s.</b>	

n.s. = statistisch nicht signifikant

### 4.3 Ergebnisse des FRAP-Assays der Plasmaproben

Der FRAP-Test wurde für die Beurteilung der antioxidativen Kapazität im Plasma von Triathleten eingesetzt. Dazu wurden 42 Plasmaproben von den Athleten untersucht, welche am *Ironman Austria 2006* teilgenommen haben (siehe Kapitel 3). Die Blutproben wurden 2 d vor dem Ironman, unmittelbar danach sowie an den Tagen 1, 5 und 19 nach dem Ironman entnommen. Mit Hilfe des FRAP-Assays sollte geklärt werden, wie sich diese Ultraausdauerbelastung auf die antioxidative Kapazität auswirkt.

Abbildung 4.3 zeigt den zeitlichen Verlauf der *Ferric Reducing Antioxidant Power* während des Beobachtungszeitraumes. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (n=42) zu den fünf Blutabnahmeterminen. Es handelt sich dabei

um die nicht „plasmavolumskorregierten“ FRAP-Werte. Anders als bei den Parametern zur Bestimmung des oxidativen Stresses (Neubauer et al., 2008) wurden bei der Bestimmung der antioxidativen Kapazität die realen FRAP-Werte angegeben (d.h. es wurden keine Korrekturen bezüglich belastungsinduzierter Plasmavolumsänderungen vorgenommen). Die vier Postrace-Termine wurden mittels t-Test mit dem Prerace-Termin verglichen.

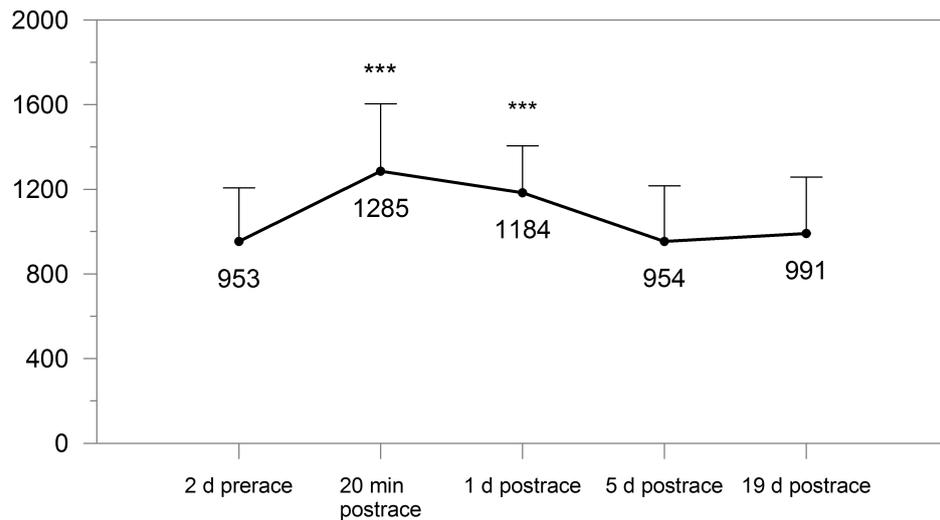


Abbildung 4.3: Änderungen der ferric reducing antioxidant power (FRAP)[µmol/L] (prerace zu postrace).

Unmittelbar nach dem Bewerb (20 min postrace) wurde ein signifikanter Anstieg (+35%,  $p < 0,001$ ) der FRAP-Werte bzw. der antioxidativen Kapazität im Plasma gemessen. Etwa einen Tag nach dem Bewerb lag die antioxidative Kapazität immer noch 24% über dem Ausgangswert. Fünf und neunzehn Tage nach dem Bewerb befanden sich die FRAP-Werte wieder auf dem Niveau der Prerace-Messungen (siehe Abbildung 4.3).

Vergleichbare Ergebnisse wurden bei Studien von Liu et al. (1999) sowie Vasankari et al. (1997) beobachtet. Sie berichteten von einem signifikanten Anstieg der antioxidativen Kapazität im Anschluss an einen Marathonwettbewerb. Allerdings detektierten Liu et al. (1999) noch am vierten Tag einen signifikanten Anstieg der antioxidativen Kapazität. Die vorliegenden Ergebnisse konnten an dem fünften Tag keinen derartigen Anstieg feststellen. Die antioxidative Kapazität wurde in beiden Arbeiten über die *total radical trapping capacity of plasma* (TRAP) erfasst.

Der Anstieg der antioxidativen Plasmakapazität im Allgemeinen ist ein Effekt auf die akute körperliche Belastung und -wie im Folgenden diskutiert wird- auch abhängig von der Leistungsfähigkeit und somit dem Trainingsstaus der Athleten (Neubauer

et al., 2008). Diese Veränderungen resultieren in erster Linie aus einer erhöhten Mobilisierung aus Speicherorten bzw. einer erhöhten Zufuhr an Antioxidantien im Rahmen der Wettkampfernährung sowie aus verschiedenen Stoffwechselreaktionen (z. B. Purinmetabolismus) (Mastaloudis et al., 2004; Finaud et al., 2006; Neubauer et al., 2008).

Abbildung 4.3 zeigt zusätzlich, dass die Bestimmung der antioxidativen Kapazität vor allem bei Interventionsstudien aussagekräftige Daten liefert. Der Verlauf der FRAP-Werte während des Beobachtungszeitraumes ermöglicht so einen guten Vergleich zwischen antioxidativer Kapazität vor dem Wettkampf und antioxidativer Kapazität unmittelbar nach dem Triathlon.

### 4.3.1 FRAP und antioxidativ wirkende Substanzen

Für die Auswertung wurden die FRAP-Werte der 20 min postrace Messung von den Ausgangswerten (2 d prerace) abgezogen. Es konnte eine signifikante Korrelation ( $r = 0,733$ ;  $p < 0,001$ ) zwischen dem Anstieg der FRAP-Werte (pre to postrace) und dem Anstieg der Harnsäure (pre to postrace) gezeigt werden (siehe Abbildung 4.4). Dieser Anstieg steht im Einklang mit den Ergebnissen von Liu et al. (1999) und Mastaloudis et al. (2004), welche eine starke Beeinflussung der antioxidativen Kapazität durch den Harnsäurespiegel beschreiben. Benzie & Strain (1996) schätzen den Beitrag der Harnsäure an der *Ferric Reducing Ability* des Plasmas auf 60%.

