



universität
wien

MASTERARBEIT

Auswirkung einer sechs-monatigen Ernährungs- und Trainings-
intervention auf oxidative DNA-Schäden bei institutionalisierten
Senioren

Verfasserin:

Bianca Arnold, Bakk.rer.nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Ernährungswissenschaften

Betreuer:

Univ. Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

Eidesstaatliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Informationen sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Wien, am 06.02.2013

(Bianca Arnold)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit direkt oder indirekt unterstützt haben.

In erster Linie möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. Karl Heinz Wagner für die Ermöglichung der Durchführung und die großartige Betreuung der Arbeit bedanken.

Ein großes Dank auch an Mag. Bernhard Franzke für die hervorragende Unterstützung und die tolle Zeit während des letzten Jahres.

Vielen Dank auch an meine Laborpartnerin Claudia Traxler, wir waren ein unglaublich tolles, eingespieltes Team und haben uns super ergänzt. Vielen Dank für die schöne Zeit.

Vielen Dank auch an Dr. Elisabeth Müllner, Dr. Christine Mölzer und Dr. Oliver Neubauer, für das nette Arbeitsklima und die super Unterstützung.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei meiner Freundin Karin für den guten Zuspruch und die schöne Studienzeit in Wien bedanken.

Großer Dank gebührt auch meinem Freund Daniel, der mir während der gesamten Studienzeit einen wichtigen Rückhalt gegeben hat.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglichen haben. Vielen Dank für das Vertrauen und die moralische und finanzielle Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

TABELLENVERZEICHNIS.....	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1 FREIE RADIKALE & OXIDATIVER STRESS	3
2.2 AUSWIRKUNGEN OXIDATIVER DNA-SCHÄDEN	4
2.3 ANTIOXIDATIVES ABWEHRSYSTEM.....	6
2.4 EINFLUSS DES ALTERNS	7
2.5 EINFLUSS VON NAHRUNGSMITTELINHALTSSTOFFE AUF OXIDATIVE DNA-SCHÄDEN	9
2.5.1 Vitamin C (L-Ascorbinsäure)	10
2.5.2 Vitamin A und β -Carotin	10
2.5.3 Vitamin E (Tocopherol).....	10
2.5.4 B-Vitamine.....	11
2.5.5 Selen	11
2.5.6 Zink	12
2.5.7 Protein.....	12
2.5.8 Zusammenfassung Antioxidantien	12
2.6 EINFLUSS VON TRAINING AUF DAS ANTIOXIDATIVE SCHUTZSYSTEM	13
2.7 COMET ASSAY	15
2.7.1 Prinzip Comet Assay	15
2.7.2 Einsatz bei humanen Interventionsstudien.....	17
2.7.2.1 Ernährungsinterventionsstudien und Comet assay.....	17

2.7.2.2	Moderates Training und oxidative DNA Schäden	19
2.7.3	Zusammenfassung Interventionsstudien	20
3	Material & Methoden.....	21
3.1	STUDIENDESIGN	21
3.2	TRAININGSINTERVENTION.....	22
3.3	ERNÄHRUNGSINTERVENTION.....	23
3.4	COMET ASSAY	25
3.4.1	Chemikalien	25
3.4.2	Technische Geräte	26
3.4.3	Equipment.....	27
3.4.4	Lösungen	27
3.5	VORBEREITUNG DER ZELLEN	29
3.5.1	Lymphozytenisolation.....	29
3.5.2	Zellzahlbestimmung	30
3.6	DURCHFÜHRUNG	31
3.6.1	Aufbringen auf Objektträger	31
3.6.2	Enzymbehandlung.....	32
3.6.3	Alkalibehandlung und Elektrophorese	33
3.6.4	Auswertung	34
3.7	STATISTISCHE AUSWERTUNG	35
4	ERGEBNISSE & DISKUSSION	36
4.1	DATENAUSWERTUNG	36
4.1.1	Studienkollektiv	36
4.1.2	Korrekturfaktoren.....	36
4.1.3	Altersverteilung.....	37
4.1.4	Geschlechterverteilung.....	39

4.1.5	Body Mass Index.....	40
4.2	ERGEBNISSE COMET ASSAY.....	42
4.2.1	Lyse Behandlung.....	42
4.2.2	Wasserstoffperoxid Behandlung	43
4.2.3	Behandlung mit FPG	50
4.2.4	Abschließende Betrachtung	55
5	SCHLUSSBETRACHTUNG	58
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	60
7	SUMMARY	62
8	LITERATURVERZEICHNIS	64
9	LEBENS LAUF.....	69

