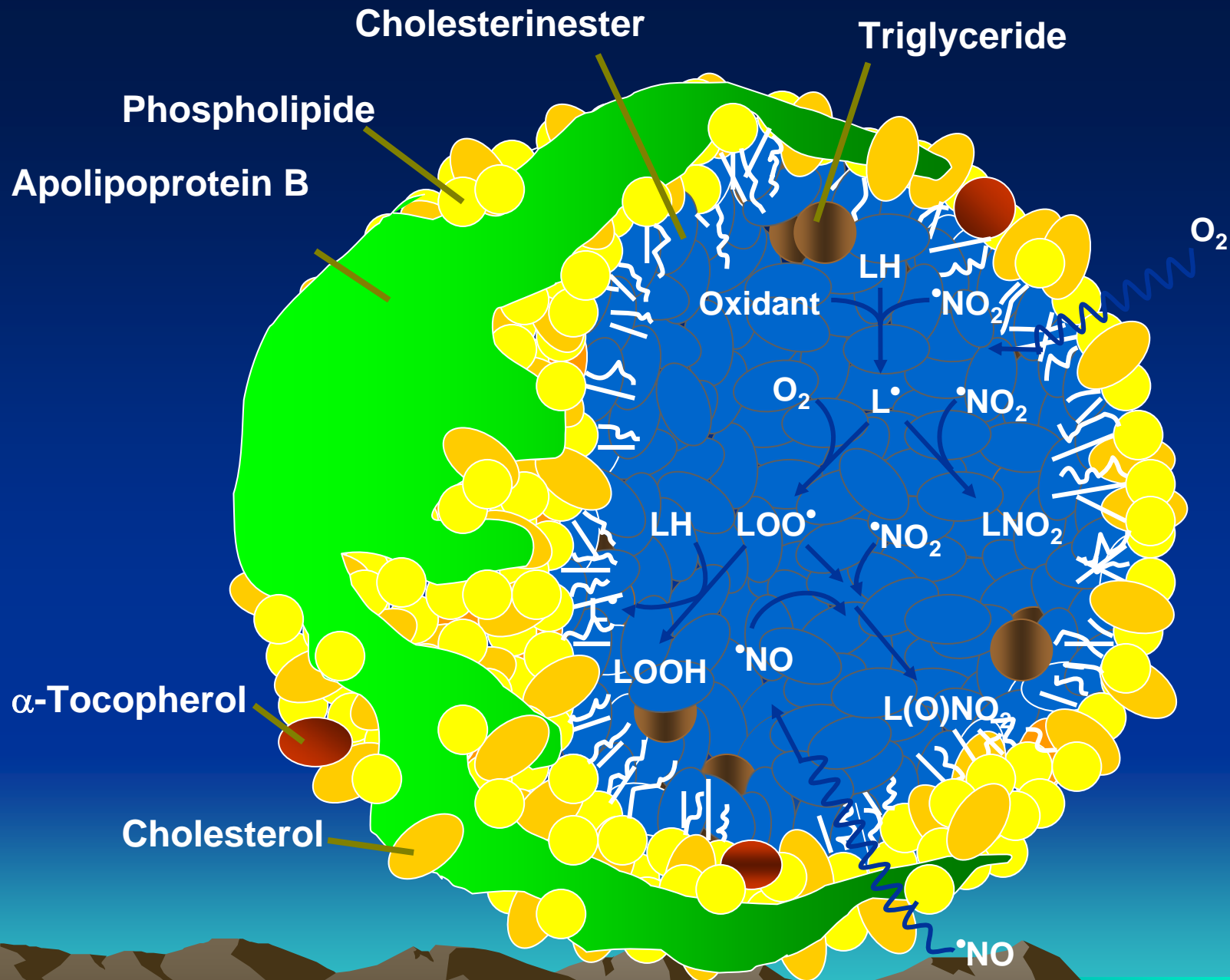


# Nahrungsergänzungsmittel und Oxidativer Stress in Breitensport und Wellness

**Univ.-Prof. Mag. Dr. Joachim Greilberger**

Institut für Physiologische Chemie Zentrum für  
Medizinische Physiologie  
Medizinische Universität Graz





# Belastungen

Sport – Krankheiten – Operationen – Stress

- Einfache Fragen:
  - Wie hoch können bzw. dürfen Belastungen sein
  - Inwieweit können Belastungen schädigend bzw. förderlich sein
  - Wie kann ich mich dafür optimal vorbereiten bzw. nachbereiten (Nahrungsmittel [s,l,g] , zusätzliche Supplemente)
  - Belastung – Adaptierung - Regeneration