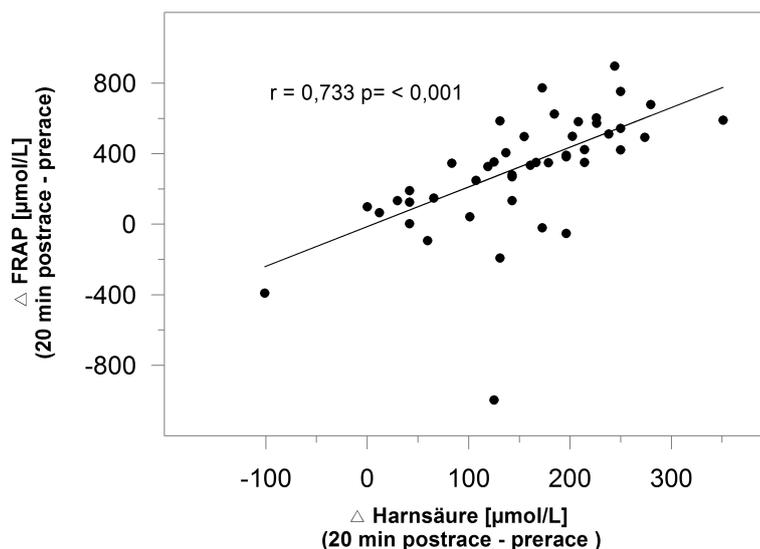


Abbildung 4.4: Korrelation zwischen FRAP und Harnsäure der 42 Triathleten.

Harnsäure ist ein wichtiges wasserlösliches Antioxidans im Muskel sowie im Plasma (Finaud et al., 2006). Der Anstieg der Harnsäurekonzentration resultiert aus dem

erhöhten Energiebedarf bei intensiver körperlicher Belastung und den damit verbundenen gesteigerten Purinstoffwechsel (Finaud et al., 2006; Koenig et al., 2001). Der erhöhte ATP-Bedarf führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase, welche aus 2 ADP ein ATP und ein AMP bildet. Das ATP dient als Energielieferant, das AMP wird über den Purinstoffwechsel zu *Harnsäure* abgebaut (Mastaloudis et al., 2004). Liu et al. (1999) beschrieben in ihrer Arbeit zudem eine Beeinträchtigung der renalen Clearance als mögliche Ursache für den Anstieg der Harnsäurekonzentrationen.

Die Aufnahme von nutritiven Antioxidantien während des Wettkampfes zeigte keinen Einfluss auf die beobachteten FRAP-Werte. Eine Korrelation zwischen der Vitamin C- bzw.  $\alpha$ -Tocopherol-Aufnahme und dem Anstieg der antioxidativen Kapazität (pre to postrace) konnte nicht nachgewiesen werden. Untersuchungen von Neubauer et al. (2008) am gleichen Studienkollektiv weisen auf einen Effekt der Aufnahme von Vitamin C ( $393 \pm 219$  mg) während des Ironman-Triathlons auf TEAC hin. Eine ähnliche Wechselwirkung konnte durch den FRAP-Assay nicht beobachtet werden.

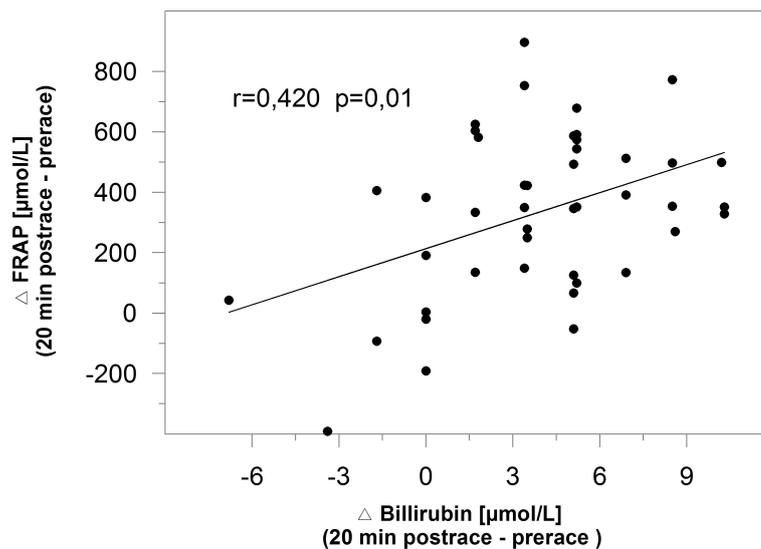


Abbildung 4.5: Korrelation zwischen FRAP und Bilirubin der 42 Triathleten

Eine schwache aber signifikante Korrelation ( $r = 0,363$ ;  $P < 0,05$ ) konnte zwischen Gesamtprotein (2 d prerace) und eisenreduzierender Kapazität (2 d prerace) gezeigt werden. Bereits Benzie & Strain (1996) weisen in ihrer Arbeit auf eine schwache antioxidative Aktivität von Protein (10 %) im FRAP-Test hin, welche auf die Reaktionsbedingungen zurückgeführt werden kann. Die *ferric reducing ability* des Plasmas wird bei einem pH-Wert von 3,6 durchgeführt. Die schwache Aktivität kann folglich durch den Effekt des niedrigen pH-Wertes auf Plasmaproteinthiole erklärt werden. Cao et al. (1993) bzw. Yeum et al. (2004) weisen in ihren Studien darauf hin, dass Proteine bestimmte antioxidative Effekte maskieren können. Der FRAP-Test

hat demnach den Vorteil, dass Protein die Testreaktion kaum störend beeinflusst (Benzie & Strain, 1998).

### 4.3.2 FRAP und leistungsphysiologische Parameter

FRAP zeigte einen Zusammenhang mit dem Alter der Athleten. Der Zusammenhang wurde durch den Vergleich der Werte 19 d-Postrace erfasst. Hinweise auf eine Abnahme antioxidativer Schutzsysteme mit zunehmenden Alter liegen aufgrund einer negativen Korrelation vor (siehe Tabelle 4.3).

In der vorliegenden Arbeit konnten außerdem Korrelationen zwischen leistungsphysiologischen bzw. trainingsassoziierten Parametern und der antioxidativen Kapazität gefunden werden (siehe Tabelle 4.3). Die höchstmögliche Sauerstoffaufnahme (engl. peak power output), die individuelle anaerobe Schwelle (IAT, engl. individual anaerobic treshold), die relative individuelle anaerobe Schwelle (Rel. IAT) sowie die Laktatschwelle (LT) korrelierten positiv mit der antioxidativen Kapazität. Die vorliegende Untersuchung zeigte demnach, dass die antioxidative Kapazität mit zunehmender Leistung (bei höchstmöglicher Sauerstoffaufnahme) sowie mit einer Erhöhung der anaeroben Schwelle ansteigt.