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 3.1: Ablauf einer Trainingseinheit.	23
Tabelle 3.2: Verabreichte und benötigte Menge der FortiFit Inhaltsstoffe pro Tag.	23
Tabelle 3.3: Angaben über Herkunft der verwendeten Chemikalien.	25
Tabelle 3.4: Firmen und Produktnummern der technischen Geräte.	26
Tabelle 3.5: Firmen und Produktnummern der Materialien.	27
Tabelle 4.1: Anzahl der ausgewerteten Probanden pro Studiengruppe.	36
Tabelle 4.2: Durchschnittliches Alter der Studiengruppen	39
Tabelle 4.3: BMI Klassifizierung ab 65 Jahren.	41
Tabelle 4.4: Signifikanzniveau p und relative Senkung der Werte der H_2O_2 Behandlung von T_1 auf T_3	44
Tabelle 4.5: Ascorbinsäurekonzentration der Interventionsgruppen vor Studienbeginn (MÜLLER,2012).	53
Tabelle 4.6: Standardabweichung und Variationskoeffizient der Behandlungen.	54

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1: Überblick über Entstehung, Auswirkung und antioxidativer Detoxifikation von ROS (ROBERTS et al., 2009).	5
Abbildung 2.2: Molekülstruktur des 8-OHdG modifiziert nach Mateos & Bravo, 2007...6	
Abbildung 2.3: Elektronenkette in den Mitochondrien generiert Elektronen, welche auf extrazellulären molekularen Sauerstoff übertragen werden (POWERS et al., 2011). ...13	
Abbildung 2.4: Geschädigte DNA im Mikroskop.....	16
Abbildung 2.5: H ₂ O ₂ induzierte DNA Schäden der Lymphozyten, vor und nach der Vitaminintervention (RIBEIRO et al., 2007).	17
Abbildung 2.6: SC= Lyse-Behandlung; ROS= H ₂ O ₂ -induzierter Schaden; weiße Balken: positive Ergebnisse; schwarze Balken: negative Ergebnisse (Hölzl et al., 2009).	19
Abbildung 3.1: Trennung der Blutbestandteile in einem Leukosep-Röhrchen nach Zentrifugation (MÜLLNER, 2011).	29
Abbildung 3.2: Countess.	30
Abbildung 3.3: Objekträger mit pipettierter Zellsuspension in Agarose.	32
Abbildung 3.4: Befüllte Elektrophorese.....	33
Abbildung 3.5: Kometprogramm 5.5.	35
Abbildung 4.1: Prozentuale Aufteilung der Studienteilnehmer nach Altersgruppen. ...	38
Abbildung 4.2: Prozentuale Verteilung der Alterskategorien in den Studiengruppen...	38
Abbildung 4.3: Geschlechterverteilung der Probanden.	40
Abbildung 4.4: Durchschnittlicher BMI der Geschlechter.	41
Abbildung 4.5: Lyse Behandlung der Interventionsgruppen.	42
Abbildung 4.6: Auswirkung der H ₂ O ₂ Behandlung auf % tail DNA der Trainingsgruppe.	44
Abbildung 4.7: Auswirkung der H ₂ O ₂ Behandlung auf % tail DNA der Ernährungsgruppe.	45
Abbildung 4.8: Auswirkung der H ₂ O ₂ Behandlung auf % tail DNA der Kontrollgruppe..	45

Abbildung 4.9: Unterschiedliche DNA Migration bei Zugabe von μM H_2O_2 in der Kontroll- (CON) und Trainingsgruppe (EX) (Parco et al., 2011).	46
Abbildung 4.10: Mengenmäßige Verteilung der Altersgruppen.	48
Abbildung 4.11: Auswirkung der H_2O_2 Behandlung der Studienteilnehmer < 85 Jahren.	49
Abbildung 4.12: Auswirkung der H_2O_2 Behandlung der Studienteilnehmer > 85 Jahren.	49
Abbildung 4.13: Auswirkung der Behandlung mit FPG auf die DNA Migration der Trainingsgruppe.	51
Abbildung 4.14: Auswirkung der Behandlung mit FPG auf die DNA Migration der Ernährungsgruppe.....	51
Abbildung 4.15: Auswirkung der Behandlung mit FPG auf die DNA Migration der Kontrollgruppe.	52
Abbildung 4.16: DNA Migration vor und nach der Kohlsprossen-Intervention (Hölzl et al. 2008).....	53

1 EINLEITUNG

Die Lebenserwartung der Weltbevölkerung steigt kontinuierlich. Aufgrund niedriger Geburtenraten und einer erhöhten Lebenserwartung steigt die Anzahl der Senioren insbesondere in den entwickelten Ländern. Laut Schätzungen werden hier im Jahr 2060 nahezu 40 % älter als 60 Jahre alt sein (Statistisches Bundesamt, 2012).

