

# Can physical stress be measured in urine using the parameter antioxidative potential?

## Abstract

Although regular exercise is known to promote health, it is also well known that competitive sports can lead to an increase of free radical production, and thus to a drop in antioxidative potential. Thus, the present study examined the effect of competitive sports on the antioxidative potential (AOP).

Using chemoluminescence, the AOP was measured in the spontaneous urine of leisure and semi-professional athletes during a training camp. Further, the parameters creatinin and uric acid were measured.

It was shown that physical stress led to a drop in the antioxidant potential of up to approximately 50%. To compensate for this decline, special antioxidant food is recommended.

**Keywords:** physical stress, radicals, antioxidant potential, antioxidant capacity, sports

Hicham Benkhai<sup>1</sup>  
Sandra Lemanski<sup>2</sup>  
Harald Below<sup>1</sup>  
Jens Uwe Heiden<sup>3</sup>  
Elke Below<sup>4</sup>  
Jürgen Lademann<sup>5</sup>  
Manfred Bornewasser<sup>2</sup>  
Theo Balz<sup>6</sup>  
Christine Chudaske<sup>7</sup>  
Axel Kramer<sup>1</sup>

1 Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Ernst Moritz Arndt University, Greifswald, Germany

2 Institute of Psychology, Chair of Social Psychology, Greifswald, Germany

3 Research Association Mecklenburg-West Pomerania, Greifswald, Germany

4 Institute of Forensic Science, Ernst Moritz Arndt University, Greifswald, Germany

5 Department of Dermatology, Venerology and Allergology, Charité, Berlin, Germany

6 Institute of Sport Science, University Rostock, Germany

7 Institute of Psychology, Ernst Moritz Arndt University, Greifswald, Germany

## Introduction

The antioxidant system is a mechanism which protects the body's cells against endogenous and exogenous free radicals, and establishes an equilibrium that allows endogenous radicals to perform necessary cell functions, while preventing damaging effects by exogenous radicals [1]. This results in a decrease of toxic radical effects and decreased damage to the organism. Substances which react

with radicals and neutralize their radical nature are termed antioxidants [2]. The antioxidative metabolic system is complex and connected to many other metabolic systems of the body. A developing imbalance can cause diseases or aggravate existing ones. It has been proven that the activity of the immune system is strongly connected to the antioxidant metabolic system [3], [4], [5]. Similarly, there is a broad consensus that physical stress leads to radical formation (among other things) [6], so that the

formation of free radicals is much higher during physical stress than during resting (basal) phases [7]. Under training conditions, up to 5% of the oxygen molecules taken up are converted into superoxide radicals [8]. In addition, a local inflammatory reaction in the muscle tissue can lead to increased formation of free radicals. This is caused by the infiltration of leukocytes into the stress-inflamed muscle tissue [9], where the leukocytes produce free radicals, which function as second messengers [10]. The consequence of radical formation is decreased antioxidative potential.

In vivo detection of radicals is hardly possible, since they are extremely reactive and short-lived. Nevertheless, different biological markers exist which are the reaction products of radicals, e.g., oxidized guanosine (8-oxo-dG), is a marker for radical-damaged DNA, and is excreted in the urine; exhaled ethane is a marker for the lipoperoxidation of n-3 fatty acids by radicals [11], [12]; and the  $\beta$ -carotin content is a measure of the antioxidative potential of the skin [13], [14], [15].

Substances that can react with radicals by interrupting the radical chain reaction have a reductive (an antioxidative) character. The sum of the antioxidative substances available in a system is called the AOP (antioxidative potential), a term which was introduced 1989 by Popov and Lewin [16]. The AOP is determined by a set of compounds which are present in different concentrations [16], [17]. It is expedient to differentiate between the antioxidative capacity of water-soluble (ACW) and fat-soluble components (antioxidative capacity of lipid soluble components, ACL). The ACW value is usually given in ascorbic acid equivalents, and the ACL usually in Trolox equivalents.

AOP is represented by different substances in different biological systems. In humans, blood, plasma, uric acid, ascorbic acid, bilirubin-bound albumin, and ceruloplasmin are regarded as the main components of the ACW [18]. The biological value of these compounds can differ widely. In plasma, uric acid is the chief component of the AOP. A further important component of the AOP is ascorbic acid. If the AOP is measured as a sum parameter, for instance, with chemoluminescence, a number of unknown compounds which likewise work as radical inhibitors will also be measured.

As opposed to normal, recreational sports or exercise, is competitive sports are a form of stress for the human body [19]. In psychology, stress is defined as a continuous adverse situation, the avoidance of which appears subjectively important, but the individual lacks the certainty of being able to terminate it [20]. One must differentiate between controllable positive stress and uncontrollable negative stress. Medically speaking, stress is a factor which endangers an individual's health. If the sympathetic nervous system is activated by stress, the body increases its release of the stress hormones adrenalin and noradrenalin. Stress can also exert negative effects via the hormone cortisol. In addition, stress leads to the generation of free radicals [21], [22]. The clinical chemical measurement of hormones is complex and the correlation with total stress is frequently questionable. The parameter

AOP could represent an alternative to this, since it is easily detectable as a sum parameter and provides a measure of the radical load. Therefore, the present study examined whether the AOP is suitable as a screening parameter to measure physical stress.

## Materials and methods

Two separate studies were conducted. Study I took place during a recreational Tae kwondo training camp. 17 subjects (14 men, 3 women) participated. For 8 days, the participants completed two 1.5-hour training units per day. Two urine samples per participant and day were collected, one in the morning before training and one in the evening after the second training unit. The samples were coded and frozen immediately at  $-20^{\circ}\text{C}$ . In addition, the body weight, blood pressure and pulse of each subject were recorded. In the urine samples, the parameters  $\text{AOP}_{\text{total}}$ , uric-acid-independent AOP (AOPU) were determined, as well as the uric acid and creatinine content. Before analysis, the samples were allowed to thaw overnight in the refrigerator and were centrifuged after mixing briefly, in order to separate suspended matter and sediment.

The participants in study II were five male Taekwondo athletes (Taekwondo) preparing for a championship. The training level of these athletes was higher than that of the participants in study I and the load much more intensive. In contrast to the participants in study I, all Taekwondo were uniformly trained and received exactly the same diet. The study lasted 5 days. All parameters were measured and substances sampled using the same procedures as in study I.

$\text{AOP}_{\text{total}}$  and AOPU were determined by means of chemoluminescence using a Photochem<sup>®</sup> device (Analytik Jena, Jena, Germany). The software version 5.1.12 was used. Photometric measurements were taken with the spectrometer Ultrospec 4000 (Pharmacia Biotech, Sweden). The chemicals employed had p.a. quality unless noted otherwise. For all investigations, high-purity water was used (Reinstwasser-System, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel, Germany). The uricase used (Serva, Heidelberg, Germany) had an activity of 4.43 U/mg. The reaction solution made of it was good for 7 h at  $4^{\circ}\text{C}$ .

For the determination of the  $\text{AOP}_{\text{total}}$  and the AOPU, the ACW kit (Analytik Jena, Jena) was used. The uric acid was determined with the "5+1 fluid uric acid kit" (MTI DIAGNOSTICS), and creatinine with the DRI<sup>®</sup> Creatinine Detect<sup>®</sup> test (microgenetics GmbH).

To determine the  $\text{AOP}_{\text{total}}$ , the reagents contained in the kit – R 1 (diluent), R 2 (buffer pH 14), R 3 (photosensitizer) and R4 (ascorbic acid calibration solution) – were used in the quantities indicated in Table 1.

The centrifuged urine diluted for the ACW x and 1:10 for the AOPU. The measurement temperature was  $4^{\circ}\text{C}$ . For AOPU determination, 10  $\mu\text{l}$  uricase solution (8 U/10 $\mu\text{l}$ ) was added to 10  $\mu\text{l}$  of the centrifuged and diluted urine

**Table 1: Determination of AOP<sub>total</sub> and AOPU with the ACW kit (Analytik Jena)**

Reagent	G 1 Diluent	R 2 Buffer pH 14	R 3 photo sensitizer	R4 Ascorbic acid	Urine sample	Uricase
Volume	(µl)					
blank value	1500	1000	25	–	–	–
Calibration	1500	1000	25	5–30	–	–
AOP <sub>total</sub>	1500	1000	25	–	5–10	–
AOPU	1500	1000	25	–	10 sample +10 Uricase solution	

**Table 2: Descriptive statistics of the results of study I (mg/g creatinine)**

Parameter		Uric acid	AOP <sub>total</sub>	AOPU
N		189	189	189
Average value		203.5	497.2	85.4
Median		166.3	292.7	54.1
Std. Deviation		160.3	703.4	95.8
Minimum		2.24	19.1	4.2
Maximum		1179.5	4663.6	588.2
Percentile	25	96.3	195.2	40.4
	75	275.9	438.2	78.5

**Table 3: Percent of uric acid in the parameter AOP<sub>total</sub>**

Group Measured values	Uric acid in the AOP <sub>total</sub> (%)	Standard deviation (%)
All participants (n=17) Measured values (n=189)	75.60	9.63
Without participants under 17 years (n=12) Measured values (n=113)	77.44	3.86

sample (1:10) (Table 1). The resulting solution was then incubated for 5 min at 37 °C. Subsequently, the reagents were added according as presented in Table 1. For measurement, it is crucial that R1 and R2 be at ambient temperature. On the other hand, the photosensitizer (R3) and the ascorbic acid solution (R4) must be kept in a separate box at 4 °C until the moment it is added to the reaction mixture [23].

The ascorbic acid equivalents are calculated using the formula:

$$\text{Concentration } (\mu\text{mol/ml}) = \frac{\text{Quantity (nmol)} \times \text{diluting factor}}{\text{Pipetted volume } (\mu\text{l})}$$

The statistical analysis was performed with the program PASW Statistics 18® (IBM). The parameters were intended for the descriptive statistics, and Pearson's correlation was calculated and tested for significance.

## Results

### Study I

In the urine samples, the parameters uric acid, AOP<sub>total</sub> and AOPU were determined and standardized to the creatinine excretion. The results are summarized in Table 2. In order draw conclusions about the relation between the parameters AOP<sub>total</sub> and AOPU, the proportion of uric acid (as the difference between AOP<sub>total</sub> and AOPU) in the parameter AOP<sub>total</sub> was determined (Table 3).

For each participant, graphs were plotted of the uric acid level vs. AOP<sub>total</sub> and AOPU. Odd numbers designate the morning values and even numbers the evening values.

For all participants, the uric acid level and the AOP<sub>total</sub> correlated highly significantly ( $r=0.42$ ,  $p=0.001$ , Figure 1). One example of is shown in Figure 2.