# Belastungen

Sport – Krankheiten – Operationen – Stress

- Einfache Fragen:

- Wie kann ich Belastungen messen

- Subjektives Befinden (standardisierte Fragebögen z.B. QLV oder Ernährung; Trainer; Arzt etc.)
- Objektiv: Diagnostik (abhängig vom Zeitpunkt der Abnahmen):
  - klinisch relevante Parameter: periphere, intrazelluläre Marker
  - Spiroergometrische Analysen (pre-operativ; Leistungsdiagnostik, Lungenfunktion etc.)
  - Visuelle Methodiken (PET, CT etc.)

- Wie können Belastungen „optimal“ reduziert werden ?

# Belastung = Reduktion der Energie- Versorgung bzw. Wertes = oxidativer Stress

- Energiegewinnung (aerob):
  - $\frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{H}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{ATP}$
- Optimale Energiegewinnung:
  - Optimales Verhältnis Sauerstoff zu Wasserstoff
- Nichtoptimale Energiegewinnung (anaerob)
  - Zuwenig Sauerstoff bzw. Wasserstoff
    - $c(\text{O}_2) < c(\text{H}_2)$ : Anflutung von  $2\text{H}^+$  und  $2\text{e}^-$  in der inneren Mitochondrienwand (Atmungskette; Komplex III); Regulation über glykolytische Energiegewinnung.
    - $c(\text{O}_2) > c(\text{H}_2)$ : ? HBO = positive Wirkung  
Reaktion von molekulare Sauerstoff ist metastabil (Ausnahme: Radikalreaktionen z.B. Lipidperoxidation)

# Oxidative Modifikationen

- Naturstoffklassen:
  - Nukleinsäuren (Schädigung der Erbmaterie und der Regulation des **Energiestoffwechsels**)
  - Kohlenhydrate (Störung des **Energiestoffwechsels**, Zellinteraktionen, Glykoxidation)
  - Lipide (**Energiestoffwechsel**, Membranschädigung)
  - **Proteine** (Störung der Transportfunktion, der Speicherform, der physiologischen enzymatisch regulierten Grundreaktionen, des **Energiestoffwechsels**)



# Was ist Proteinoxidation

Eine kovalente (irreversible) Modifikation eines Proteins induziert durch reaktive Sauerstoff oder Stickstoff Spezies (RONS) oder Nebenprodukte des oxidative Stresses.



# Welche Arten von oxidativen Modifikationen entstehen ?

- Schwefel Oxidation (Cys Disulfide, S-Thiolierung; Met: sulfoxide; Beispiel: Albumin)
- Proteincarbonyle (Seitenkette: Aldehyde, Ketone)
- Tyrosine Crosslinks: Chlorierung, Nitrosilierung, Nitrierung;ation, Hydroxylierung; Beispiel: Nitro-Tyrosin)
- Tryptophanmodifikationen
- Hydro(pero)xy derivatives von aliphatischen Aminosäuren
- Chloramine, Deaminierung
- Konvertierung von Aminosäuren (z.B., His to Asn; Pro to OH-Pro)
- **Lipidperoxidationsaddukte (MDA, HNE, Acrolein)**
- Aminosäurenoxidation von Addukten (*p*-hydroxyphenyl-acetaldehyde)
- **Glycoxidationaddukte (Carboxymethyllysine)**
- Verknüpfungen, Aggregation, Peptidbindungsbruch



# Biochemische Konsequenzen durch Proteinoxidation

- Verlust oder Verstärkung der Enzymaktivität
- Verlust der Proteinfunktionen (*e.g.*, Fibrinogen/Fibrin clotting)
- Verlust der Proteaseinhibitoraktivität  
( $\alpha$ -1-antitrypsin,  $\alpha$  2-macroglobulin)
- Proteinaggregation (, IgG, LDL,  $\alpha$ -synuclein, amyloid protein, prion protein)
- Verstärkte Suszeptibilität zur Proteolyse (*e.g.*, IRP-2, HIF-1  $\alpha$ , Glutamine synthetase)
- Keine Suszeptibilität zur Proteolyse
- **Abnormale zelluläre Aufnahme (LDL)**
- Modifizierte Gentranskription (SoxR, I $\kappa$ B)
- **Erhöhte Immunogenität (ovalbumin; HNE- or acrolein-LDL)**