Das Lebensalter korreliert mit der Prävalenz altersabhängiger Krankheiten wie Typ 2 Diabetes, Krebs, Sarkopenie, neurodegenerativen Störungen und Kardiovaskulären Krankheiten.

Das Altern geht mit verschiedenen organischen Veränderungen, wie einem Rückgang an Muskelmasse und Knochendichte und einer Erhöhung des Fettgewebes einher. Zusätzlich kommt es allgemein zu einem Rückgang des Physical Activity Level (PAL).

Die physiologischen Altersveränderungen betreffen auch die Regulation der Nahrungsaufnahme. Daneben können körperliche und kognitive Einschränkungen und Krankheiten die Nahrungsaufnahme bzw. Nährstoffverwertung beeinträchtigen. Das führt in weiterer Folge zu einer geringeren Aufnahme an Antioxidantien und damit zu einem erhöhten prooxidativen Potenzial. Wenn die Bildung freier Radikale die schützende Wirkung der Antioxidantien übersteigt, führt das zu oxidativen Schäden, welche sich im Laufe des Lebens akkumulieren und im Alterungsprozess und bei altersabhängigen Krankheiten eine große Rolle spielen. Um auch noch im hohen Alter bei guter Gesundheit zu bleiben, müssen Senioren ermutigt werden einen gesunden Lebensstil zu führen. Dieser beinhaltet regelmäßige körperliche Aktivität und eine Ernährung reich an Antioxidantien (RAHMAN K., 2007).

Daraus leitet sich die Hypothese der Forschungsplattform Active Ageing ab, dass eine adäquate Ernährung und regelmäßiges Training im hohen Alter positive Auswirkungen auf die körperliche Leistungsfähigkeit und das Wohlbefinden haben könnten.

Das Ziel dieser randomisierten, Beobachter-blinden, kontrollierten Interventionsstudie ist es, die Auswirkungen von Training mit und ohne zusätzliche Ernährungssupplementation auf verschiedene Parameter (Muskelkraft und -masse, oxidative Stressparameter, Immunsystem) zu erfassen.

Die folgende Arbeit stellt einen Teil der Active Ageing Studie dar und untersucht speziell die Auswirkung auf oxidative DNA Schäden mittels Comet assay. Diese Methode wird aufgrund vieler Vorteile (schnell, sensibel, flexibel, kostengünstig) gegenüber anderen genotoxischen Tests wie Mikrokern, Chromosomenabberations-assay, GC- MS, HPLC zunehmend bei der Detektion oxidativer DNA Schäden eingesetzt. Im Rahmen dieser Studie soll die Frage geklärt werden, ob sich Ernährungs- und Trainingsinterventionen auch noch im hohen Alter positiv auf genetischer Ebene auswirken können.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 FREIE RADIKALE & OXIDATIVER STRESS

Das menschliche Genom ist ständig DNA-schädigenden Agenzien ausgesetzt. Dabei ist die Oxidation durch freie Radikale die häufigste Form der Schädigung. Neben Substanzen aus der Umwelt, wie UV-Licht, genotoxische Chemikalien und Zigarettenrauch stellen vor allem Produkte des normalen zellulären Metabolismus eine wichtige Quelle für freie Radikale dar.

Freie Radikale sind reaktive, chemische Spezies mit einem einzelnen ungepaarten Elektron in der äußersten Schale. Diese instabile Konfiguration ist sehr energiereich und kann durch Reaktionen mit benachbarten Molekülen, wie Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren freigesetzt werden. Dadurch kommt es zur Schädigung dieser Moleküle, welche bei ungenügender Reparatur weitreichende Konsequenzen auf den gesamten Organismus haben kann (RAHMAN et al., 2007).