The AOPU values were clearly below the AOP<sub>total</sub> values. Two examples are represented in Figure 3 and Figure 4. Participant 12 (21-year-old male) was selected, because

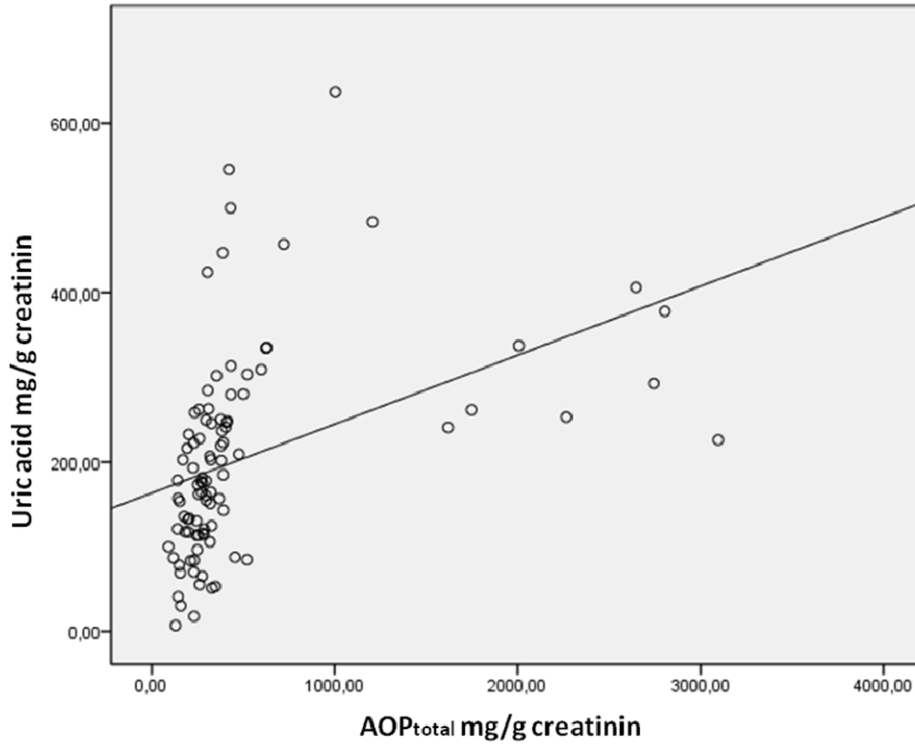


Figure 1: Correlation between uric acid and AOP<sub>total</sub>

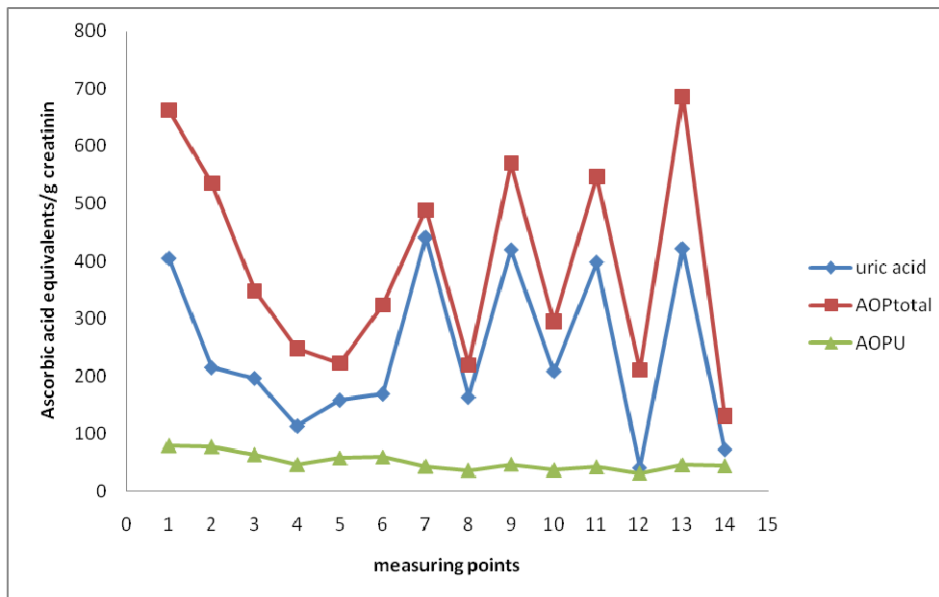


Figure 2: Uric acid levels, total antioxidative potential (AOP<sub>total</sub>) and the uric acid-independent antioxidative potential (values standardized to creatinine excretion values) in participant 12 over time

he corresponded to the typical course in study II. The other participants in study I showed very different courses. This was apparently due to various causes, such as obesity, diet, different training load and different age (5 participants under 17 years old). Figure 3 (participant 12) clearly shows that the AOPU decay to the end of the second training. After adaptation to the training load, the AOPU values rise somewhat at first, then drop again, and finally remain low with small

fluctuations. Frequently, the values are higher in the morning than in the evening (Figure 3). In the manager (male, 42 years, only organizing, no sportive activities), the AOPU exhibited different course. Up to the 5th day the values rise; afterwards, they return to approximately the initial value. In the evening, the values are frequently higher than in the morning (Figure 4).

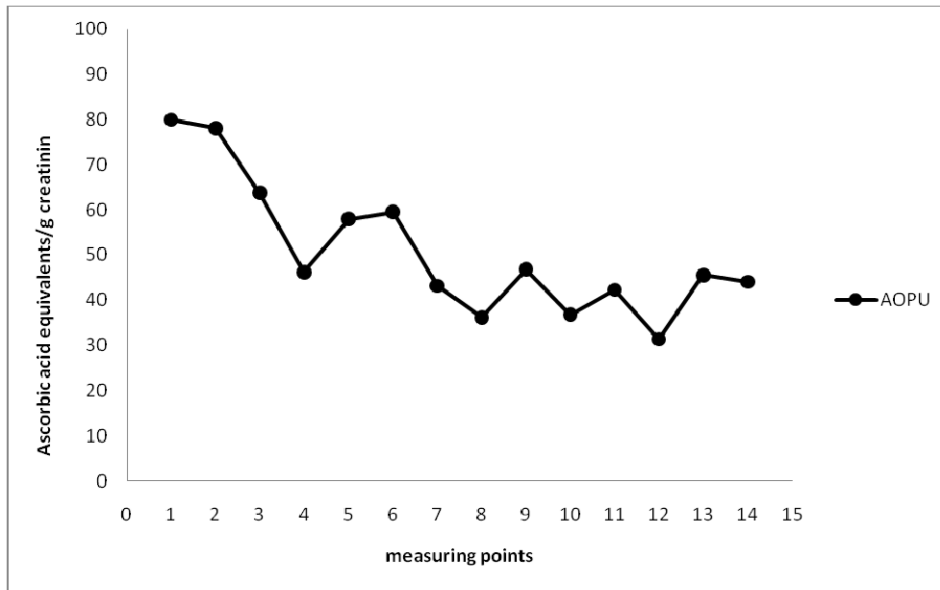


Figure 3: Uric-acid-independent antioxidative potential in participant 12 over time (standardized to creatinine excretion values)

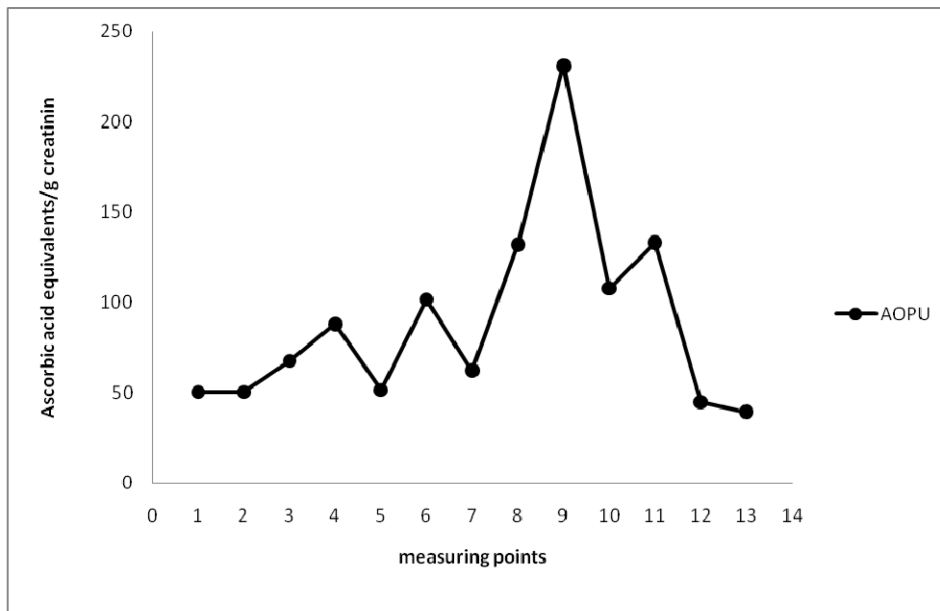


Figure 4: Course of the uric-acid-independent antioxidative potential (AOPU) of the study manager (standardized to creatinine excretion values)

## Study II

In this study, a similar reaction pattern was present in four of five participants, so that the values were averaged (Figure 5). A curve similar to that of Figure 3 results. With increasing training duration, the AOPU decreases, although starting from measuring point 4, higher values of AOPU were found in the morning than in the evening. The standard deviation shows a clear tendency to decrease from the beginning of training to the end (Figure 5).

The athlete in whom the AOPU deviated from that of the other 4 study-II participants (students or apprentices) was employed. His initial AOPU value was at about the same level of the others' initial values, but then dropped

drastically to almost zero. Despite a short recovery phase, a general decline was observed (Figure 6).