# Krankheiten mit denen Proteinoxidation in Verbindung gebracht werden, ihre spezifischen Proteine, wenn bekannt

- Atherosklerose (LDL)
  - Rheumatoide Arthritis (IgG,  $\alpha$ -1-proteinase inhibitor)
  - Ischemia-Reperfusion
  - Emphysema ( $\alpha$ -1-proteinase inhibitor, elastase)
  - Neurodegenerative Krankheiten
    - Alzheimer's ( $\beta$ -actin, creatine kinase)
    - Parkinson's
    - Sporadic amyotrophic lateral sclerosis
  - Muskuläre Dystrophy
  - Neugeborene (bei Ventilation); Bronchopulmonary Dysplasia
  - Erwachsenen respiratorisches Distresssyndrom
  - Altern (glutamine synthetase, carbonic anhydrase III, aconitase)
  - Akute Pankreatitis
  - Kataraktogenese (alpha-crystallins)
  - Chronische Alkohol Ingestion
  - Krebs
- 

# Supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates attenuates oxidative stress markers in trained athletes

Manfred Lamprecht<sup>1</sup>, Karl Oettl<sup>1</sup>, Günther Schwabegger<sup>2</sup>, Peter Hofmann<sup>3</sup> and Joachim Greilberger<sup>1</sup>

1 = Institute for Physiological Chemistry; Medical University Graz; Austria

2 = Institute for System-Physiology; Medical University Graz; Austria

3 = Institute for Sport Science; Karl Franzens University Graz; Austria



## Introduction:

Intensive exercise enhances the formation of free radicals and other reactive oxygen and nitrogen species (RONS) in animals and humans resulting in the generation of compounds like malondialdehyde (MDA) and carbonyl-proteins (CP) (1,2). Reduced formation of these oxidative stress parameters by supplementation with antioxidants regarding to this type of physical exercise has not been reported.

## Purpose:

To investigate the influence of a) supplementation with mixed fruit and vegetable juice concentrates and b) of exercise duration with a defined intensity on the concentrations of MDA and CP after intense mountain biking for two hours.

## Methods:

5 healthy trained men (male; 37±5yrs; VO<sub>2</sub>max 55±5mL x kg<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>) supplemented daily with 4 capsules of a phytonutrient preparation from fruits and vegetables. Subjects performed a two hours lasting mountain bike exercise to the top of a mountain (altitude 1500m, distance 30km) at 75% of the individual VO<sub>2</sub>max followed by a moderate downhill performance (same route) at 45% of the individual VO<sub>2</sub>max. Capillary blood was collected from the fingertip before the exercise, on the top of the mountain immediately after intense exercise (=two hours) and the third collection at the end of exercise (=three hours). After collection blood plasma samples were separated by centrifugation at 4°C and plasma levels of MDA were measured by a HPLC method, measurement of CP was performed after derivatization with dinitrophenylhydrazine (DNPH) by a chemiluminescence technique. A two-sided Student's t-test was performed for testing the significance of differences with p < 0.05 as the criterion for significance.

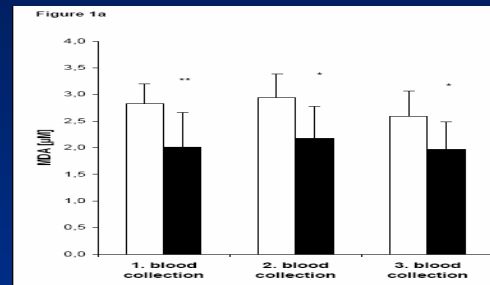


Figure 1a: Influence of supplementation of a fruit and vegetable concentrate on MDA.

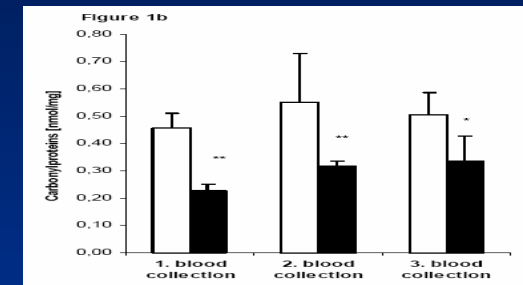


Figure 1b: Influence of supplementation of a fruit and vegetable concentrate on CP.