Den Großteil freier Radikale stellen sog. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) dar, welche aus Radikalen oder anderen reaktiven Sauerstoffstrukturen bestehen. Dazu gehören u.a. das Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxyl-Radikal ($OH^{\cdot}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (ROBERTS und SINDHU, 2009).

Im Organismus entstehen ROS im Laufe des normalen Stoffwechselvorgangs bei verschiedenen Biosyntheseprozessen, als Nebenprodukt der Zellatmung in den Mitochondrien und der Phagozytoseaktivierung bei auftretenden Entzündungen.

Demzufolge erhöhen auch inflammatorische Krankheiten wie Hepatitis, Dermatitis, rheumatoide Arthritis den oxidativen Status im Körper.

Letztlich wird auch der allgemeine Alterungsprozess mit einer stetigen Akkumulation von freien Radikalen und der Entstehung altersassoziierter Krankheiten in Zusammenhang gebracht (RAHMAN et al., 2007).

Der wichtigste DNA Reparaturmechanismus ist der sog. base excision repair (BER), welcher in der Lage ist, kleine Basenmodifikationen zu beheben. Nachdem eine geschädigte Base von DNA-Glykosylase-Läsionsspezifischen Enzymen entfernt wurde, wird die dadurch entstehende Lücke sofort mit einer neuen Base durch die DNA Ligase gefüllt. (AZQUETA et al., 2009)

Bei niedrigen Konzentrationen haben endogen gebildete ROS aber durchaus positive Auswirkungen auf den Organismus. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Abwehr infektiöser Agenzien und anderer schädlicher oder pathogener Noxen und haben eine wichtige Funktion in zahlreichen Signalsystemen der Zelle (BARTOSZ, 2009).

Wenn es jedoch zu Zellschäden aufgrund eines übermäßigen Vorhandenseins reaktiver Sauerstoffverbindungen kommt, wird dies als „oxidativer Stress“ bezeichnet. Dieser Zustand entsteht entweder aufgrund einer verstärkten Bildung solcher reaktiver Metabolite oder durch Unzulänglichkeiten in der oxidativen Abwehr (GOODYEAR-BRUNCH und PIERCE, 2002).

2.2 AUSWIRKUNGEN OXIDATIVER DNA-SCHÄDEN

Die Produkte, die beim oxidativen Stress entstehen, können mit weiteren zellulären Bestandteilen, wie Lipiden, Proteinen oder Nukleinsäuren interagieren und eine Vielzahl von schädigenden Oxidationsprodukten erzeugen (Abbildung 2.1).

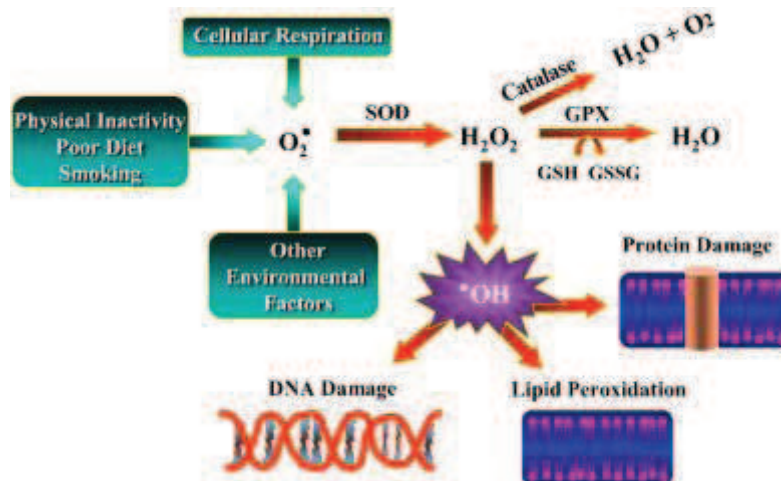


Abbildung 2.1: Überblick über Entstehung, Auswirkung und antioxidativer Detoxifikation von ROS (ROBERTS et al., 2009).

Insbesondere die Reaktion mit der DNA kann tief greifende Konsequenzen für den gesamten Organismus haben. Vor allem das Hydroxylradikal ist bekannt für die Schädigung sowohl der Purin- als auch der Pyrimidinbasen. Da Guanin das kleinste oxidative Potenzial aufweist, hat es unter den vier Basen die höchste Anfälligkeit gegenüber Oxidationsprozessen (Abbildung 2.2).

Demzufolge ist die Modifikation zu 8-hydroxy-2-desoxyguanosin (8-OHdG), die ein sehr hohes mutagenes Potential aufweist, die am häufigsten untersuchte Veränderung des Erbguts (HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1999).