## Discussion

This study aimed to determine whether a connection exists between physical stress and change of the antioxidative potential (AOP). According to the study design, only spontaneous urine was available for analysis. Analyzing 24-h urine collection would have been preferable, but was logistically impossible. An evaluation of parameters in spontaneous urine is complicated, since this can be more or less diluted. Particularly after physical stress, as in the present study, more concentrated urine is to be

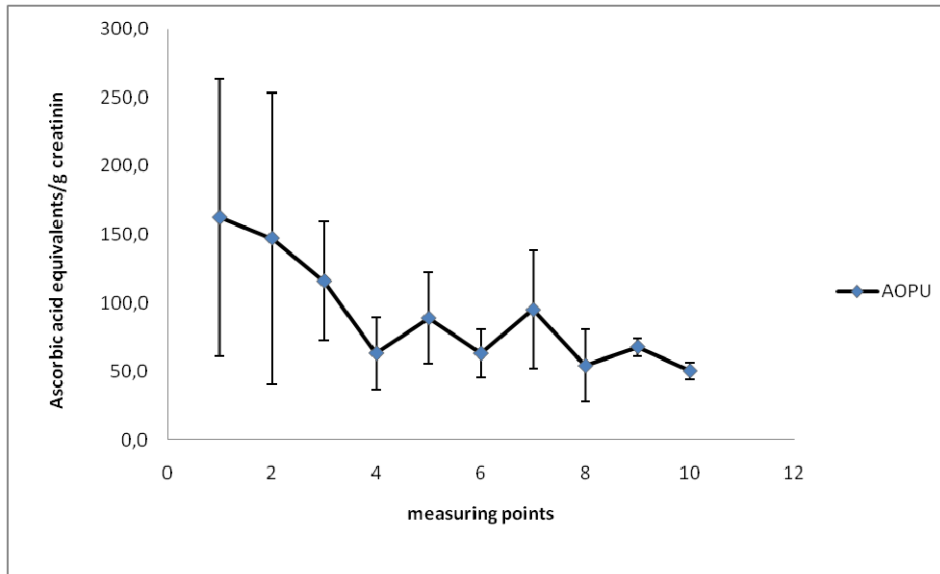


Figure 5: Average AOPU values of 4 competitive athletes in study II (standardized to creatinine excretion values)

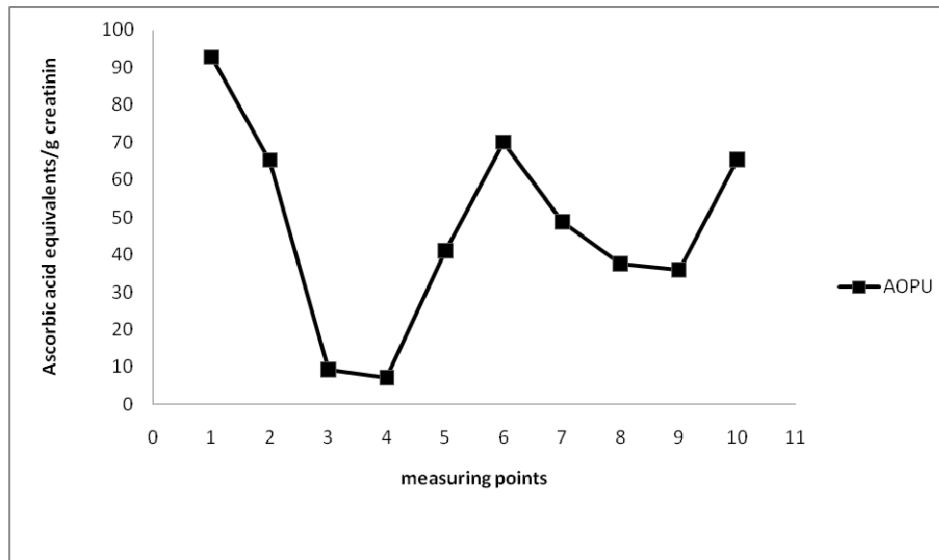


Figure 6: Deviating course of the participant's (study II) AOPU

expected due to sweating. In order to obviate this problem, the creatinine level in urine is also measured. Provided that the creatinine excretion is relatively constant over 24 h, the mean creatinine excretion can serve as a reference for the measured values excretion. Generally, an average creatinine excretion of 1 g/24 h is assumed. Similarly, reference to creatinine is common in screening for iodine deficiency, and supplies comparable results to those of 24-h urine collection [24]. Thus, all measured values were standardized to the creatinine excretion in this study. It must be borne in mind that age, sex, muscle mass, and diet all have an influence on creatinine excretion [25], and that the reference to creatinine excretion is only an approximation [26]. With children under 6–8 years of age, this method is not applicable, since less creatinine is excreted due to the small muscle mass [27]. The present study, however, did not include participants of this age group.

High scatter was found in particular for the parameters uric acid and  $AOP_{total}$  in study I (Table 2), i.e., there are large individual differences. The uric acid contents vary between 2.24 and 1179.5 mg/g creatinine with an average value of 203.5 mg/g creatinine. The  $AOP_{total}$  values range between 19.1 and 4993.6, with an average value of 497.2 mg/g creatinine. The average AOPU value is with 85.4 mg/g creatinine about 17.2% of the  $AOP_{total}$  and ranges from 4.2 to 588.2 mg/g creatinine (Table 2). A series of studies [28], [29], [30], [31] show that uric acid constitutes a substantial proportion of the  $AOP_{total}$ . However, data are lacking to date on the relationship  $AOPU/AOP_{total}$  and/or on the proportion of the  $AOP_{total}$  in urine samples that is due to uric acid. Comparisons between the two parameters are well-known only from serum and/or blood plasma. Here, the proportions range from 33 to 60% (Table 4) [28], [29], [30], [31].

**Table 4: Percent of different compounds in the AOP (composition by [28])**

Method	Ferric reducing ability of plasma [31]	Total radical trapping parameter antioxidant [30]	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity [32]	Ferric reducing ability of plasma [29]
Ascorbic acid	14	13.4	9	15
A-Tocopherol	7	6.4	3	5
Uric acid	58	47.4	33	60
Bilirubin	–		2	5
Proteins	21	12.2	43	10
Others	–	21.5	10	5

When comparing the uric acid percentages, it must be mentioned that the values were obtained with different methods. The reason for the high uric acid content found with the Total Radical Trapping Antioxidant Parameter and Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) method is that neither method differentiates between ACW and ACL, but rather determine a total value [28], [29], [30], [31]. In contrast, the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) only measured the ACL. This investigation also refers to serum. The lower uric acid content found by Miller et al. resulted from the low fat-solubility of uric acid [32], but the proportion of proteins was higher due to their higher liposolubility.

In our group of participants, the AOPU accounts for approx. 25% of the AOP<sub>total</sub>. That means that the uric acid in urine samples constitutes about 75% of the AOP (Table 3). The method used here is comparable to the TEAC method. However, differences exist in the determined parameter (ACW in our study, ACL in the TEAC method). One can assume, however, that the ACW is the crucial parameter for urine samples.

Since the AOP<sub>total</sub> reflects the uric acid level to an extent of only 77% with highly significant correlation (Figure 1), the informative value of this parameter (AOP<sub>total</sub>) for medical studies is limited. The parallel courses of the curves for uric acid and AOP<sub>total</sub> demonstrate that the parameter AOP<sub>total</sub> in urine samples essentially reflects the fluctuations of the uric acid concentration (Figure 1 and Figure 2). Due to the dominating influence of uric acid, the parameter AOP<sub>total</sub> loses considerable sensitivity, since uric acid obscures the influence of those compounds with antioxidative potential that are present at lower concentrations. Therefore, the determination of the AOPU appears more meaningful. Figure 2 clearly shows that this parameter is some orders of magnitude smaller than the AOP<sub>total</sub>. However, the individual differences were also considerable with this parameter (Table 2). The statistical evaluation of all 17 participants – an epidemiological approach as in screening for iodine deficiency – proved to provide little useful information, since individual reaction patterns arose. The elimination of the data of persons under 17 years (consideration of the deviations in the creatinine metabolism of adolescents) likewise provided little distinguishing data, due to the heterogeneity of the participants, the different training conditions, differences in diet, and lower physical load/stress than in study II

(data not shown). Rather, an evaluation of the AOP must be conducted on the individual level. This is described in the following 2 examples.

In athlete 12 (Figure 3), the body made use of AOP reserves during the adaptation phase, which tended to decrease the AOPU. Afterwards, the AOP decreased by training. At night, regeneration occurs during the resting phase, so that the values are higher in the morning than in the evening. Furthermore, it was evident that a tendency existed for the AOPU to decrease during the training camp. Due to the physical load, the body relies on its antioxidative reserves, but regeneration is not 100%.

For the study manager, who did not participate actively in training but organized the training camp, the curve progressed differently (Figure 4). The AOPU reached a maximum approximately halfway through the duration of the training camp. Contrary to athlete 12, the values were lower in the morning than in the evening. An explanation for this process might be the psychological stress of organizing each morning.

In study II, four of the athletes showed the same tendency as the participant 12 (study I). After an initial adaptation phase, in which the AOPU values dropped, the values became relatively stable, and were clearly lower at the end of the study than at the beginning. In three of the four participants, the morning values after the adjustment phase always exceeded the evening values. In the fourth participant, this was the case only on the last two days; prior to that, the morning values were lower than the evening ones. The higher morning values can be explained by the overnight recovery phase. The fourth participant organized the training camp and thus experienced high physical stress particularly at the beginning. The low morning values are thus possibly an expression of physical stress. As it happened, the one employed participant was also less physically fit. For the relatively high physical stress, the AOP reserves are apparently not sufficient.

In summary, it can be stated that the parameter AOPU is more sensitive than the parameter AOP<sub>total</sub>. For the parameter AOPU, individual curves are shown which indicate a correlation between psychological and physical stress, which were confirmed by the subjective stress level (data not shown). Under continuous physical stress, the AOPU decreases continuously. This is where preventive measures can be started, e.g., antioxidative diet (consumption of compounds with high AOP) and measures to counteract

stress (e.g., sleep, recovery). Further studies are planned, in order to examine this connection, and simultaneously analyze individual interdependencies and introduce AOPU monitoring.