## Results:

Both parameters were significantly decreased before exercise (MDA: 2.43±0.39 vs. 1.64 ±0.52 µM; CP: 0.46±0.05 nmol/mg protein vs. 0.23±0.02 nmol/mg protein), after 2 hours of intense exercise (MDA: 2.68±0.45 vs. 1.85 ±0.50 µM; CP: 0.55±0.18nmol/mg protein vs. 0.32±0.019nmol/mg protein) and after prolonged exercise of 3 hours (MDA: 2.47±0.73 to 1.64 ±0.47 µM; CP: 0.51±0.08nmol/mg protein to 0.33±0.09nmol/mg protein) by supplementation compared to the non supplemented phase. No significant difference in the concentrations of both parameters throughout the time course of exercise was estimated except the CP values between the first and second blood collection in the supplemented phase (CP: 0.29±0.02 nmol/mg vs. 0.315±0.02 nmol/mg).

## Conclusion:

Thus we demonstrate a benefit of the used supplementation with the phytonutrient preparation concerning oxidative protein damage and lipid peroxidation products in human plasma. The chosen exercise duration at a certain intensity had modest influence to the concentrations of this oxidative stress markers.

1. Alessio HM: Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 25 (2):218-224, 1993.
2. Radak Z, Ogonovszky H, Dubecz J, Pavlik G, Sasvari M, Pucso J, Berkes I, Csont T, and Ferdinandy P: Super-marathon race increases serum and urinary nitrotyrosine and carbonyl levels. *Eur. J. Clin. Invest.* 33 (8): 726-730, 2003.

# Klinische Studie durch orale Aufnahme von Alpha-ketoglutarat und 5-HMF

- Studien Protokoll:

- Spiroergometric work up ( $VO_2$ max, Watt and  $O_2$ -pulse)
- Determination of oxidative stress parameters (Carbonyl proteins and Isoprostane)
- 10 day supplementation with alpha-ketoglutarate + 5-HMF + dietary protocol vs dietary protocol alone
- Re-Spiroergometric work up
- Re-determination of oxidative stress parameters
- Resection treatment (lobectomy + CLND)
- Re-determination of oxidative stress parameters on 1st postOP day
- Record of complications and hospitalization

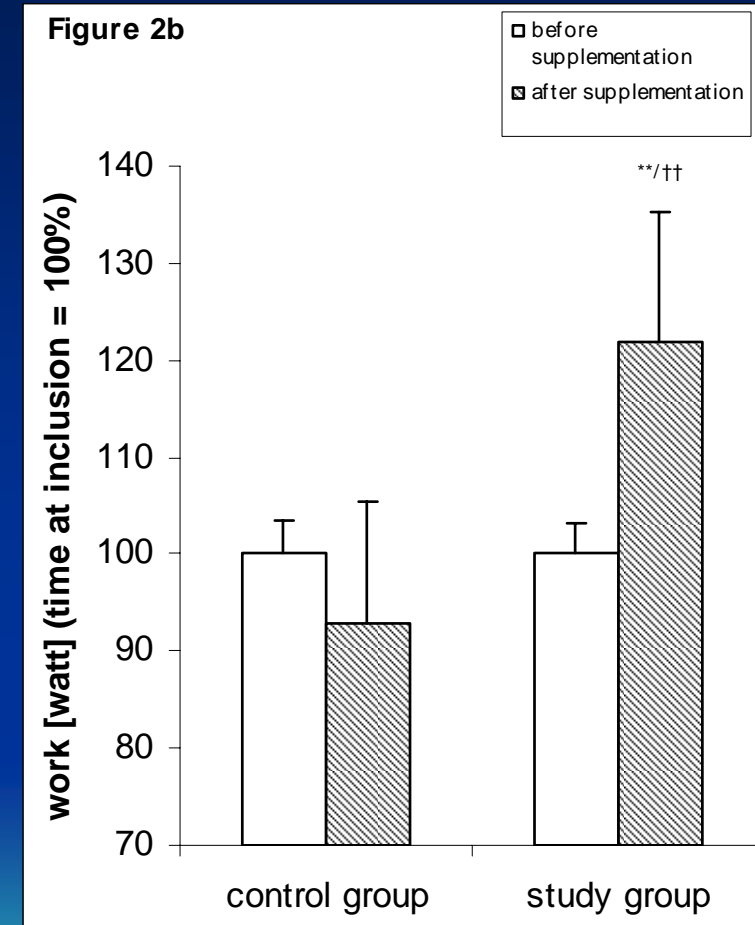
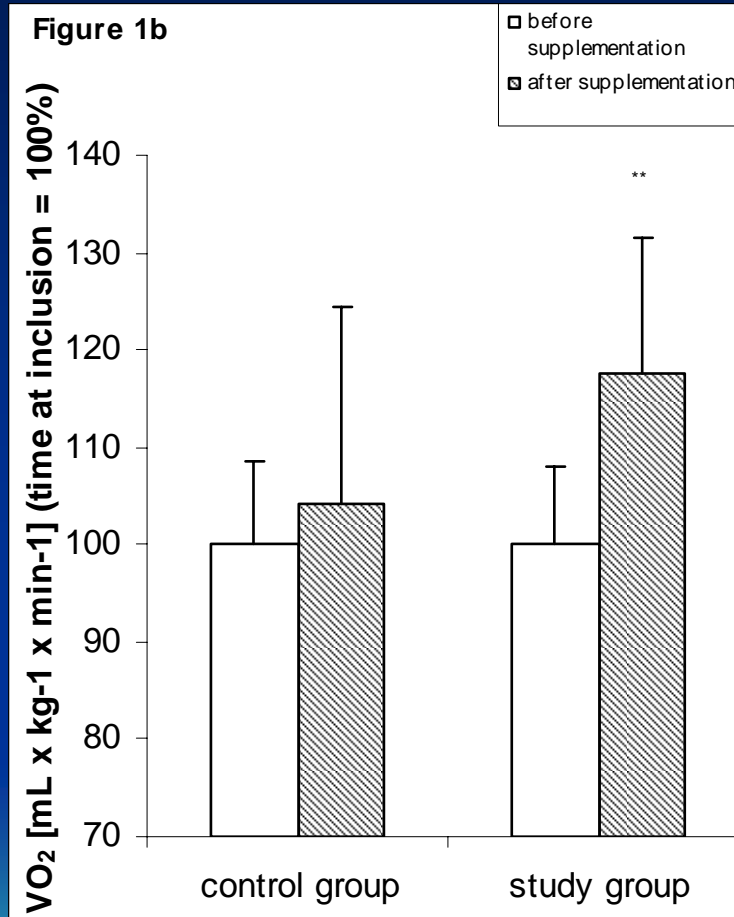