Zwischen *Finisherzeit* und antioxidativer Kapazität konnte eine negative Korrelation beobachtet werden.

Tabelle 4.3: Signifikante Assoziationen zwischen FRAP und leistungsphysiologischen Parametern

	FRAP prerace	FRAP 20 min postrace	FRAP 1d postrace	FRAP 5d postrace	FRAP 19d postrace
Age(yr)	-0,301**			-0,370*	-0,418**
Peak PO( $W_{peak}$ )		0,350*		0,356*	
LT(W)		0,351*		0,451**	0,322*
IAT(W)		0,363*		0,414**	
Rel. IAT(W/kg)				0,352*	
total race time (h:min:s)		-0,422**			

Diese Beobachtung weist auf einen Zusammenhang zwischen belastungsinduzierter antioxidativer Kapazität und Leistungsvermögen bzw. Trainingsstatus der Athleten hin.

Frühere Studien (Liu et al., 1999) weisen bereits auf eine höhere antioxidative Kapazität bei trainierten und folglich leistungsfähigeren Athleten hin.

### 4.3.3 FRAP und Marker für oxidativen Stress

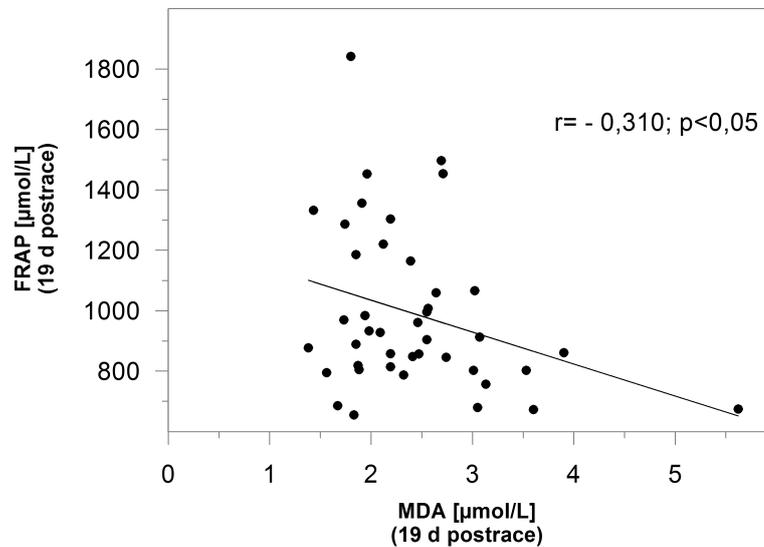


Abbildung 4.6: Korrelation zwischen FRAP und Malondialdehyd bei den 42 Ironman-Triathleten

Im Rahmen der Arbeit von Neubauer et al. (2008) wurden am selben Studienkollektiv verschiedene Marker für oxidativen Stress gemessen. Dabei zeigte sich, dass eine intensive körperliche Belastung zu einer erhöhten Bildung freier Radikale und folglich zu oxidativem Stress führt. Diese oxidative Wirkung freier Radikale wurde z. B. am Anstieg des Markers für Lipidperoxidation Malondialdehyd (MDA) beobachtet.

In der vorliegenden Diplomarbeit konnte eine signifikante negative Korrelation zwischen Malondialdehyd und FRAP ( $r=-0,310$   $p<0,05$ ), gemessen 19 Tagen nach dem Bewerb, gefunden werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass das antioxidative Schutzsystem oxidativen andauernden sowie erstzunehmenden Schäden entgegenwirken kann. Es ist in der Lage freie Radikale (nach 19 d) zu neutralisieren.

## 4.4 Vergleich der *in vitro* Assays FRAP, ORAC und TEAC

In vorliegender Diplomarbeit wurde die antioxidative Kapazität über die Bestimmung der eisenreduzierenden Fähigkeit erfasst. Im Rahmen einer weiteren Diplomarbeit von Barbara Stadlmayr (*Implementation of a microplate based assay for the*

*assessment of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC)*) wurde die antioxidative Kapazität derselben Plasmaproben durch die *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (ORAC) untersucht. Neubauer et al. (2008) bestimmten die antioxidative Kapazität über den TEAC-Assay. Die drei Messmethoden zeigten innerhalb des untersuchten Studienkollektivs ähnliche Verläufe der antioxidativen Kapazität (siehe Abbildung 4.7). Unmittelbar nach dem Bewerb sowie einen Tag nach dem Ironman zeigten ORAC-, TEAC- sowie FRAP-Assay einen Anstieg der antioxidativen Kapazität. Fünf bzw. neunzehn Tage nach dem Bewerb näherten sich die antioxidativen Aktivitäten wieder dem Ausgangswert an (siehe Abbildung 4.3).

Bereits Cao et al. (1993) haben diese drei Messmethoden zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität miteinander verglichen. Sie fanden eine schwache, aber signifikante Korrelation zwischen ORAC- und FRAP-Assay. Zwischen TEAC und FRAP wurde keine Korrelation gezeigt. Die schwachen bzw. ausbleibenden Korrelationen der Ergebnisse waren laut Cao et al. (1993) zu erwarten, da die angewandten Assays Unterschiede im Reaktionsmechanismus (SET- bzw. HAT-Mechanismus), im verwendeten Substrat sowie Mess- und Quantifizierungsmethode aufweisen. ORAC und TEAC messen die antioxidative Kapazität über die Hemmung freier Radikale, die zuvor durch eine Radikalquelle generiert werden müssen. Der FRAP-Assay hingegen erfasst die antioxidative Kapazität über die reduktive Fähigkeit von Antioxidantien in dem  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ -Redoxsystem. Verschiedene Antioxidantien tragen mit unterschiedlicher Gewichtung zur antioxidativen Kapazität bei (siehe Tabelle 4.4). Harnsäure übernimmt im FRAP-Assay etwa 60 % der antioxidativen Aktivität, während Protein über diese Testmethode kaum erfasst wird (Dotan et al., 2004).