## References

- Jackson MJ. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. *Proc Nutr Soc.* 1999;58(4):1001-6. DOI: 10.1017/S0029665199001317
- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 5):1147-50. DOI: 10.1042/BST0351147
- Borunov EV, Smirnova LP, Shchepetkin IA, Lankin VZ, Vasil'ev NV. Vysokaia aktivnost' antioksidantnykh fermentov v opukholi kak faktor "izbeganiia kontroliia" immunoii sistemy. High activity of antioxidant enzymes in a tumor as a factor of "avoidance of control" in the immune system. *Biull Eksp Biol Med.* 1989;107(4):467-9.
- Grimble RF. Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications. *Int J Vitam Nutr Res.* 1997;67(5):312-20.
- Seidel C, Boehm V, Vogelsang H, Wagner A, Persin C, Gleit M, Pool-Zobel BL, Jahreis G. Influence of prebiotics and antioxidants in bread on the immune system, antioxidative status and antioxidative capacity in male smokers and non-smokers. *Br J Nutr.* 2007;97(2):349-56. DOI: 10.1017/S0007114507328626
- Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;107(4):1198-205. DOI: 10.1016/S0006-291X(82)80124-1
- Sastre J, Asensi M, Gascó E, Pallardó FV, Ferrero JA, Furukawa T, Viña J. Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol.* 1992;263(5 Pt 2):R992-5.
- Askew EW. Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2002;180(2):107-19. DOI: 10.1016/S0300-483X(02)00385-2
- Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1993;265(1 Pt 2):R166-72.
- Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br Med Bull.* 1993;49(3):506-22.
- Arterbery VE, Pryor WA, Jiang L, Sehnert SS, Foster WM, Abrams RA, Williams JR, Wharam MD Jr, Risby TH. Breath ethane generation during clinical total body irradiation as a marker of oxygen-free-radical-mediated lipid peroxidation: a case study. *Free Radic Biol Med.* 1994;17(6):569-76. DOI: 10.1016/0891-5849(94)90096-5
- Zinov'eva VN, Ostrovskii OV. Svobodno-radikal'noe okislenie DNK i ego biomarker okislennyi guanozin (8-oxodG). Free radical oxidation of DNA and its biomarker oxidized guanosine(8-oxodG). *Vopr Med Khim.* 2002;48(5):419-31.
- Darvin ME, Fluhr JW, Caspers P, van der Pool A, Richter H, Patzelt A, Sterry W, Lademann J. In vivo distribution of carotenoids in different anatomical locations of human skin: comparative assessment with two different Raman spectroscopy methods. *Exp Dermatol.* 2009;18(12):1060-3. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2009.00946.x
- Darvin ME, Haag S, Meinke M, Zastrow L, Sterry W, Lademann J. Radical production by infrared A irradiation in human tissue. *Skin Pharmacol Physiol.* 2010;23(1):40-6. DOI: 10.1159/000257262
- Darvin ME, Sterry W, Lademann J. Resonance Raman spectroscopy as an effective tool for the determination of antioxidative stability of cosmetic formulations. *J Biophotonics.* 2010;3(1-2):82-8. DOI: 10.1002/jbio.200910060
- Popov I, Gäbel W, Lohse W, Lewin G, Richter E, von Baehr R. Einfluss von Ascorbinsäure in der Konservierungslosung auf das antioxidative Potential des Blutplasmas während der Lebertransplantation bei Minischweinen. The effect of ascorbic acid in preservation solutions on the antioxidative potential of blood plasma during liver transplantation in miniature swine. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe.* 1989;22(1):22-6.
- Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G. Antioxidant measurements. *Physiol Meas.* 2007;28(4):R41-55. DOI: 10.1088/0967-3334/28/4/R01
- Popov I, Lewin G. Photochemiluminescent detection of antiradical activity. VI. Antioxidant characteristics of human blood plasma, low density lipoprotein, serum albumin and amino acids during in vitro oxidation. *Luminescence.* 1999;14(3):169-74. DOI: 10.1002/(SICI)1522-7243(199905/06)14:3<169::AID-BIO539>3.0.CO;2-K
- Darvin ME, Patzelt A, Knorr F, Blume-Peytavi U, Sterry W, Lademann J. One-year study on the variation of carotenoid antioxidant substances in living human skin: influence of dietary supplementation and stress factors. *J Biomed Opt.* 2008;13(4):044028. DOI: 10.1117/1.2952076
- Mohr G. Die Bedeutung von psychischem Stress, Eustress und Ressourcen für die Gesundheitsförderung am Arbeitsplatz. Significance of psychological stress, absence of stress and resources for health promotion at the workplace. *Soz Präventivmed.* 1993;38 Suppl 2:S96-9.
- Guliaeva NV, Levshina IP. Kharakteristiki svobodnoradikal'nogo okisleniia i antiradikal'noi zashchity mozga pri adaptatsii k khronicheskomu stressu [Characteristics of free-radical oxidation and antiradical protection of the brain in adaptation to chronic stress]. *Biull Eksp Biol Med.* 1988;106(8):153-6.
- Kugler HG. Stress führt zu Krankheiten. Diagnostisches Centrum für Mineralanalytik und Spektroskopie DCMS GmbH. DCMS-News. 2006;2. Available from: [http://www.diagnostisches-centrum.de/Publikationen/DCMS-News/DCMS-News\\_PDF/News\\_06\\_Juni.pdf](http://www.diagnostisches-centrum.de/Publikationen/DCMS-News/DCMS-News_PDF/News_06_Juni.pdf)
- Analytik Jena AG. Bestimmung der wasserlöslichen antioxidativen Kapazität in Blutplasma (ACW). 2000.
- Zöllner H, Als C, Gerber H, Hampel R, Kirsch G, Kramer A. Screening for iodine deficiency: Iodide concentration or creatinine quotient in random urine? *GIT Laboratory Journal.* 2001;5(3):138-9.
- Gunn IR. Biological variation of serum and urine creatinine and creatinine clearance. *Ann Clin Biochem.* 1989;26 ( Pt 3):302-3.
- Brauer VF, Below H, Kramer A, Führer D, Paschke R. The role of thiocyanate in the etiology of goiter in an industrial metropolitan area. *Eur J Endocrinol.* 2006;154(2):229-35. DOI: 10.1530/eje.1.02076
- Thamm M, Ellert U, Thierfelder W, Liesenkötter KP, Völzke H. Jodversorgung in Deutschland. Ergebnisse des Jodmonitorings im Kinder- und Jugendgesundheitsurvey (KiGGS) [Iodine intake in Germany. Results of iodine monitoring in the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2007;50(5-6):744-9. DOI: 10.1007/s00103-007-0236-4



28. Severin E, Nave B, Ständer M, Ott R, Traupe H. Total antioxidative capacity is normal in sera from psoriasis patients despite elevated bilirubin, tocopherol and urate levels. *Dermatology*. 1999;198(4):336-9. DOI: 10.1159/000018171
29. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239(1):70-6. DOI: 10.1006/abio.1996.0292
30. Lindeman JH, van Zoeren-Grobbe D, Schrijver J, Speek AJ, Poorthuis BJ, Berger HM. The total free radical trapping ability of cord blood plasma in preterm and term babies. *Pediatr Res*. 1989;26(1):20-4. DOI: 10.1203/00006450-198907000-00008
31. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta*. 1987;924(3):408-19.
32. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*. 1993;84(4):407-12.

**Corresponding author:**

Hicham Benkhai  
Institute of Hygiene and Environmental Medicine, Ernst  
Moritz Arndt University, Walther Rathenau Str. 49a,  
17489 Greifswald, Germany  
hicham.benkhai@uni-greifswald.de

**Please cite as**

Benkhai H, Lemanski S, Below H, Heiden JU, Below E, Lademann J, Bornewasser M, Balz T, Chudaske C, Kramer A. Can physical stress be measured in urine using the parameter antioxidative potential? *GMS Krankenhaushyg Interdiszip*. 2010;5(2):Doc03. DOI: 10.3205/dgkh000146, URN: urn:nbn:de:0183-dgkh0001465

**This article is freely available from**

<http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2010-5/dgkh000146.shtml>

**Published:** 2010-09-21

**Copyright**

©2010 Benkhai et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.en>). You are free: to Share — to copy, distribute and transmit the work, provided the original author and source are credited.

# Kann körperlicher Stress mit dem Parameter antioxidatives Potential im Urin erfasst werden?

## Zusammenfassung

Regelmäßige sportliche Betätigung ist eine gesundheitsfördernde Maßnahme. Dagegen kann Leistungssport auf Grund der hohen körperlichen Belastung zu vermehrter Freisetzung von Radikalen und damit zum Abfall des antioxidativen Potentials führen. In der vorliegenden Studie sollte daher die Auswirkung von Sport auf das Antioxidative Potential (AOP) untersucht werden.

Das AOP wurde im Spontanurin von Freizeitsportlern und Leistungssportlern jeweils während eines Trainingslagers mit Hilfe der Chemolumineszenz gemessen. Weiterhin wurden die Parameter Kreatinin und Harnsäure erfasst.

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine stärkere körperliche Belastung zu einem Abfall des antioxidativen Potentials um bis zu etwa 50% führt. Zur Kompensation erscheint eine spezielle antioxidative Kost sinnvoll.

**Schlüsselwörter:** körperlicher Stress, Radikale, antioxidatives Potential, antioxidative Kapazität, Sport

**Hicham Benkhai<sup>1</sup>**  
**Sandra Lemanski<sup>2</sup>**  
**Harald Below<sup>1</sup>**  
**Jens Uwe Heiden<sup>3</sup>**  
**Elke Below<sup>4</sup>**  
**Jürgen Lademann<sup>5</sup>**  
**Manfred Bornewasser<sup>2</sup>**  
**Theo Balz<sup>6</sup>**  
**Christine Chudaske<sup>7</sup>**  
**Axel Kramer<sup>1</sup>**

1 Institut für Hygiene und Umweltmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, Deutschland

2 Institut für Psychologie, Lehrstuhl für Sozialpsychologie/Arbeits- und Organisationspsychologie, Greifswald, Deutschland

3 Forschungsverbund Mecklenburg-Vorpommern e.V., Greifswald, Deutschland

4 Institut für Rechtsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, Deutschland

5 Zentrum für Angewandte Hautphysiologie an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité Universitätsmedizin, Berlin, Deutschland

6 Institut für Sportwissenschaft, Universität Rostock, Deutschland

7 Institut für Psychologie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, Deutschland

## Einführung

Das antioxidative System ist ein Mechanismus, der Körperzellen vor endogenen und exogenen freien Radikalen schützt und ein Gleichgewicht herstellt, das einerseits die körpereigenen Radikalwirkungen ermöglicht, aber andererseits schädigende Wirkungen durch exogene Radikale verhindert [1]. Damit kommt es zur Abnahme toxischer Radikalwirkungen und zur verminderten Schädigung des Organismus. Substanzen, die mit Radikalen unter Aufhebung des radikalischen Zustands reagieren, werden als Antioxidantien bezeichnet [2]. Das antioxidative Stoffwechselsystem ist komplex und mit vielen anderen Stoffwechselsystemen des Körpers verbunden. Eine entstehende Dysbalance kann Krankheiten verursachen oder bestehende Krankheiten verschlimmern. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität des Immunsystems stark mit dem antioxidativen Stoffwechselsystem verbunden ist [3], [4], [5]. Ebenso ist bekannt, dass körperliche Belastung u.a. zu einer Radikalbildung führt [6], so dass die Bildung freier Radikale bei körperlicher Belastung deutlich höher als in Ruhephasen (basal) ist [7]. Unter Trainingsbedingungen werden bis zu 5% der aufgenommenen Sauerstoffmoleküle in Superoxidradikale umgewandelt [8]. Außerdem kann eine lokale inflammatorische Reaktion im Muskelgewebe zu vermehrter Bildung freier Radikale führen. Ursache hierfür ist die Infiltration von Leukozyten in das durch die körperliche Belastung entzündete Muskelgewebe [9]. Die Leukozyten produzieren freie Radikale, die als second messenger fungieren [10].

Als Folge einer Radikalbildung ist zu erwarten, dass das antioxidative Potential (AOP) absinkt.

Ein in vivo Nachweis von Radikalen ist kaum möglich, da diese extrem reaktiv und kurzlebig sind. Andererseits gibt es verschiedene biologische Marker, um Reaktionsprodukte von Radikalen nachzuweisen, z.B. das oxidierte Guanosin (8-oxo-dG) als Marker für radikalische DNA-Schädigung, das im Urin ausgeschieden wird, die Lipidperoxidation von n-3 Fettsäuren durch Radikale [11], [12], für die das ausgeatmete Ethan als Marker verwendet wird und die Bestimmung des  $\beta$ -Karotin-Gehalts in der Haut [13], [14], [15].