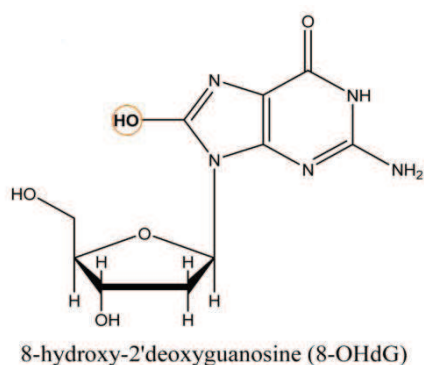


Abbildung 2.2: Molekülstruktur des 8-OHdG modifiziert nach Mateos & Bravo, 2007.

Oxidative DNA Schäden stören wesentlich die normalen Prozesse der Replikation oder Transkription, bzw. vermitteln einen zellulären Teilungsstopp. Im Weiteren können Mutationen erzeugt werden, durch die sich die Anzahl der Nukleobasen in einem Gen ändern, was zu Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen führen kann. Kommt es in solch einer Zelle zu weiteren genotoxischen Ereignissen, kann daraus unter Umständen ein Tumor entstehen. Somit sind oxidative DNA Schäden kausal an der Entstehung von Krebserkrankungen beteiligt (EVANS et al., 2004).

Desweiteren stehen oxidative DNA Schäden mit zahlreichen altersspezifischen Erkrankungen (Kardiovaskuläre Krankheiten, Diabetes mellitus, Sarkopenie, neurodegenerative Erkrankungen) in Zusammenhang (DALLE-DONNE et al., 2006).

2.3 ANTIOXIDATIVES ABWEHRSYSTEM

Oxidativer Stress kann durch eine Gruppe von Substanzen gebremst werden, die als Antioxidantien (AO) bezeichnet werden.

Solche Substanzen, sind in der Lage, ROS abzufangen und damit oxidativen Stress zu reduzieren. Sie bewerkstelligen dies entweder durch die Bildung eines weniger aktiven Radikals oder durch Abbruch der Kettenreaktion.

Enzymatische AO werden endogen produziert, nicht-enzymatische AO werden hauptsächlich mit der Nahrung, also exogen in den Körper aufgenommen.

Die wichtigsten antioxidativen Enzyme sind Superoxiddismutase (SOD), Katalase (CAT) und Glutathionperoxidase (GPX).

Zu den nicht-enzymatischen AO gehören viele Radikalfänger wie Vitamine (Retinol, Ascorbinsäure, Tocopherol), Thiole (Glutathion, Ubichinon, Harnsäure, Bilirubin) und Mikronährstoffe (Eisen, Kupfer, Zink, Selen, Magnesium) wobei letztere eher als Cofaktoren fungieren.

Daneben gibt es noch eine Vielzahl anderer antioxidativ wirksamer Komponenten. Dazu gehören sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Carotinoide, Flavonoide oder Polyphenole.

Unter „normalen Umständen“ besteht ein Gleichgewicht zwischen den Aktivitäten und den intrazellulären Konzentrationen dieser AO (MATES et al., 1999).

Das häufigste und damit bedeutendste AO im Cytosol, dem Zellkern und den Mitochondrien ist das Tripeptid Glutathion GSH.

Neben seiner Rolle als Radikalfänger, ist GSH in der Lage, weitere AO wie Vitamin C und E zu regenerieren und ihnen damit ihre ursprüngliche Form wiederzugeben. Außerdem fungiert es als Cofaktor verschiedener detoxifizierender Enzyme wie der Glutathionperoxidase (MASELLA et al., 2005).

Die Effizienz des antioxidativen Systems ist somit einerseits ernährungsbedingt und andererseits abhängig von der endogenen Enzymproduktion, die durch Sport, Training und Ernährung modifiziert werden kann.

2.4 EINFLUSS DES ALTERNS

Der Alterungsprozess ist mit einer allgemeinen Abnahme physiologischer Funktionen assoziiert. Der genaue Mechanismus dahinter ist noch unklar. Die „Freie Radikale Theorie“ (engl.: Free Radical Theory of aging) ist ein bekanntes Erklärungsmodell für das Altern des Organismus. Die These wurde schon 1956 von dem amerikanischen Biogerontologen D. Harman aufgestellt und besagt, dass Altern das kumulative

Ergebnis oxidativer Zellschäden ist, welches durch eine Zunahme an freien Radikalen hervorgerufen wird (HARMAN, 2003).