Tabelle 4.4: Beitrag von Plasmaantioxidantien an die antioxidative Kapazität im FRAP, ORAC und TEAC (Yeum et al., 2004)

Antioxidantien	FRAP	ORAC	TEAC
<i>Wasserlösliche Antioxidantien</i>			
<b>Protein/SH-Gruppen/Albumin</b>	10 %	27,8 %	28,0 %
<b>Harnsäure</b>	60 %	7,1 %	19,3 %
<b>Ascorbinsäure</b>	15 %	1,3 %	3,1 %

Durch die vorliegende Arbeit konnten die Beobachtungen von Cao et al. (1993) teilweise bestätigt werden. Zwischen ORAC- und FRAP- Assay wurde eine signifikante Korrelation gefunden. Der signifikante Zusammenhang zwischen den Methoden bestätigte sich sowohl im Anstieg von 2 d prerace zu 20 min postrace ( $r=0,403$ ;  $p<0,01$ )

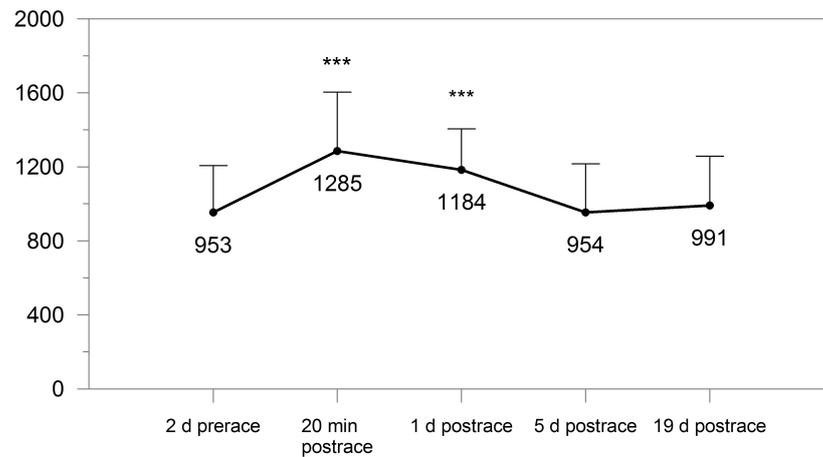
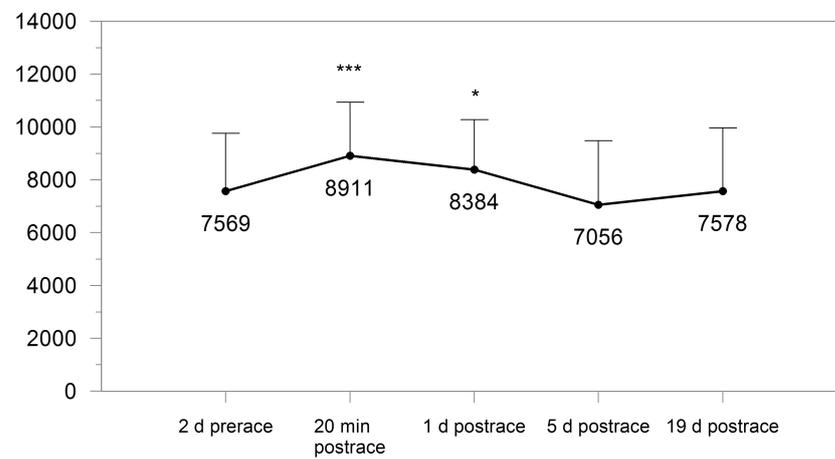
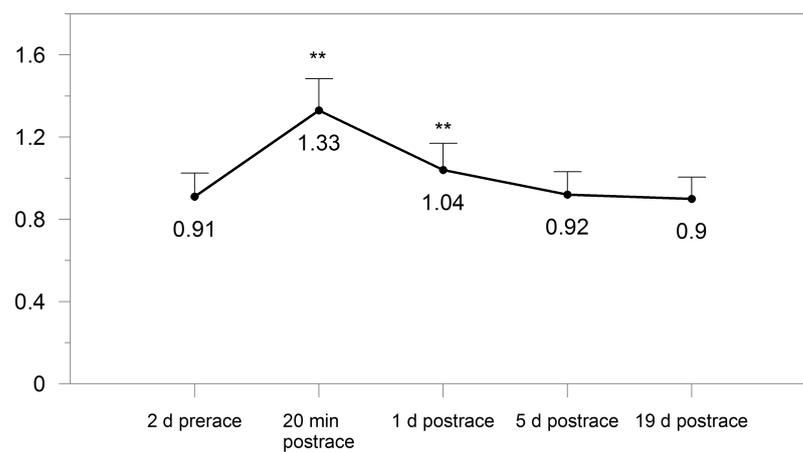
(a) FRAP ( $\mu\text{mol/L}$ )(b) ORAC ( $\mu\text{mol TÄ/L}$ )(c) TEAC ( $\mu\text{mol TÄ/L}$ )

Abbildung 4.7: FRAP, ORAC und TEAC im Vergleich von 42 Triathleten

als auch im Vergleich zwischen den einzelnen Terminen ( $r=0,358$ ;  $p<0,05$  bei FRAP und ORAC prerace).

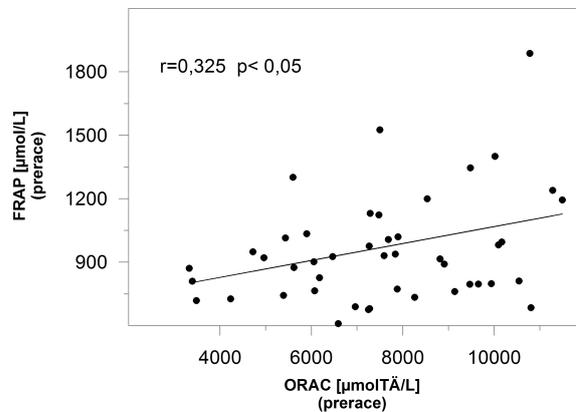


Abbildung 4.8: Korrelation zwischen FRAP und ORAC bei 42 Triathleten

Weiters konnte in der vorliegenden Diplomarbeit eine schwache Korrelation ( $p<0,05$ ;  $r=0,318$ ) zwischen TEAC (20 min postrace) und FRAP (20 min postrace) gezeigt werden.

Dabei zeigte sich bei allen drei Methoden eine Korrelation (siehe Abschnitt 4.3.1 bzw. vgl. mit Diplomarbeit von Barbara Stadlmayr (*Implementation of a microplate based assay for the assessment of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC)*) und Neubauer et al. (2008)) zwischen dem Anstieg der Harnsäure und dem Anstieg der antioxidativen Kapazität. Daraus kann gefolgert werden, dass die unterschiedlichen Tests sensitiv auf diese Antioxidans sind. Ein linearer Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der drei Methoden kann demnach durch den Einfluss der Harnsäure erklärt werden.

Zu beachten ist jedoch, dass jedes Testverfahren lediglich Auskunft über die antioxidative Kapazität in Bezug auf spezielle Reaktionsbedingungen gibt. Für eine umfassende Bewertung von Antioxidantienstatus sowie oxidativem Stress ist demnach die Verwendung verschiedener Messmodelle empfehlenswert, die die antioxidative Gesamtkapazität messen und zudem auch die Bestimmung isolierter Antioxidantien sowie Biomarker für oxidative Schädigung umfassen (Finaud et al., 2006; Prior & Cao, 1999).