Substanzen, die mit Radikalen unter Abbruch der radikalischen Kettenreaktion reagieren können, haben reduktiven (antioxidativen) Charakter. Die Summe der in einem System vorliegenden antioxidativen Substanzen wird als AOP (Antioxidatives Potential) bezeichnet, ein Begriff, der 1989 von Popov und Lewin eingeführt wurde [16]. Das AOP wird durch eine Reihe von Verbindungen bestimmt, die in unterschiedlicher Konzentration vorliegen können [16], [17]. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, zwischen der integralen antioxidativen Kapazität wasserlöslicher (antioxidative capacity of water-soluble components, ACW) und fettlöslicher Substanzen (antioxidative capacity of lipid-soluble components, ACL) zu unterscheiden. Die Angabe der ACW erfolgt üblicherweise in Ascorbinsäureäquivalenten, die ACL wird in Troloxäquivalenten angegeben.

In unterschiedlichen biologischen Systemen wird das AOP durch verschiedene Substanzen bestimmt. Im menschlichen Blutplasma werden Harnsäure, Ascorbinsäure, bilirubingebundenes Albumin und Coeruloplasmin als Hauptbestandteile der ACW angesehen [18]. Die biologische Bedeutung dieser Verbindungen unterscheidet sich. Im Plasma ist der Hauptbestandteil des AOP Harnsäure. Ein weiterer wichtiger Bestandteil des AOP ist Ascorbinsäure. Wenn das AOP als Summenparameter erfasst wird, z.B. mittels Chemolumineszenz, wird eine Reihe unbekannter Verbindungen, die ebenfalls als Radikalfänger wirken, mit erfasst.

Im Gegensatz zu normaler sportlicher Betätigung ist Leistungssport eine Form von Stress für den menschlichen Körper [19]. In der Psychologie wird Stress als eine andauernde aversive Situation definiert, deren Vermeidung subjektiv wichtig erscheint und von der das Individuum nicht die Gewissheit hat, sie beenden zu können [20]. Dabei muss man zwischen kontrollierbarem positivem Stress und unkontrollierbarem negativen Stress unterscheiden. In der Medizin ist Stress ein Faktor, der die Gesundheit des Menschen gefährdet. Wird der Sympathikus durch Stress aktiviert, schüttet der Körper vermehrt die Stresshormone Adrenalin und Noradrenalin aus. Stress kann auch über das Hormon Cortisol negativ wirken. Daneben führt Stress zur Bildung freier Radikale [21], [22]. Die klinisch chemische Messung von Hormonen ist aufwendig und die Korrelation mit dem Gesamtstress ist häufig fraglich. Der Parameter AOP könnte hierzu eine Alternative darstellen, da er als Summenparameter leicht erfassbar ist und ein Maß für die Radikalbelastung darstellt. Deshalb sollte in der vorliegenden Studie untersucht werden, ob das AOP als Screening-Parameter zur Erfassung von körperlichem Stress geeignet ist.

## Material und Methoden

Es wurden zwei separate Studien durchgeführt. Studie I fand während eines Trainingslagers von Taekwondo-Sportlern statt. Es nahmen 17 Probanden (14 Männer, 3 Frauen) teil. Die Sportler absolvierten 8 Tage lang je zwei Trainingseinheiten von 1,5 h pro Trainingstag. Es wurden jeweils zwei Urinproben pro Sportler und Tag gesammelt, eine morgens vor dem Training und eine abends nach der zweiten Trainingseinheit. Die Proben wurden codiert und sofort bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Mit erfasst wurden Körpermaße, Blutdruck und Puls der Probanden. In den Urinproben wurden die Parameter AOP<sub>gesamt</sub> und Harnsäure-unabhängiges AOP (AOPU) sowie der Gehalt an Harnsäure und Kreatinin bestimmt. Vor der Analyse wurden die Proben über Nacht im Kühlschrank aufgetaut und nach kurzem Durchmischen zentrifugiert, um Schwebstoffe und Sediment abzutrennen.

An der Studie II nahmen fünf männliche Taekwondo-Leistungssportler die sich auf die Meisterschaft vorbereiten sollten. Das Trainingsniveau dieser Sportler war höher als in Studie 1 und die Belastung deutlich intensiver als

**Tabelle 1: Bestimmung von AOP<sub>gesamt</sub> und AOPU mit dem ACW-Kit (Jena Analytik)**

Reagenz	R 1 Diluent	R 2 Puffer pH 14	R 3 Photo- sensitizer	R 4 Ascor- binsäure	Urin- probe	Uricase
Volumen	(µl)					
Leerwert	1500	1000	25	–	–	–
Kalibrierung	1500	1000	25	5–30	–	–
AOP <sub>gesamt</sub>	1500	1000	25	–	5–10	–
AOPU	1500	1000	25	–	10 Probe und 10 Uricase-Lösung	

in Studie I. Im Unterschied zu den Teilnehmern der Studie I wurden die Sportler einheitlich trainiert und nahmen die exakt die gleiche Ernährung zu sich. Die Studie dauerte 5 d. In den übrigen Parametern glich der Ablauf der Studie I.

AOP<sub>gesamt</sub> und AOPU wurde mittels Chemolumineszenz mit dem Photochem<sup>®</sup> (Analytik Jena, Jena) bestimmt. Es wurde die Softwareversion 5.1.12 verwendet. Photometrische Messungen wurden am Spektrometer Ultrospec 4.000 (Pharmacia Biotech, Schweden) durchgeführt. Die eingesetzten Chemikalien hatten, wenn nicht anders ausgewiesen, p.a. Qualität. Für alle Untersuchungen wurde Reinstwasser verwendet (Reinstwasser-System, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH, Barsbüttel). Die verwendete Uricase (Serva, Heidelberg) hatte eine Aktivität von 4,43 U/mg. Die daraus hergestellte Reaktionslösung war bei 4 °C für 7 h haltbar.

Für die Bestimmung des AOP<sub>gesamt</sub> und des AOPU wurde der ACW-Kit (Analytik Jena, Jena) verwendet. Die Bestimmung der Harnsäure erfolgte mittels 5+1 Fluid Harnsäure Kit (MTI-Diagnostics). Für die Kreatininbestimmung wurde der DRI<sup>®</sup> Creatinin-Detect<sup>®</sup>-Test (microgenetics GmbH) eingesetzt.

Zur Bestimmung des AOP<sub>gesamt</sub> wurden die im ACW-Kit enthaltenen Reagenzien R 1 (Diluent), R 2 (Puffer pH 14), R 3 (Photosensitizer) und R 4 (Ascorbinsäure-Kalibrierlösung) in den in Tabelle 1 angegebenen Mengen eingesetzt.

Bei der ACW-Bestimmung wurde der zentrifugierte Urin 1:20, bei der AOPU-Bestimmung 1:10 verdünnt und bis zur Messung bei 4 °C aufbewahrt. Bei der Bestimmung des AOPU wurden zum Harnsäureabbau zu 10 µl der zentrifugierten und verdünnten Urinprobe (1:10) 10 µl Uricase-Lösung (8 U/10µl) gegeben (Tabelle 1). Das Ganze wurde für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der Reagenzien entsprechend den Angaben in Tabelle 1. Für die Messung ist von entscheidender Bedeutung, dass R 1 und R 2 Raumtemperatur haben. Dagegen müssen der Photosensitizer (R 3) und die Ascorbinsäurelösung (R 4) ständig bis unmittelbar vor Zugabe zur Reaktionsmischung bei 4 °C in einer separaten Box gekühlt werden [23].

Die Berechnung der Ascorbinsäure-Äquivalente erfolgt mit Hilfe der Formel:

$$\text{Konzentration } (\mu\text{mol/ml}) = \frac{\text{Menge (nmol)} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Pipettiertes Volumen } (\mu\text{l})}$$

Die statistische Auswertung wurde mit dem Programm PASW Statistics 18<sup>®</sup> (IBM) durchgeführt. Es wurden die Parameter für die deskriptive Statistik bestimmt, Korrelationen nach Pearson berechnet und auf Signifikanz getestet.

## Ergebnisse

### Studie I

In den Urinproben wurden die Parameter Harnsäure, AOP<sub>gesamt</sub> und AOPU bestimmt und auf die Kreatininausscheidung normiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Um Aussagen über das Verhältnis der Parameter AOP<sub>gesamt</sub> und AOPU zu treffen, wurde Anteil der Harnsäure am AOP<sub>gesamt</sub> (als Differenz zwischen AOP<sub>gesamt</sub> und AOPU) ermittelt (Tabelle 3).

Für jeden Probanden wurden die Verläufe des Harnsäurespiegels, von AOP<sub>gesamt</sub> und AOPU graphisch dargestellt. Ungerade Zahlen bezeichnen die morgendlichen Messwerte, gerade Zahlen die abendlichen Messwerte.

Der Harnsäurespiegel korreliert hoch signifikant mit dem AOP<sub>gesamt</sub> ( $r=0,42$ ,  $p=0,001$ , Abbildung 1). Ein Beispiel für den individuellen Verlauf des AOP und des Harnsäurespiegels ist in Abbildung 2 wiedergegeben.

Die AOPU-Werte lagen deutlich unter den Werten für das AOP<sub>gesamt</sub> und korrelierten nicht miteinander. Zwei Beispiele für einen individuellen Verlauf sind in den Abbildung 3 und Abbildung 4 dargestellt. Der Sportler 12 (männlich, 21 Jahre) wurde ausgewählt, weil er dem typischen Verlauf in Studie II entsprach. Die anderen Sportler von Studie I zeigten sehr unterschiedliche Verläufe. Das hatte offensichtlich verschiedene Ursachen wie Adipositas, Ernährung, unterschiedliche Trainingsbelastung und unterschiedliches Alter (5 Teilnehmer unter 17 Jahre alt).