Viele Evidenzen unterstützen diese Hypothese:

- Die Lebensspanne korreliert mit der metabolischen Rate und der antioxidativen Aktivität
- Eine verbesserte Expression antioxidativer Enzyme führt zu einem signifikanten Anstieg der Lebenserwartung
- Zellschäden, die durch freie Radikale ausgelöst werden, nehmen mit dem Alter zu

Die Freie Radikale Theorie stellt jedoch nicht den einzigen Versuch eines Erklärungsmodells dar. Aufgrund weiterer Theorien, wie der Telomer-Hypothese handelt es sich beim Alterungsprozess vermutlich um einen multifaktoriellen Prozess (WICKENS, 2001).

Neben dem erhöhten oxidativen Stress, kommt es im Alter gleichzeitig zu einer Abnahme des antioxidativen Schutzsystems.

Hier sind vor allem die fehlenden Antioxidantien aus der Nahrung zu nennen. Physiologische und kognitive Altersveränderungen, aber auch körperliche Einschränkungen und Krankheiten, können die Nahrungsaufnahme bzw. Nährstoffverwertung beeinträchtigen. Aufgrund des abnehmenden Energiebedarfs und des gleichbleibenden bzw. erhöhten Nährstoffbedarfs steigt das Risiko für eine Mangelernährung. Durch die sinkende Vitamin- und Mineralstoffkonzentration im Plasma verschlechtert sich die antioxidative Kapazität (LÖSER et al., 2007).

Aber auch endogene, enzymatische Antioxidanten wie Glutathion, Katalase oder Superoxiddismutase sind im Alter in einigen Geweben weniger stark exprimiert. Zudem kommt es im Alter zu einer verschlechterten Organfunktion, was direkt mit der Expression der Enzyme zusammenhängt (PARISE et al., 2005).

Mit zunehmendem Alter erhöht sich außerdem der pro-inflammatorische Status, welcher v.a. durch eine ansteigende Konzentration an Entzündungsparametern wie

Zytokinen und akuten Phasen Proteinen (vor allem CRP) gekennzeichnet ist. Dieses Phänomen wird auch als niedrig-gradiger Entzündungsstatus (engl.: low-grade inflammation) bezeichnet (MILES et al., 2008).

Der Grund für die chronisch erhöhte Konzentration an Entzündungsparametern ist eine Dysregulation der Zytokinantwort nach der Stimulation. Weitere Faktoren, einschließlich einer verringerten Produktion von Geschlechtsstereoiden und altersabhängigen Krankheiten, wie kardiovaskuläre Krankheiten, Demenz und Sarkopenie tragen zu diesem Phänomen bei. Desweiteren kommt es im Alter zu einer relativen und absoluten Erhöhung des Fettgewebes, das bekanntermaßen bei der Produktion von Interleukinen und TNF mitwirkt.

Zusätzlich erhöht der Entzündungsstatus per se, oxidativen Stress. Während der Entzündungsantwort produzieren Neutrophile durch die NADPH-Oxidase Reaktion große Mengen an Superoxiden (FERRUCCI et al., 2005).

Die Konzentration an Entzündungsmarkern korreliert mit Lebensstilparametern, wie Rauchen, Übergewicht und körperliche Inaktivität. Diese Faktoren sind wiederum mit dem antioxidativen Status assoziiert. Aus diesem Grund spielen Verbesserungen des Trainingsstatus und des antioxidativen Schutzsystems besonders im Alter eine wichtige Rolle (KRABBE et al., 2004).

2.5 EINFLUSS VON NAHRUNGSMITTELINHALTSSTOFFE AUF OXIDATIVE DNA-SCHÄDEN

Es ist allgemein bekannt, dass Ernährung einen Einfluss auf die Pathogenese vieler Krankheiten hat. Da Nahrungsmittelinhaltsstoffe essentiell für grundlegende zelluläre Prozesse sind, nehmen sie auch einen hohen Stellenwert in der Regulation oxidativer Schäden und der antioxidativen Abwehr ein.