## 5 Schlussbetrachtung

In der vorliegenden Arbeit wurde der FRAP-Assay als ein anerkannter Standardtest zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität an den Mikroplattenreader *Fluostar Optima* adaptiert. Dabei erwies sich der FRAP-Assay als einfache und hoch reproduzierbare Methode zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität im Plasma. Der Einsatz dieser Testmethode erfordert weder einen hohen finanziellen noch einen großen arbeitstechnischen Aufwand. Für die Methode reicht die Standard-Ausstattung eines biochemischen Labors aus, mit Ausnahme des Mikroplattenanalysegeräts. Durch den Einsatz von Mikrotiterplatten und der relativ kurzen Reaktionskinetik von 6 Minuten ermöglicht er eine sehr hohe Probendurchsatzrate (etwa 150 Proben pro Tag).

Der FRAP-Assay besitzt weiters verschiedene methodische Vorteile gegenüber anderen Tests. Antioxidantien können direkt in einer Plasmaprobe gemessen werden, indem die reduktive Fähigkeit erfasst wird. Bei anderen Methoden wird die antioxidative Aktivität hingegen über die Hemmung von bestimmten reaktiven Spezies gemessen, welche zuvor im Reaktionsgemisch generiert werden müssen. Die Ergebnisse hängen somit stark von der Art des eingesetzten Radikals ab. Die Bestimmung der antioxidativen Kapazität beim FRAP-Test erfolgt außerdem im Gesamtplasma und nicht in isolierten Plasmafraktionen wie etwa im LDL.

Bei der Interpretation der Ergebnisse zur untersuchten antioxidativen Kapazität muss jedoch beachtet werden, dass der FRAP-Test bei einem pH-Wert von 3,6 durchgeführt wird. Die Bestimmung des Antioxidantienstatus erfolgt demnach nicht unter physiologischen Bedingungen. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass bestimmte Antioxidanten wie Thiole und Proteine nur in sehr geringem Umfang erfasst werden. Das kann einerseits zu einer Unterschätzung der antioxidativen Kapazität verleiten, andererseits ergibt sich der Vorteil, dass Protein die Testreaktion nicht störend beeinflusst. Im Gegensatz zu vielen anderen Methoden müssen sie nicht durch Fällung aus der Probe entfernt werden.

Der zweite Teil der Diplomarbeit umfasste die Anwendung der adaptierten Methode

zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität im Plasma von Ironman-Triathleten. Dabei wurde die „ferric reducing antioxidant power“ zwei Tage vor dem Ironman-Triathlon, 20 Minuten nach dem Bewerb sowie 1, 5 und 19 Tage nach dem Wettkampf gemessen. Der Verlauf der antioxidativen Kapazität als Reaktion auf den Ironman-Triathlon sowie dessen Verhalten in der Regenerationsphase konnten dabei beobachtet werden.

Bereits Neubauer et al. (2008) konnten im Rahmen dieses Projekts zeigen, dass eine intensive körperliche Ausdauerbelastung mit einer erhöhten Bildung freier Radikale und somit mit vermehrten oxidativen Stress assoziiert werden kann. Weiters konnten die Autoren neben dem Anstieg des oxidativen Stresses aber auch ein Ansteigen der antioxidativen Kapazität (TEAC) sowie einzelner antioxidativ wirkender Parameter beobachten.

Diese Ergebnisse konnten durch die vorliegende Diplomarbeit bestätigt werden. Die antioxidative Kapazität stieg unmittelbar nach dem Bewerb signifikant an und lag etwa einen Tag nach dem Bewerb immer noch signifikant über dem Ausgangswert. 5 und 19 Tage nach dem Bewerb hingegen näherten sich die FRAP-Werte wieder dem Ausgangswert an.

Der belastungsinduzierte Anstieg der antioxidativen Kapazität kann mit dem Trainingstatus sowie der Leistungsfähigkeit der Athleten in Zusammenhang gebracht werden. Außerdem kann die antioxidative Kapazität auf eine erhöhte Mobilisierung von Antioxidantien aus Speicherorten sowie einer erhöhten Zufuhr an antioxidativ wirkenden Substanzen während der sportlichen Belastung zurückgeführt werden. Es konnte zudem bestätigt werden, dass der Anstieg der FRAP-Werte vor allem auf den Anstieg der Harnsäure zurückzuführen ist. Schätzungen zufolge trägt die Harnsäure mit 60 % zu den FRAP-Werten bei. Die Messergebnisse konnten ferner zeigen, dass regelmäßiges körperliches Training eine Adaptierung antioxidativer Schutzsysteme induzieren und somit zu einer erhöhten Toleranz gegenüber der Bildung freier Radikale führen kann. Durch vorliegende Daten kann letztendlich gezeigt werden, dass eine intensive physische Ausdauerbelastung im Ausmaß eines Ironman-Triathlons ohne ernsthafte Veränderungen wie andauernden oxidativen Stress zu bewältigen ist. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die Verbesserung antioxidativer Schutzsysteme durch nachhaltige Trainingsstrategien zurückzuführen.

Ein umfassendes Bild der antioxidativen Kapazität kann nur durch den Einsatz verschiedener Messmodelle zur Erfassung der antioxidativen Aktivität erreicht werden. Im Rahmen dieses Projekts wurde die antioxidative Kapazität über drei verschiedene Messmodelle (FRAP, ORAC und TEAC) erfasst. Der Vergleich der Methoden

ergab ähnliche Ergebnisse im Verlauf der antioxidativen Kapazität. Die Analyse der Korrelationen zwischen den einzelnen Methoden deuten jedoch nur auf schwache Zusammenhänge hin, welche durch Unterschiede im Reaktionsmechanismus, im verwendeten Substrat sowie auf Unterschiede der Mess- und Quantifizierungsmethoden zurückzuführen sind.