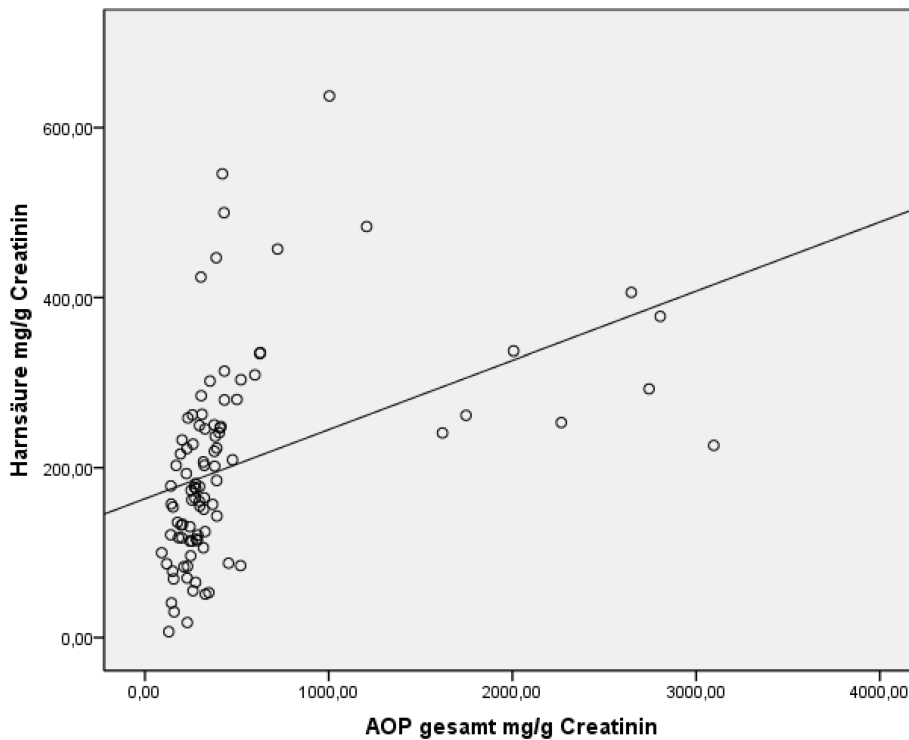
Bei Sportler 12 (Abbildung 3) nimmt das AOPU bis zum Ende des zweiten Trainingstags ab. Nach Anpassung an die Trainingsbelastung steigen die AOPU-Werte zunächst etwas an und fallen dann wieder ab und bleiben

**Tabelle 2: Deskriptive Statistik der Ergebnisse von Studie I (mg/g Kreatinin)**

Parameter	Harnsäure	AOP <sub>gesamt</sub>	AOPU
N	189	189	189
Mittelwert	203,5	497,2	85,4
Median	166,3	292,7	54,1
Std. Abweichung	160,3	703,4	95,8
Minimum	2,24	19,1	4,2
Maximum	1179,5	4663,6	588,2
Perzentiles	25	96,3	40,4
	75	275,9	78,5

**Tabelle 3: Prozentualer Anteil der Harnsäure im Parameter AOP<sub>gesamt</sub>**

Gruppe Messwerte	Harnsäure Anteil am AOP <sub>gesamt</sub> (%)	Standardabweichung (%)
Alle Sportler (n=17) Messwerte (n=189)	75,60	9,63
Ohne Sportler unter 17 Jahren (n=12) Messwerte (n=113)	77,44	3,86



**Abbildung 1: Korrelation zwischen Harnsäurewerten und AOP<sub>gesamt</sub>**

schließlich mit kleinen Schwankungen niedrig. Häufig sind die Werte morgens höher als abends (Abbildung 3). Bei dem Manager des Trainingslagers, der nicht am Training teilnahm (männlich, 42 Jahre) weist das AOPU einen anderen Verlauf auf. Bis zum 5. Tag steigen die Werte an, danach kehren sie bis etwa auf den Ausgangswert zurück. Abends sind die Werte häufig höher als morgens (Abbildung 4).

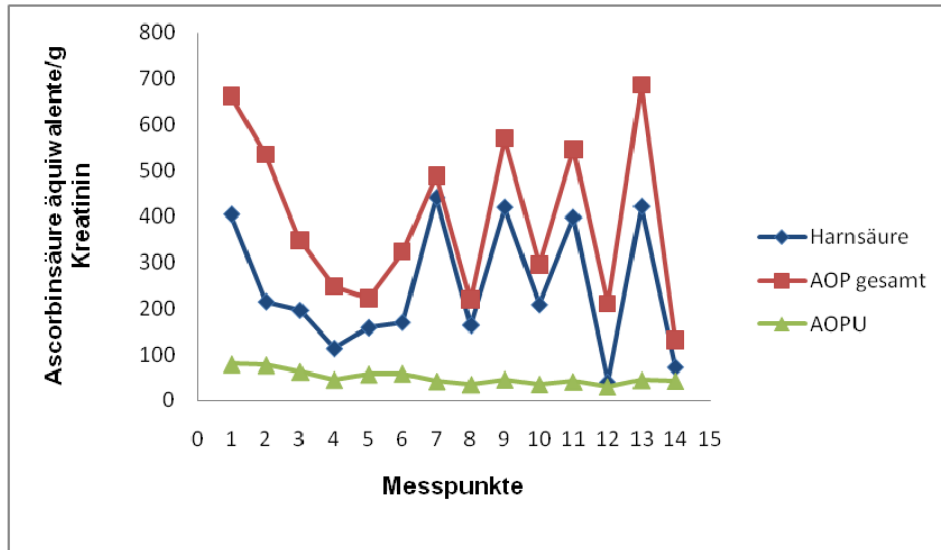


Abbildung 2: Verlauf des Harnsäurespiegels, des gesamten antioxidativen Potentials (AOP<sub>gesamt</sub>) und des Harnsäure-unabhängigen antioxidativen Potentials (AOPU) bei Sportler 12 (auf Kreatininausscheidung normierte Werte)

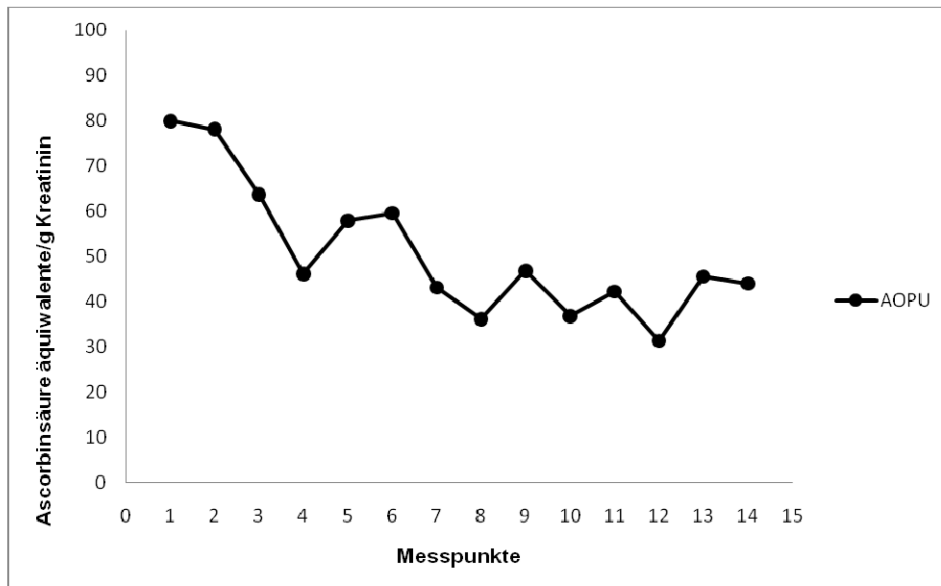


Abbildung 3: Verlauf des Harnsäure-unabhängigen antioxidativen Potentials (AOPU) bei Sportler 12 (auf Kreatininausscheidung normierte Werte)

## Studie II

In dieser Studie lag bei vier von fünf Sportlern ein ähnliches Reaktionsmuster vor, so dass die Werte zusammengefasst wurden (Abbildung 5). Es ergibt sich ein ähnlicher Verlauf wie in Abbildung 3. Mit zunehmender Trainingsdauer fällt das AOPU ab, wobei sich ab Messpunkt 4 morgens höhere Werte für das AOPU als abends ergaben. Die Standardabweichung zeigt eine eindeutige Tendenz der Abnahme vom Trainingsbeginn bis zum Trainingsende (Abbildung 5).

Der Sportler mit abweichendem Verhalten des AOPU war im Gegensatz zu den anderen 4 Sportlern (Studenten oder Auszubildende) ein Arbeitnehmer. Sein AOPU-Ausgangswert lag etwa auf dem Niveau der anderen Ausgangswerte, fiel dann aber drastisch bis fast auf null ab. Trotz einer kurzen Erholungsphase im weiteren Verlauf ließ sich insgesamt ein Abfall feststellen (Abbildung 6).

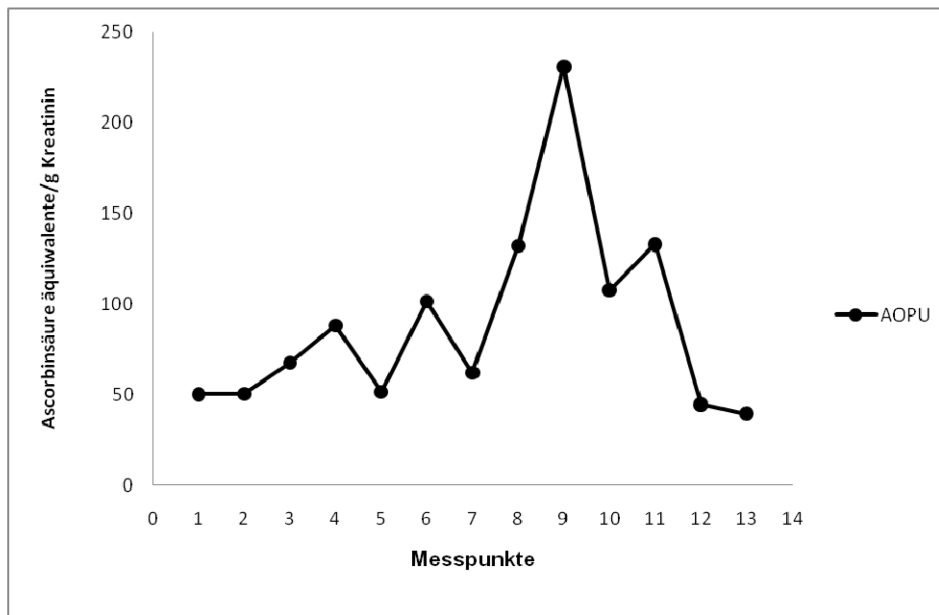


Abbildung 4: Verlauf des Harnsäure-unabhängigen antioxidativen Potentials (AOPU) des Studienmanagers (auf Kreatininausscheidung normierte Werte)

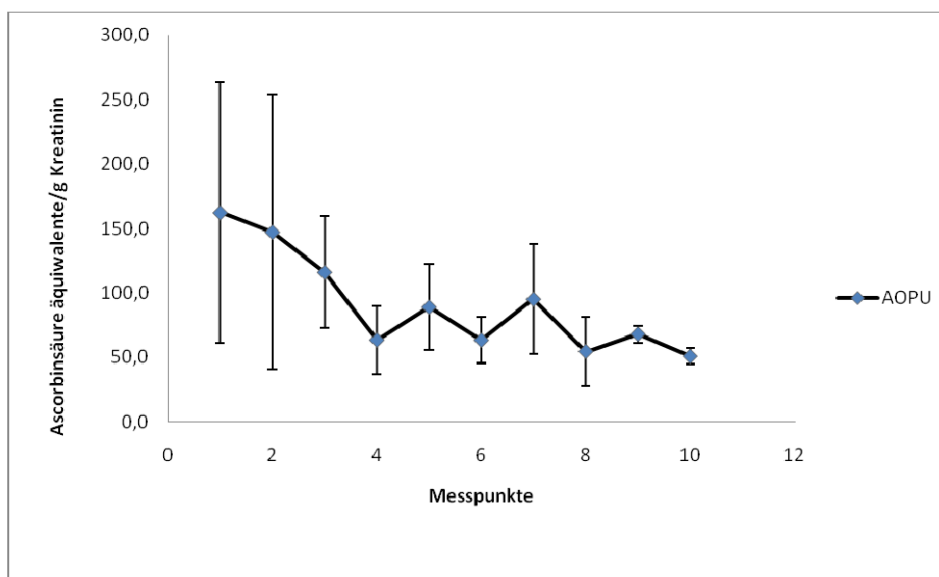


Abbildung 5: Verlauf der Mittelwerte des AOPU bei 4 Leistungssportlern der Studie II (auf Kreatininausscheidung normierte Werte)