Figure 3

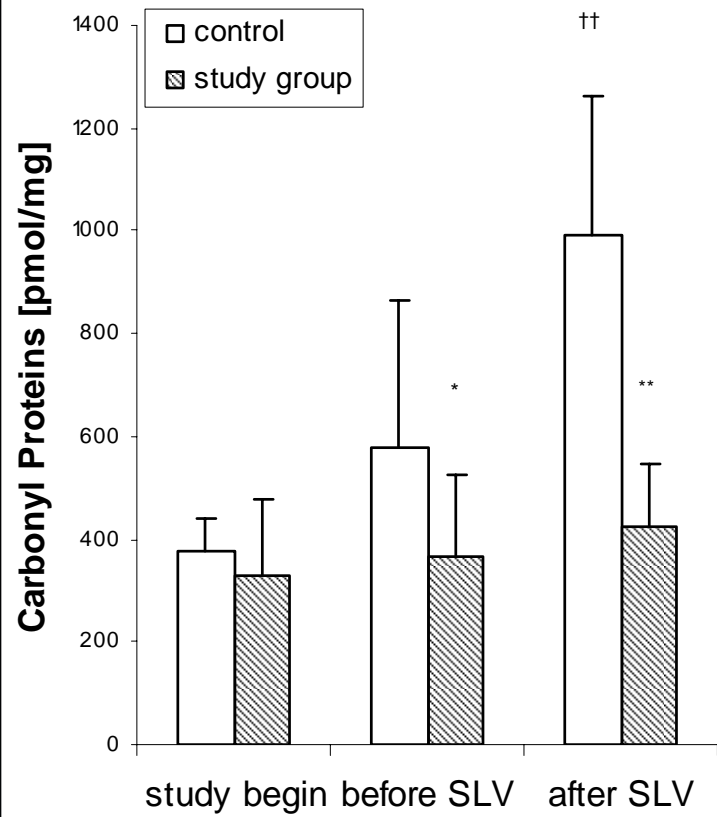
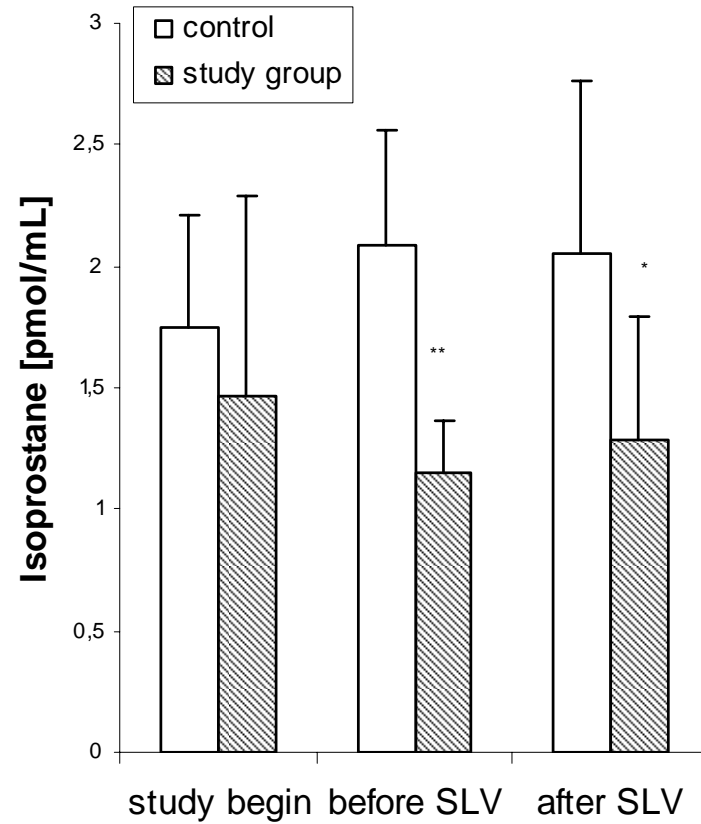
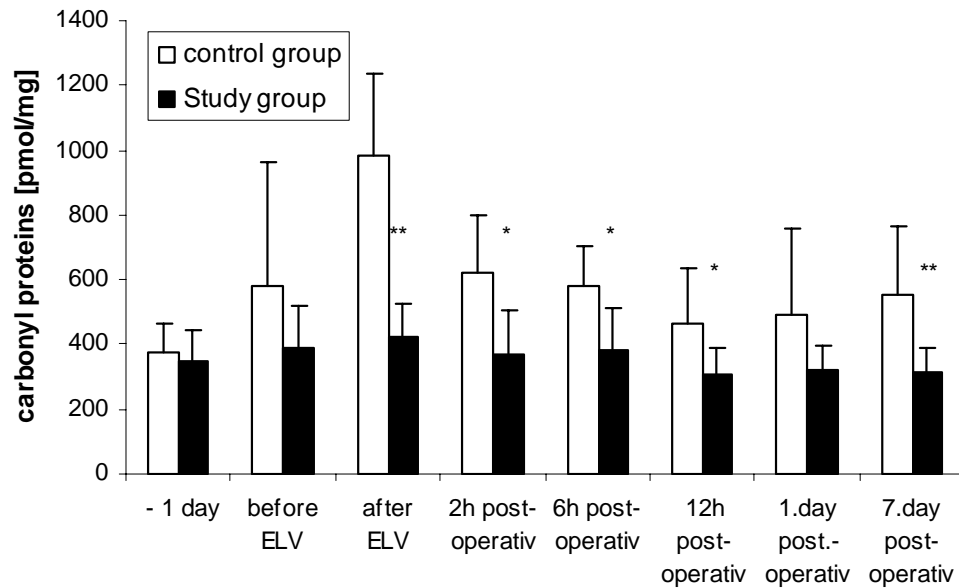