## 6 Zusammenfassung

Intensive körperliche Aktivität ist nachweislich mit einer vermehrten Bildung freier Radikale sowie der Gefahr von oxidativem Stress verbunden. Freie Radikale schädigen allerdings nicht grundsätzlich. Ihre Wirkung kann über antioxidative Schutzsysteme des Körpers neutralisiert werden. Regelmäßiges Training kann zu einer Anpassung antioxidativer Schutzsysteme gegenüber oxidativem Stress beitragen. Die vorliegende Arbeit soll über die Bestimmung der antioxidativen Kapazität im Plasma von Triathleten klären, ob derartige Adaptierungsprozesse tatsächlich stattfinden. Zur Quantifizierung der antioxidativen Kapazität wurde eine Testmethode den Bedingungen der vorliegenden Fragestellung angepasst. Die Anforderungen an den Test beinhalteten die allgemeine Beschreibung des Antioxidantienstatus im Plasma der Ironman-Triathleten. Zugleich sollte eine Akzeptanz der Ergebnisse und eine hohe Probendurchsatzrate gewährleistet werden.

Für dieses Vorhaben wurde der FRAP (ferric reducing ability of plasma)-Test eingesetzt: durch die Verwendung des Mikroplattenlesegeräts Fluostar Optima in Kombination mit 96-Well Platten ermöglichte dieser die Analyse von 100 bis zu 150 Proben pro Tag. Mit Hilfe der Methode wurde die antioxidative Kapazität von Ironman-Triathleten zwei Tage vor dem Ironman-Triathlon, 20 Minuten, 1, 5 und 19 Tage nach dem Bewerb gemessen.

Mithilfe des FRAP-Tests konnte bestätigt werden, dass es beim Studienkollektiv unmittelbar nach dem Bewerb zu einem Anstieg der antioxidativen Kapazität kommt ( $p < 0,001$ ). Einen Tag nach dem Bewerb lagen die Werte immer noch signifikant über dem Ausgangswert ( $p < 0,001$ ). Nach fünf Tagen näherten sie sich wieder dem Ausgangsniveau an.

Vergleiche mit isoliert analysierten Antioxidantien zeigen einen starken Zusammenhang der FRAP Werte mit dem Harnsäurespiegel im Plasma ( $r = 0,733$ ;  $p < 0,001$ ). Exogene Antioxidantien wie Vitamin C sind in den Resultaten der Methode nicht signifikant repräsentiert.

Die eingesetzte Methode ist für die Erfassung der antioxidativen Kapazität im Plasma gut geeignet und ist mit der standardmäßigen Ausstattung eines Labors gut durchführbar. Mit Hilfe von statistischen Analysen konnte bestätigt werden, dass der FRAP-Test hochreproduzierbare Ergebnisse ( $CV < 5\%$ ) liefert. Außerdem erwies sich die Methode als kostengünstig, schnell und einfach in ihrer Handhabung.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass unser Studienkollektiv keinem lang andauernden oxidativen Stress ausgesetzt ist. Zu betonen ist jedoch der ausgezeichnete Trainingszustand des Testkollektivs, ohne den diese Art von Belastung kaum zu bewältigen wäre.

## 7 Summary

Intensive physical exercise is demonstrably linked with an increased formation of free radicals, as well as with the risk of oxidative stress. However, free radicals are basically not harmful. Their effect can be neutralized through the antioxidant defense system of the body. Regular physical training can contribute to an adaptation of the antioxidant defense system towards oxidative stress. The present work should clarify if such adaptation processes really take place by determining the antioxidant capacity in the plasma of triathletes. A test method was adapted for the present issue in order to quantify the antioxidant capacity. The requirements on the test include the general description of the antioxidant capacity status in the plasma of Ironman triathletes. Moreover a high sample throughput should be provided.

For this intention, the FRAP ( ferric reducing ability of plasma) assay was applied: the microplate reader Fluostar Optima in combination with 96 well microplates led to a sample throughput of 150 samples a day. Within this method, the antioxidant capacity of ironman triathletes was determined 2 days prerace, as well as 20 minutes, 1, 5 and 19 days postrace.

The FRAP assay made it possible to confirm that there exists an augmentation of the antioxidant capacity in the study collective, immediately postrace ( $p < 0,001$ ). The values remained significantly elevated also 1d postrace ( $p < 0,001$ ). After 5 days the values turned to prerace conditions.

Comparisons with isolated antioxidants demonstrate a significant correlation between the FRAP values and the uric acid in plasma ( $r = 0,733$ ;  $p < 0,001$ ). Exogenous antioxidants, such as ascorbic acid, are less strong representative in the results of the method.

The applied method is appropriate for the determination of the antioxidant capacity in plasma and can be carried out with the standard equipment of a laboratory. Statistical analysis it could be confirmed that the FRAP assay provides highly reproducible results ( $CV < 5\%$ ). Moreover the method turned out to be cheap, fast and simple to handle.

The present work demonstrates that our study collective is not exposed to a persistent oxidative stress. This effect is probably due to the excellent training stauts of the athletes.

# A Ergebnisse des FRAP-Assay

Tabelle A.1: FRAP Werte des Studienkollektivs in  $\mu\text{mol/L}$

<b>n</b>	<b>2d prerace</b>	<b>20 min postrace</b>	<b>1 d postrace</b>	<b>5 d postrace</b>	<b>19 d postrace</b>
1	902	1581	1210	1182	1304
2	1194	1738	1512	614	806
3	1200	1693	1412	1009	1186
4	680	1086	1256	872	970
5	1401	1913	1717	1082	962
6	1887	1835	1580	978	1453
7					
8					
9	1346	1155	1372	1573	1497
10	1240	848	1083	1011	1333
11	931	1353	1161	1036	819
12	938	1288	958	846	913
13	1526	2023	1486	1944	1842
14	982	1365	1495	1205	1287
15	996		1156	1040	1165
16	1301	1647	1229	1320	1356
17	727	853	862	629	656
18	798	1423	1082		
19					
20	1015	1019	921	1400	1221
21	921	964	1113	762	795
22	676	1026	913	838	673
23	827	1155	1071	721	934

<b>n</b>	<b>2 d prerace</b>	<b>20 min postrace</b>	<b>1 d postrace</b>	<b>5 d postrace</b>	<b>19 d postrace</b>
24	743	892	757	704	675
25	811	1393	1472	949	889
26	610	1184	1054	969	996
27	977	1730	1404	913	929
28	761	861	1036	1304	1454
29	875	1772	1049	936	1008
30	734	1233	1019	720	788
31	1020	1442	937		
32	1124	1104	1306	745	846
33	810	1001	1193	780	849
34	1035	942	1393	987	1060
35	685	935	960	825	757
36	718	1491	917	675	686
37	773	1360	1296		
38	796	863	882	734	803
39	797	931	1065	788	861
40	690	1281	1123	791	680
41	916	1051	1027	815	803
42	926	1260	1230	997	857
43	891	1242	1275	766	815
44	1131	1735	1609	1053	1067
45	949	1303	1157	808	984
46	1007	1286	1270	969	905
47	871	1141	1114	927	878
48	765	1156	1152	829	858