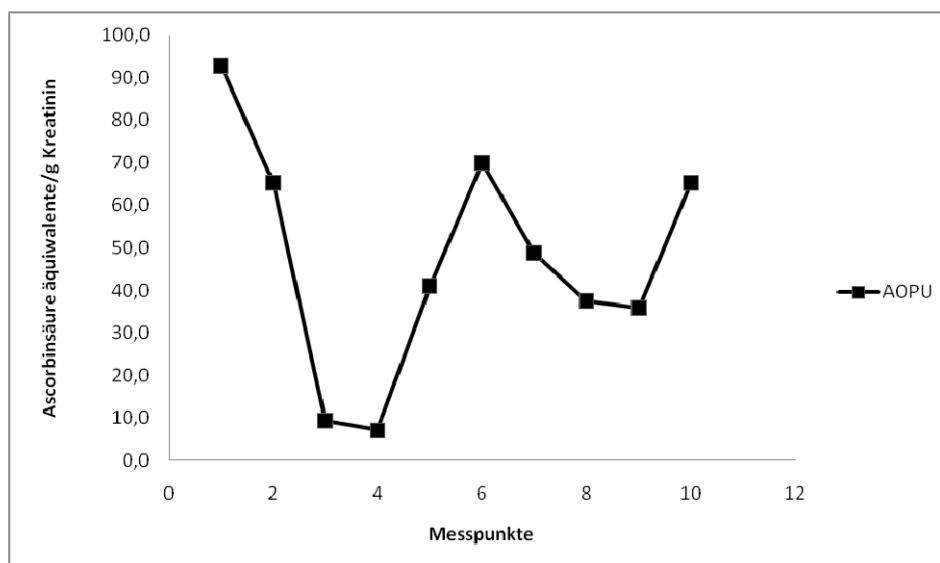


Abbildung 6: Abweichender Verlauf des AOPU bei Sportler 5 in Studie II

## Diskussion

Im Rahmen der Studie sollte geklärt werden, ob es einen Zusammenhang zwischen körperlicher Belastung und Veränderung des Gehalts an antioxidativen Substanzen (AOP) gibt. Entsprechend dem Studiendesign war klar, dass für die Analytik nur Spontanurin zur Verfügung steht. Die Sammlung von 24 h Sammelurin wäre günstiger, war aber aus logistischen Gründen nicht möglich. Eine Bewertung von Parametern im Spontanurin ist kompliziert, da dieser mehr oder weniger verdünnt sein kann. Insbesondere nach körperlicher Belastung wie im vorliegenden Fall ist mit einer Aufkonzentrierung infolge von Schwitzen zu rechnen. Um dieses Problem zu umgehen, bestimmt man zusätzlich den Kreatiningehalt des Urins. Unter der Voraussetzung, dass die Kreatininausscheidung in 24 h relativ konstant ist, können die Messwerte auf eine mittlere Kreatininausscheidung bezogen werden. Üblicherweise geht man von einer durchschnittlichen Kreatininausscheidung von 1 g/24 h aus. Ein analoger Bezug auf Kreatinin ist bei Untersuchungen zum Iodmangelscreening üblich und liefert vergleichbare Ergebnisse zu Untersuchungen von 24 h Sammelurin [24]. In dieser Studie wurden daher alle Messwerte auf die Kreatininausscheidung normiert. Berücksichtigt werden muss, dass Lebensalter, Geschlecht, Muskelmasse und Ernährung einen Einfluss auf die Kreatininausscheidung haben [25] und der Bezug auf die Kreatininausscheidung nur eine Näherung darstellt [26]. Bei Kindern unter 6–8 Jahren ist diese Methode nicht anwendbar, da aufgrund der geringen Muskelmasse eine geringere Kreatininausscheidung [27] vorliegt. Sportler dieser Altersgruppe waren in der Studie jedoch nicht vertreten.

Bei der Auswertung fällt auf, dass insbesondere die Parameter Harnsäure und  $AOP_{gesamt}$  in Studie I eine große Streuung aufweisen (Tabelle 2), d.h. es gibt große individuelle Unterschiede. Die Harnsäuregehalte variieren zwischen 2,24 und 1179,5 mg/g Kreatinin mit einem

Mittelwert von 203,5 mg/g Kreatinin. Die  $AOP_{gesamt}$ -Werte liegen zwischen 19,1 und 4993,6 mit einem Mittelwert von 497,2 mg/g Kreatinin. Der Mittelwert der AOPU-Werte liegt mit 85,4 mg/g Kreatinin bei 17,2% des  $AOP_{gesamt}$  und weist einen Bereich zwischen 4,2 und 588,2 mg/g Kreatinin auf (Tabelle 2).

Es gibt eine Reihe von Untersuchungen [28], [29], [30], [31], die zu der Feststellung kommen, dass die Harnsäure einen wesentlichen Anteil am  $AOP_{gesamt}$  ausmacht. Allerdings gibt es bisher keine Angaben zum Verhältnis AOPU/ $AOP_{gesamt}$  bzw. zum Anteil der Harnsäure am  $AOP_{gesamt}$  in Urinproben. Vergleiche zwischen beiden Parametern sind nur für Serum bzw. Blutplasma bekannt. Hier findet man Angaben von 33 bis 60% (Tabelle 4).

Beim Vergleich des Harnsäureanteils ist zu beachten, dass die Werte mit unterschiedlichen Methoden ermittelt wurden. Der hohe Harnsäureanteil bei der Methode zur Erfassung des Total Radical-trapping Antioxidant Parameters und der Ferric-reducing Ability of Plasma (FRAP) kommt dadurch zustande, dass bei beiden Methoden nicht zwischen ACW und ACL unterschieden wurde, sondern quasi ein Gesamtwert bestimmt wurde [28], [29], [30], [31]. Dagegen wurde bei der Bestimmung der Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) nur der ACL ermittelt. Diese Untersuchung bezieht sich auch auf Serum. Der niedrigere Harnsäureanteil der Arbeitsgruppe von Miller et al. resultiert aus der geringen Fettlöslichkeit der Harnsäure [32]. Dafür fiel der Anteil der Proteine auf Grund der höheren Lipidlöslichkeit höher aus.

In unserem Probandenkollektiv beträgt der Anteil des AOPU ca. 25% vom  $AOP_{gesamt}$ . Das bedeutet, dass die Harnsäure in Urinproben etwa 75% des AOP ausmacht (Tabelle 3). Die von uns verwendete Methode ist mit der TEAC-Methode vergleichbar. Allerdings bestehen Unterschiede im bestimmten Parameter (ACW in unserer Studie, ACL in der TEAC-Methode). Man kann aber davon ausgehen, dass für Urinproben der ACW der entscheidende Parameter ist.



Tabelle 4: Anteil (%) verschiedener Verbindungen am AOP (Zusammenstellung bei [28])

Methode	Ferric reducing ability of plasma [31]	Total radical trapping antioxidant parameter [30]	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity [32]	Ferric reducing ability of plasma [29]
Ascorbinsäure	14	13,4	9	15
$\alpha$ -Tocopherol	7	6,4	3	5
Harnsäure	58	47,4	33	60
Bilirubin	–		2	5
Proteine	21	12,2	43	10
Andere	–	21,5	10	5

Da das AOP<sub>gesamt</sub> zu 77% den Harnsäuregehalt widerspiegelt und diese Parameter signifikant miteinander korrelieren (Abbildung 1), ist die Aussagefähigkeit des Parameters AOP<sub>gesamt</sub> für medizinische Studien begrenzt. Aus dem parallelen Verlauf der Kurven für Harnsäure und AOP<sub>gesamt</sub> wird deutlich, dass der Parameter AOP<sub>gesamt</sub> bei Urinproben im Wesentlichen die Schwankungen der Harnsäurekonzentration widerspiegelt (Abbildung 1 und Abbildung 2). Durch den bestimmenden Harnsäureeinfluss verliert der Parameter AOP<sub>gesamt</sub> erheblich an Sensitivität, da der Einfluss von Verbindungen mit antioxidativem Potential, die in geringeren Konzentrationen als Harnsäure vorliegen, überdeckt wird. Sinnvoller erscheint deshalb die Bestimmung des AOPU. Dass dieser Parameter größenordnungsmäßig deutlich geringer als das AOP<sub>gesamt</sub> ausfällt, wird in Abbildung 2 deutlich. Allerdings waren die individuellen Unterschiede auch bei diesem Parameter beträchtlich (Tabelle 2). Eine statistische Auswertung über alle 17 Probanden im Sinne einer epidemiologischen Studie wie z.B. beim Iodmangelscreening erwies sich als wenig aussagekräftig, da individuell unterschiedliche Reaktionsmuster auftraten. Auch die Elimination der Daten von Personen unter 17 Jahren (Berücksichtigung der Abweichungen im Kreatininstoffwechsel bei Jugendlichen) führte zu keiner übersichtlicheren Datenlage auf Grund der Heterogenität der Sportlergruppe, des unterschiedlichen Trainingsstandes, Unterschieden in der Ernährung und der nicht so starken körperlichen Belastung wie in Studie II (data not shown). Vielmehr zeigte sich, dass eine Bewertung des AOP personenbezogen erfolgen muss. Das wird im Folgenden an 2 ausgewählten Beispielen erläutert.

Beim Sportler 12 (Abbildung 3) zeichnet sich ab, dass der Körper in der Anpassungsphase auf AOP Reserven zurück greift, wodurch das AOPU tendenziell abnimmt. Danach wird das AOP durch das Training vermindert. Nachts in der Ruhephase erfolgt eine Regeneration, so dass die Werte morgens höher als abends sind. Darüber hinaus wird deutlich, dass eine Tendenz zur Abnahme des AOPU während des Trainingslagers besteht. Infolge der körperlichen Belastung wird auf die antioxidative Reserve des Körpers zurückgegriffen, die Regeneration ist aber nicht hundertprozentig.

Die Verlaufskurve des Studienmanagers, der nicht aktiv am Training teilnahm, sondern die Organisation des Trainingslagers durchführte, bietet ein anderes Bild (Ab-

bildung 4). Das AOPU erreicht ein Maximum etwa zum Zeitpunkt der Hälfte des Trainingslagers. Die Werte waren im Gegensatz zu Sportler 12 morgens niedriger als abends. Eine Erklärung für diesen Verlauf dürfte der morgendliche psychische Stress bei der Organisation des Trainingslagers sein.