Figure 4

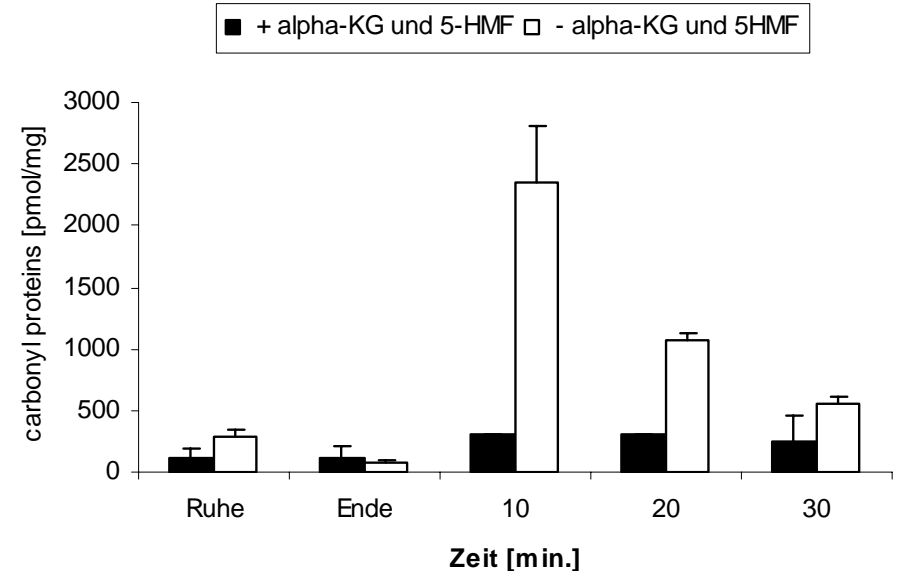


# Belastung: Operation vs. Sport (Nahrungsergänzungsoptimierung)

CP-Bestimmung von Patienten +/- alpha-KG und 5-HMF



CP Bestimmung von Sportlern (Spiroergometrie) +/- alpha-KG und 5-HMF



# Resultate mit Alpha-ketoglutarat und 5-HMF

- Keine Komplikationen
- Subjektive besseres Gefühl mit einer Aktivitätssteigerung der Patienten
- Keine postOP Komplikationen in der Studiengruppe
- Hospitalisation: 6.8 Tage in der Studiengruppe vs 11.8 Tage in der Kontrollgruppe
- Reduktion des oxidativen Stresses





# Metabolische Effekte durch orale Supplementation von $\alpha$ -Ketoglutar säure und 5-Hydroxy-methyl-furfural

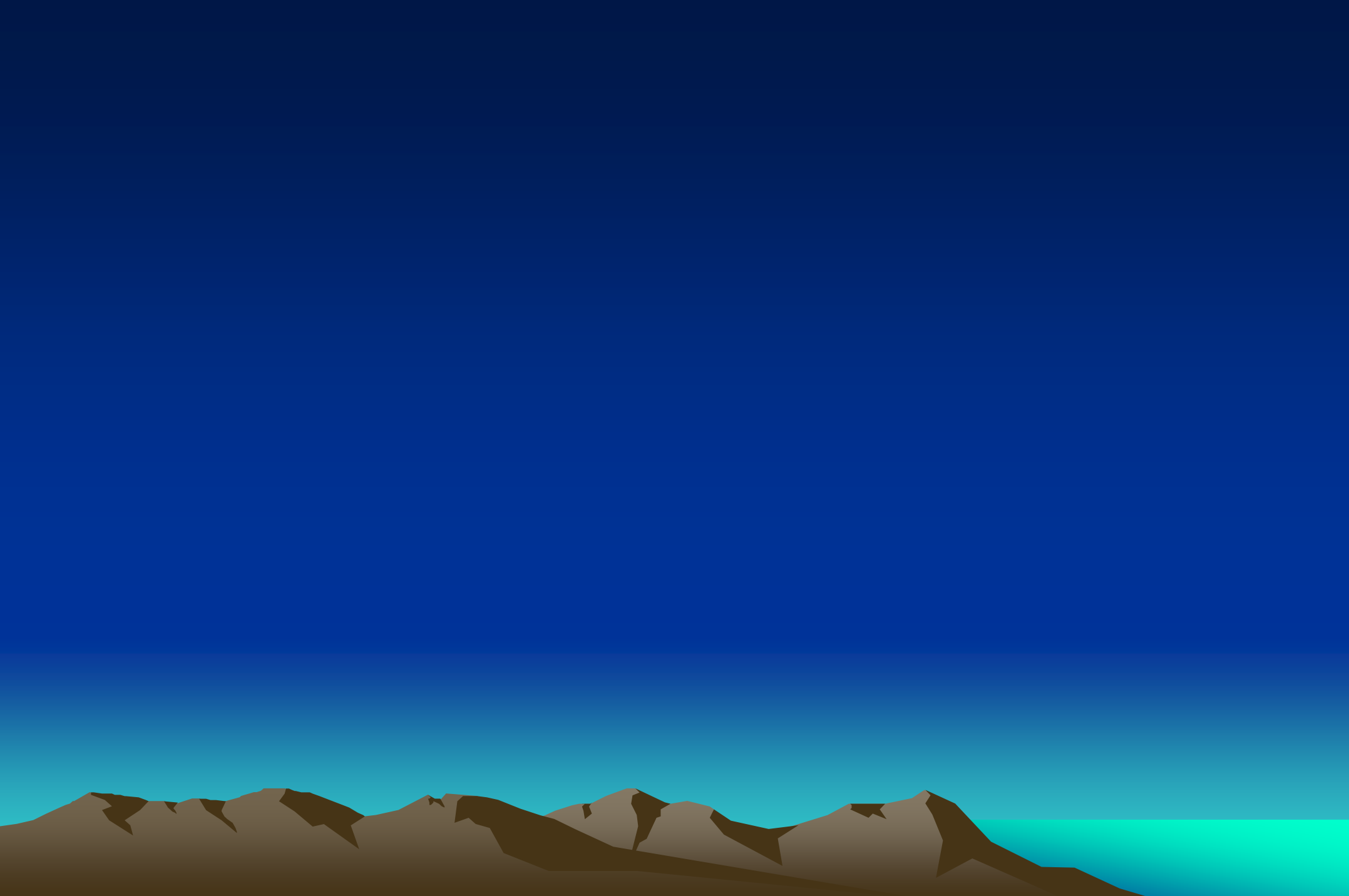
Eine neue orale dietätische Supplementation zur Steigerung der Leistungskapazität (Wellness) und zur gleichzeitigen Reduktion des oxidativen Stresses und dessen Auswirkungen