# B Einstellungen der Software

Tabelle B.1: Einstellungen an der FLUOstar OPTIMA Software Version 1.20-0

<i>Setup</i>	
<b>Reader Configuration</b>	Absorbance
<i>Basic Parameters</i>	
<b>Test name</b>	FRAP
<b>Microplate</b>	Sterlin 96
<b>General Settings:</b>	
Positioning delay	0,5 s
No. of kinetic windows	1
<b>Kinetic Window 1:</b>	
No. of cycles	10
Measurement start time	1 s
No. of flashes per well and cycle	20
Cycle time	36 s
Total measurement time	6 min, 8s
<b>Filter Settings:</b>	
No of multichromatics	1
Excitation filter	A-540
Emission filter	empty
Gain	1591
<b>Well scanning</b>	none
<b>Pause before cycle</b>	0

<i>Layout</i>	
<b>Content</b>	S , C , B , X
<b>Group</b>	on
<b>Index:</b>	
Start value	1
	Increase
<b>Replicates:</b>	
Number of repeated samples	2
Direction	Horizontal
Reading direction	Positon 3
<i>Concentrations/Volumes/Shaking</i>	
<b>Concentration</b>	Entered manually
<b>Shaking Options:</b>	
Mode	Orbital
Shaking width	7 mm
Additional shaking	Before first cycle
Shaking time	5 s
<i>Temperature Control</i>	
37°C	Incubator on
<i>Measure</i>	
<b>Plate in/ Plate out Selected protocol</b>	FRAP
<b>Plate Identification</b>	entered manually
<b>Gain ajustement</b>	automatic
<b>Start test run</b>	
<b>Calculation range</b>	10

S = standard, C = control, B = blanc, X = sample

# Literaturverzeichnis

- Aldini, G., Yeum, K. ., Russell, R. M., & Krinsky, N. I. (2001). A method to measure the oxidizability of both the aqueous and lipid compartments of plasma. *Free Radical Biology and Medicine*, 31(9), 1043–1050.
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127(1), 183–198.
- Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (frap) as a measure of 'antioxidant power': The frap assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.
- Benzie, I. F. F. & Strain, J. J. (1998). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15–27.
- Benzie, I. F. F. & Szeto, Y. T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 633–636.
- Bloch, W. & Schmidt, A. (2004). Sport und freie Radikale. *Blickpunkt der Mann*, 2(3), 13–18.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Breusing, N. & Grune, T. (2008). Analytik von oxidativem Stress - was ist gesichert? *Aktuelle Ernährungsmedizin*, 33(3), 106–115.
- Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 303–311.

- Cao, G., Verdon, C. P., Wu, A. H. B., Wang, H., & Prior, R. L. (1995). Automated assay of oxygen radical absorbance capacity with the cobas fara ii. *Clinical Chemistry*, 41(12), 1738–1744.
- Clarkson, P. M. & Thomson, H. S. (2000). Antioxidans: what role do they play in physical activity and health? *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(suppl), 637–646.
- Cooper, C. E., Vollaard, N. B., Choueiri, T., & Wilson, M. T. (2002). Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 30(2), 280–285.
- Dotan, Y., Lichtenberg, D., & Pinchuk, I. (2004). Lipid peroxidation cannot be used as an universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research*, 43(3), 200–227.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82(1), 47–95.
- Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative stress: Relationship with exercise and training. *Sports Medicine*, 36(4), 327–358.
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by „ferric reducing antioxidant power“ assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1721(1-3), 174–184.
- Frankel, E. N. & Meyer, A. S. (2000). The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(13), 1925–1941.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., & Scaccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: Critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(11), 1106–1114.
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002a). Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin as the solubility enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 1815–1821.

- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002b). High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (orac) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4437–4444.
- Jackson, P., Loughrey, C. M., Lightbody, J. H., McNamee, P. T., & Young, I. S. (1995). Effect of hemodialysis on total antioxidant capacity and serum antioxidants in patients with chronic renal failure. *Clinical Chemistry*, 41(8), 1135–1138.
- Jenkins, R. R. (2000). Exercise and oxidative stress methodology: A critique. *American Journal of Clinical Nutrition*, 72(2 SUPPL.), 670S–674S.
- Ji, L. L. (1999). Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 222(3), 283–292.
- Knez, W. L., Coombes, J. S., & Jenkins, D. G. (2006). Ultra-endurance exercise and oxidative damage : implications for cardiovascular health. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 36(5), 429–441.
- Knez, W. L., Jenkins, D. G., & Coombes, J. S. (2007). Oxidative stress in half and full ironman triathletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 39(2), 283–288.
- Koenig, D., Wagner, K. ., Elmadfa, I., & Berg, A. (2001). Exercise and oxidative stress: Significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress. *Exercise Immunology Review*, 7, 108–133.
- Kujala, U. M., Marti, P., Kaprio, J., Hernelahti, M., Tikkanen, H., & Sarna, S. (2003). Occurrence of chronic disease in former top-level athletes: Predominance of benefits, risks or selection effects? *Sports Medicine*, 33(8), 553–561.
- Liu, M. ., Bergholm, R., Mäkimattila, S., Lahdenperä, S., Valkonen, M., Hilden, H., Yki-Järvinen, H., & Taskinen, M. . (1999). A marathon run increases the susceptibility of ldl to oxidation in vitro and modifies plasma antioxidants. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 276(6 39-6), E1083–E1091.
- Llesuy, S., Evelson, P., Campos, A. M., & Lissi, E. (2001). Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures. a critical review. *Biological Research*, 34(2), 51–73.
- Magalhaes, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1–19.

- Margaritis, J., Tessier, F., Richard, M. ., & Marconnet, P. (1997). No evidence of oxidative stress after a triathlon race in highly trained competitors. *International Journal of Sports Medicine*, 18(3), 186–190.
- Mastaloudis, A., Morrow, J. D., Hopkins, D. W., Devaraj, S., & Traber, M. G. (2004). Antioxidant supplementation prevents exercise-induced lipid peroxidation, but not inflammation, in ultramarathon runners. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(10), 1329–1341.
- Miller, N. J., Diplock, A. T., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science*, 84(1), 407–412.
- Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., & Rice-Evans, C. A. (1996). Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters*, 384(3), 240–242.
- Nenadis, N., Lazaridou, O., & Tsimidou, M. Z. (2007). Use of reference compounds in antioxidant activity assessment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5452–5460.
- Neubauer, O., Koenig, D., Kern, N., Nics, L., & Wagner, K.-H. (2008). No indication of persistent oxidative stress in response to an ironman triathlon. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 40(12), 2119–2128.
- Nieß, A. M., Striegel, H., Hipp, A., Hansel, J., & Simon, P. (2008). Antioxidant supplementation in sports - sense or non-sense? *Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin*, 59(3), 55–61.
- Nieman, D. C., Henson, D. A., McAnulty, S. R., McAnulty, L., Swick, N. S., Utter, A. C., Vinci, D. M., Opiela, S. J., & Morrow, J. D. (2002). Influence of vitamin c supplementation on oxidative and immune changes after an ultramarathon. *Journal of Applied Physiology*, 92(5), 1970–1977.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(10), 4619–4626.
- Packer, L. (1997). Oxidants, antioxidant nutrients and the athlete. *Journal of Sports Sciences*, 15(3), 353–363.