Bei Studie II zeigte sich, dass vier von fünf Sportlern die gleiche Tendenz beim Verlauf des AOPU wie der Sportler 12 aus Studie I hatten. Nach einer initialen Anpassungsphase, in der die Werte sinken, folgt die Phase, in der sich die Werte stabilisierten, wobei am Ende der Studie die AOPU-Werte deutlich niedriger waren als zu Beginn. Bei drei der vier Sportler lagen die morgendlichen Werte nach der Anpassungsphase immer über den abendlichen Werten. Bei dem vierten Sportler war das nur an den letzten beiden Tagen der Fall, davor lagen die morgendlichen Werte unter den abendlichen. Die höheren morgendlichen Werte lassen sich durch Erholungsphase über Nacht erklären. Der vierte Sportler organisierte das Trainingslager und hatte damit insbesondere zu Beginn hohen physischen Stress. Die niedrigen morgendlichen Werte sind also möglicherweise ein Ausdruck von physischem Stress.

Der abweichend reagierende Sportler 5 (Abbildung 6) war Arbeitnehmer, und es stellte sich zusätzlich heraus, dass er einen niedrigeren Trainingsstand hatte. Damit war die Belastung für ihn bei Beginn des Trainingslagers gravierender als für die ausgeglichen trainierten Schüler und Studenten. Für die relativ hohe Belastung reichen offensichtlich die AOP-Reserven nicht aus. Erst nach einigen Tagen konnte sich sein Körper an die Belastungen anpassen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Parameter AOPU sensitiver als der Parameter AOP<sub>gesamt</sub> ist. Für den Parameter AOPU lassen sich individuelle Verlaufskurven darstellen, die eine Korrelation zu psychischen und physischen Stress zeigen, was durch Erhebung der empfundenen Stresslevel bestätigt wird (data not shown). Durch körperliche Dauerbelastung kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme des AOPU. Hier eröffnen sich Ansatzpunkte zur Prävention, z.B. durch antioxidative Ernährung (Aufnahme von Stoffen mit hohem AOP) und Maßnahmen zum Stressabbau (z.B. Schlaf, Erholung). Weitere Studien sind geplant, um diesen Zusammenhang zu untersuchen, gleichzeitig individuelle Abhängigkeiten zu analysieren und ein AOPU-Monitoring einzuführen.

## Literatur

1. Jackson MJ. An overview of methods for assessment of free radical activity in biology. *Proc Nutr Soc.* 1999;58(4):1001-6. DOI: 10.1017/S0029665199001317
2. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* 2007;35(Pt 5):1147-50. DOI: 10.1042/BST0351147
3. Borunov EV, Smirnova LP, Shchepetkin IA, Lankin VZ, Vasil'ev NV. Vysokaia aktivnost' antioksidantnykh fermentov v opukholi kak faktor "izbeganiia kontrolia" immunnoi sistemy. High activity of antioxidant enzymes in a tumor as a factor of "avoidance of control" in the immune system. *Biull Eksp Biol Med.* 1989;107(4):467-9.
4. Grimble RF. Effect of antioxidative vitamins on immune function with clinical applications. *Int J Vitam Nutr Res.* 1997;67(5):312-20.
5. Seidel C, Boehm V, Vogelsang H, Wagner A, Persin C, Gleit M, Pool-Zobel BL, Jahreis G. Influence of prebiotics and antioxidants in bread on the immune system, antioxidative status and antioxidative capacity in male smokers and non-smokers. *Br J Nutr.* 2007;97(2):349-56. DOI: 10.1017/S0007114507328626
6. Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA, Packer L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun.* 1982;107(4):1198-205. DOI: 10.1016/S0006-291X(82)80124-1
7. Sastre J, Asensi M, Gascó E, Pallardó FV, Ferrero JA, Furukawa T, Viña J. Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *Am J Physiol.* 1992;263(5 Pt 2):R992-5.
8. Askew EW. Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients. *Toxicology.* 2002;180(2):107-19. DOI: 10.1016/S0300-483X(02)00385-2
9. Fielding RA, Manfredi TJ, Ding W, Fiatarone MA, Evans WJ, Cannon JG. Acute phase response in exercise. III. Neutrophil and IL-1 beta accumulation in skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1993;265(1 Pt 2):R166-72.
10. Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br Med Bull.* 1993;49(3):506-22.
11. Arterbery VE, Pryor WA, Jiang L, Sehnert SS, Foster WM, Abrams RA, Williams JR, Wharam MD Jr, Risby TH. Breath ethane generation during clinical total body irradiation as a marker of oxygen-free-radical-mediated lipid peroxidation: a case study. *Free Radic Biol Med.* 1994;17(6):569-76. DOI: 10.1016/0891-5849(94)90096-5
12. Zinov'eva VN, Ostrovskii OV. Svobodno-radikal'noe okislenie DNK i ego biomarker okislenniy guanozin (8-oxodG). Free radical oxidation of DNA and its biomarker oxidized guanosine(8-oxodG). *Vopr Med Khim.* 2002;48(5):419-31.
13. Darvin ME, Fluhr JW, Caspers P, van der Pool A, Richter H, Patzelt A, Sterry W, Lademann J. In vivo distribution of carotenoids in different anatomical locations of human skin: comparative assessment with two different Raman spectroscopy methods. *Exp Dermatol.* 2009;18(12):1060-3. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2009.00946.x
14. Darvin ME, Haag S, Meinke M, Zastrow L, Sterry W, Lademann J. Radical production by infrared A irradiation in human tissue. *Skin Pharmacol Physiol.* 2010;23(1):40-6. DOI: 10.1159/000257262
15. Darvin ME, Sterry W, Lademann J. Resonance Raman spectroscopy as an effective tool for the determination of antioxidative stability of cosmetic formulations. *J Biophotonics.* 2010;3(1-2):82-8. DOI: 10.1002/jbio.200910060
16. Popov I, Gäbel W, Lohse W, Lewin G, Richter E, von Baehr R. Einfluss von Ascorbinsäure in der Konservierungslosung auf das antioxidative Potential des Blutplasmas während der Lebertransplantation bei Minischweinen. The effect of ascorbic acid in preservation solutions on the antioxidative potential of blood plasma during liver transplantation in miniature swine. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe.* 1989;22(1):22-6.
17. Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G. Antioxidant measurements. *Physiol Meas.* 2007;28(4):R41-55. DOI: 10.1088/0967-3334/28/4/R01
18. Popov I, Lewin G. Photochemiluminescent detection of antiradical activity. VI. Antioxidant characteristics of human blood plasma, low density lipoprotein, serum albumin and amino acids during in vitro oxidation. *Luminescence.* 1999;14(3):169-74. DOI: 10.1002/(SICI)1522-7243(199905/06)14:3<169::AID-BI0539>3.0.CO;2-K
19. Darvin ME, Patzelt A, Knorr F, Blume-Peytavi U, Sterry W, Lademann J. One-year study on the variation of carotenoid antioxidant substances in living human skin: influence of dietary supplementation and stress factors. *J Biomed Opt.* 2008;13(4):044028. DOI: 10.1117/1.2952076
20. Mohr G. Die Bedeutung von psychischem Stress, Eustress und Ressourcen für die Gesundheitsförderung am Arbeitsplatz. Significance of psychological stress, absence of stress and resources for health promotion at the workplace. *Soz Präventivmed.* 1993;38 Suppl 2:S96-9.
21. Guliaeva NV, Levshina IP. Kharakteristiki svobodnoradikal'nogo okisleniia i antiradikal'noi zashchity mozga pri adaptatsii k khronicheskomu stressu [Characteristics of free-radical oxidation and antiradical protection of the brain in adaptation to chronic stress]. *Biull Eksp Biol Med.* 1988;106(8):153-6.
22. Kugler HG. Stress führt zu Krankheiten. Diagnostisches Centrum für Mineralanalytik und Spektroskopie DCMS GmbH. DCMS-News. 2006;2. Available from: [http://www.diagnostisches-centrum.de/Publikationen/DCMS-News/DCMS-News\\_PDF/News\\_06\\_Juni.pdf](http://www.diagnostisches-centrum.de/Publikationen/DCMS-News/DCMS-News_PDF/News_06_Juni.pdf)
23. Analytik Jena AG. Bestimmung der wasserlöslichen antioxidativen Kapazität in Blutplasma (ACW). 2000.
24. Zöllner H, Als C, Gerber H, Hampel R, Kirsch G, Kramer A. Screening for iodine deficiency: Iodide concentration or creatinine quotient in random urine? *GIT Laboratory Journal.* 2001;5(3):138-9.
25. Gunn IR. Biological variation of serum and urine creatinine and creatinine clearance. *Ann Clin Biochem.* 1989;26 ( Pt 3):302-3.
26. Brauer VF, Below H, Kramer A, Führer D, Paschke R. The role of thiocyanate in the etiology of goiter in an industrial metropolitan area. *Eur J Endocrinol.* 2006;154(2):229-35. DOI: 10.1530/eje.1.02076
27. Thamm M, Ellert U, Thierfelder W, Liesenkötter KP, Völzke H. Jodversorgung in Deutschland. Ergebnisse des Jodmonitorings im Kinder- und Jugendgesundheitsurvey (KiGGS) [Iodine intake in Germany. Results of iodine monitoring in the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2007;50(5-6):744-9. DOI: 10.1007/s00103-007-0236-4
28. Severin E, Nave B, Ständer M, Ott R, Traupe H. Total antioxidative capacity is normal in sera from psoriasis patients despite elevated bilirubin, tocopherol and urate levels. *Dermatology.* 1999;198(4):336-9. DOI: 10.1159/000018171
29. Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70-6. DOI: 10.1006/abio.1996.0292
30. Lindeman JH, van Zoeren-Grobbe D, Schrijver J, Speek AJ, Poorthuis BJ, Berger HM. The total free radical trapping ability of cord blood plasma in preterm and term babies. *Pediatr Res.* 1989;26(1):20-4. DOI: 10.1203/00006450-198907000-00008

31. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta*. 1987;924(3):408-19.
32. Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*. 1993;84(4):407-12.

**Bitte zitieren als**

Benkhai H, Lemanski S, Below H, Heiden JU, Below E, Lademann J, Bornewasser M, Balz T, Chudaske C, Kramer A. Can physical stress be measured in urine using the parameter antioxidative potential? *GMS Krankenhaushyg Interdiszip*. 2010;5(2):Doc03.  
DOI: 10.3205/dgkh000146, URN: urn:nbn:de:0183-dgkh0001465

**Artikel online frei zugänglich unter**

<http://www.egms.de/en/journals/dgkh/2010-5/dgkh000146.shtml>

**Veröffentlicht:** 21.09.2010

**Korrespondenzadresse:**

Hicham Benkhai  
Institut für Hygiene und Umweltmedizin der  
Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Walther Rathenau Str. 49a,  
17489 Greifswald, Deutschland  
[hicham.benkhai@uni-greifswald.de](mailto:hicham.benkhai@uni-greifswald.de)

**Copyright**

©2010 Benkhai et al. Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel und steht unter den Creative Commons Lizenzbedingungen (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.de>). Er darf vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden, vorausgesetzt dass Autor und Quelle genannt werden.