Nahrungsergänzungsmittel und Oxidativer Stress in Breitensport und Wellness



# Das Team

- Prof. Dr. Heinz Juan (Biomedizinische Forschung, MedUni-Graz)
- Prof. Dr. A. Maier, Dr. Lindenmann, Dr. Matzi und Prof. Smolle-Jüttner (Thoraxchirurgie, MedUni-Graz)
- Prof. Dr. P. Schober (Kinderklinik; MedUni-Graz)
- Dr. Ralph Herwig (AKH Wien; Abteilung für Urology)
- Prof. Dr. Reinhold Wintersteiger (Institut für Pharmakology; Karl-Franzens–Universität Graz)
- Dr. Philipp Stiegler; Herztransplanationschirurgie
- Ing. P. Moser und Ing. C. Bücherl
- Technicians: M. Greilberger



# Carbonylproteine

- Carbonyl Gruppen sind relativ stabil Present at low levels in most protein preparations (~0,1 nmol/mg protein ~ 0.005 mol/mol ~ 1/30000 amino acids)
- 2 bis 20 fache Erhöhung der Carbonylproteine entstehen unter den Bedingungen des oxidativen Stresses *in vivo*
- Carbonylproteine entstehen nahezu als allen uns bekannten Oxidantien *in vitro* (Seitenkettenspezifische Metalloxydation,  $\gamma$ -Strahlung, HOCl, Ozon,  $^1\text{O}_2$ , Lipidperoxydationsaddukte; Glykoxydation)

# Aminosäuren welche einer metall-katalysierten Oxidation unterliegen und Carbonylprodukte bilden

- Prolin ( $\gamma$ -Glutamylsemialdehyd)
- Arginin ( $\gamma$ -Glutamylsemialdehyd)
- Lysin (Amino-Adipicsemialdehyd)
- Threonin (Amino-ketobutyrat)



# Chemilumineszassay

- Detektiert individuelle oxidierte Proteine in einer Mischung von Proteinen (200 - 400 pmol/mg Protein)
- Diabetes Mellitus: bei Kindern 1200 +/- 100 nmol/mg
- Atherosklerose: zwischen 500 und 7000 nmol/mg
- Requires ~ 50 ng of protein
- Sensitivität of  $\leq 1$ fmol of protein carbonyl
  - ~50 ng of a 50 kDa protein oxidized @ 0.0005 mol/mol
- Betrachtung von unterschiedlichen Modifikationsmöglichkeiten von individuellen Proteinen bewirkt durch oxidative Modifikationen

# Zusammenfassung der Indikationen bei oraler Supplementation mit Alpha-ketoglutarat und 5-HMF

- Pre- and postoperative conditioning
  - Fast track surgery programs
  - Herz- Lungen- Leber- und vaskuläre Operationen
- Rehabilitationsprogramme
  - Chirurgie
  - Kardiologie
  - Pulmonologie
  - Neurologie
  - Traumatologie
  - Geriatrie
  - Plastische Chirurgie
- Trainingsprogramme
  - Gesunden Menschen
  - Professionelle Sportler
  - Anti-Aging (Erhaltung der inneren und äußeren Gesundheit)