- Pedersen, B. K. & Saltin, B. (2006). Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 16(SUPPL. 1), 3–63.
- Powers, S. K., DeRuisseau, K. C., Quindry, J., & Hamilton, K. L. (2004). Dietary antioxidants and exercise. *Journal of Sports Sciences*, 22(1), 81–94.
- Powers, S. K., Ji, L. L., & Leeuwenburgh, C. (1999). Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: A brief review. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 31(7), 987–997.
- Price, J. A., Sanny, C. G., & Shevlin, D. (2006). Application of manual assessment of oxygen radical absorbent capacity (orac) for use in high throughput assay of „total“ antioxidant activity of drugs and natural products. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54(1).
- Prior, R. L. & Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11-12), 1173–1181.
- Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (oracfl)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(11), 3273–3279.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302.
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396–3402.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved abts radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231–1237.
- Roberts, C. K. & Barnard, R. J. (2005). Effects of exercise and diet on chronic disease. *Journal of Applied Physiology*, 98(1), 3–30.
- Sachdev, S. & Davies, K. J. A. (2008). Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radical Biology and Medicine*, 44(2), 215–223.

- Sarna, S. & Kaprio, J. (1994). Life expectancy of former elite athletes. *Sports Medicine*, 17(3), 149–151.
- Sen, C. K. (2001). Antioxidants in exercise nutrition. *Sports Medicine*, 31(13), 891–908.
- Sies, H. (2007). Total antioxidant capacity: Appraisal of a concept. *Journal of Nutrition*, 137(6), 1493–1495.
- Skenderi, K. P., Tsironi, M., Lazaropoulou, C., Anastasiou, C. A., Matalas, A. ., Kanavaki, I., Thalmann, M., Goussetis, E., Papassotiriou, I., & Chrousos, G. P. (2008). Changes in free radical generation and antioxidant capacity during ultra-marathon foot race. *European Journal of Clinical Investigation*, 38(3), 159–165.
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay, Z., & Nagy, G. (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*, 28(4), R41–R55.
- Suzuki, K., Peake, J., Nosaka, K., Okutsu, M., Abbiss, C. R., Surriano, R., Bishop, D., Quod, M. J., Lee, H., Martin, D. T., & Laursen, P. B. (2006). Changes in markers of muscle damage, inflammation and hsp70 after an ironman triathlon race. *European Journal of Applied Physiology*, 98(6), 525–534.
- Tsao, R., Yang, R., & Young, J. C. (2003). Antioxidant isoflavones in osage orange, *maclura pomifera* (raf.) schneid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6445–6451.
- Urso, M. L. & Clarkson, P. M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1-2), 41–54.
- Van Den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., Van Den Berg, H., & Bast, A. (1999). Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (teac) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. *Food Chemistry*, 66(4), 511–517.
- Vasankari, T. J., Kujala, U. M., Vasankari, T. M., Vuorimaa, T., & Ahotupa, M. (1997). Increased serum and low-density-lipoprotein antioxidant potential after antioxidant supplementation in endurance athletes. *American Journal of Clinical Nutrition*, 65(4), 1052–1056.
- Vina, J., Gomez-Cabrera, M., Lloret, A., Marquez, R., Minana, J. B., Pallardo, F. V., & Sastre, J. (2000). Free radicals in exhaustive physical exercise: Mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life*, 50(4-5), 271–277.

- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., Barclay, L. R. C., & Locke, S. J. (1987). The relative contributions of vitamin e, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *BBA - General Subjects*, 924(3), 408–419.
- Winston, G. W., Regoli, F., Dugas Jr., A. J., Fong, J. H., & Blanchard, K. A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 24(3), 480–493.
- Yeum, K. J., Russell, R. M., Krinsky, N. I., & Aldini, G. (2004). Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430(1), 97–103.

## Judit Valentini *curriculum vitae*

Geburtsdatum 20. August 1981  
Geburtsort Bruneck (BZ)  
Wohnhaft in Wien  
Staatsbürgerschaft Italienisch

### Ausbildung

10/2007 Beginn der Diplomarbeit zum Thema "Entwicklung einer Mikrotiterplatten basierten Methode zur Bestimmung der Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP)", unter der Betreuung von Dr. A.o.Univ.-Prof. Karl-Heinz Wagner  
12/2005 Beginn des zweiten Studienabschnittes mit dem Wahlschwerpunkt Ernährungsökonomie an der *Universität Wien*  
11/2005 Abschluss der ersten Diplomprüfung.  
10/2002 Beginn des Studiums *Ernährungswissenschaften* an der *Universität Wien*  
10/2001 - 06/2002 Studium der *Pharmazie* an der *Universität Innsbruck*  
07/2001 Matura an der deutschsprachigen Lehrerbildungsanstalt *Josef Gasser*, Brixen, Italien.

### Ausbildungsbezogene Praktika

seit 10/2008 *Universität Wien, Institut für Ernährungswissenschaften, Wien*  
Übungstutorin  
02/2007 - 03/2007 *Universität Wien, Institut für Ernährungswissenschaften, Wien*  
Praktikantin unter der Betreuung von Dr. A.o.Univ.-Prof. Karl-Heinz Wagner  
05/2007 *Jahrestagung und Generalversammlung der Österreichischen Arbeitsgemeinschaft Zöliakie, Amstetten*  
Vertretung der Firma *Dr. Schär*  
03/2007 *Diätologen Kongress, Wien*  
Vertretung der Firma *Dr. Schär*  
07/2006 - 10/2006 *Dr. Schär GmbH/Srl, Burgstall, Italien*  
Praktikantin in der Abteilung *Marketing professional*

### Sprachliche Kenntnisse

Ladinisch Muttersprache  
Deutsch fließend in Wort und Schrift  
Italienisch fließend in Wort und Schrift  
Englisch fortgeschritten

Wien, 8. Februar 2009