Im Alter nimmt das Risiko einer Unter- und Mangelernährung zu. Die Prävalenz der über 70-jährigen liegt bei 10 bis 20 %. Man nennt dieses Phänomen auch Altersanorexie. Gründe hierfür sind abnehmende Sinneswahrnehmungen von Geschmack, Geruch und Sehen, veränderte gastrointestinale Sättigungsmechanismen und

Veränderungen verschiedener Sättigungshormone (Leptin, Cholecystekinin, Testosteron). Zusätzlich steigt auch das Risiko für gastrointestinale Funktionsstörungen, wodurch Schluck- oder Kaufunktionen beeinträchtigt sein können. Durch die unzureichende Nahrungszufuhr sinkt auch die Konzentration an Antioxidantien, wodurch das prooxidative Potenzial erhöht wird (LÖSER et al., 2007).

Im Folgenden werden besonders kritische Nährstoffe in Bezug auf das antioxidative Potenzial, insbesondere bei Senioren diskutiert:

2.5.1 Vitamin C (L-Ascorbinsäure)

Das wasserlösliche Vitamin ist eines der wichtigsten AO in extrazellulären Flüssigkeiten. Vitamin C ist in der Lage, die reaktiven Sauerstoffspezies Superoxid und Hydroxylradikal zu neutralisieren und andere Antioxidantien (Vitamin E, GSH) zu regenerieren. Seine präventive Wirkung bei oxidativen Stress wird diskutiert (DUARTE et al., 2005).

Allerdings gibt es auch Hinweise auf eine prooxidative und DNA-schädigende Wirkung. Ascorbinsäure kann vorhandene Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduzieren, welches H_2O_2 zu Hydroxylradikalen reduziert (Fenton Reaktion) (HERBERT, 2006).

2.5.2 Vitamin A und β -Carotin

β -Carotin, welches v.a. in Zellmembranen zu finden ist, kann bei Bedarf in das fettlösliche Vitamin A umgewandelt werden.

β -Carotin ist der wirkvollste und effizienteste Radikalfänger in Bezug auf die Deaktivierung von Singulett-Sauerstoff. Durch seine konjugierten Doppelbindungen ist es in der Lage, ungepaarte Elektronen zu delokalisieren. Eine Carotinoid-reiche Ernährung verringert das Risiko altersabhängiger Krankheiten (MORTENSEN et al., 2001). Andererseits steht eine hohe β -Carotin Zufuhr (>20 mg/d) bei Rauchern unter dem Verdacht krebserregend zu sein (SOMMER et al., 2012).

2.5.3 Vitamin E (Tocopherol)

Vitamin E ist das bedeutendste fettlösliche Antioxidans und existiert in acht verschiedenen Formen, wobei alpha-Tocopherol die häufigste und aktivste Form

darstellt. Vitamin E agiert als direkter Radikalfänger, indem es Sauerstoffradikale unschädlich macht. Während dieser Reaktion wird Vitamin E selbst in ein Radikal umgewandelt. Dieses kann durch Ascorbinsäure in die ursprüngliche Form regeneriert werden.

Zusätzlich interagiert Vitamin E mit weiteren antioxidativen Substanzen, was zu synergistischen Effekten führt. In Kombination mit Selen erhöht es die Aktivität der Glutathionperoxidase, bei dem Selen als Cofaktor fungiert (HENSLEY, 2004).

2.5.4 B-Vitamine

Vitamin B2 (Riboflavin) ist ein bedeutender struktureller Teil des Coenzym FAD und hilft damit bei der Regeneration von Glutathion durch die FAD-abhängige Glutathionreduktase.

Vitamin B3 (Niacin) ist Bestandteil der Coenzym NADPH und spielt bei zahlreichen Redoxreaktionen eine wichtige Rolle (ELMADFA, 2004).

Die Vitamine B12 und Folsäure spielen eine wichtige Rolle bei der Homocysteinregulation. Erhöhte Serumwerte an Homocystein (Hyperhomocysteinämie) stellen ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Krankheiten dar. Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen Hyperhomocysteinämie und dem Auftreten von Frakturen (MITHAL et al., 2012).

2.5.5 Selen

Das essentielle Spurenelement ist Bestandteil der Aminosäure Selenocystein, die einen wichtigen Teil der antioxidativen Proteine Glutathionperoxidase und Thioredoxinreduktase darstellt (BIRRINGER et al., 2002).

Außerdem wird der Einfluss von Selen auf die NF- κ B Signalkaskade diskutiert. Selen ist in der Lage, die NO Produktion und damit die darauf folgende Entzündungskaskade zu regulieren.

Ein Mangel an Selen ist mit dem Auftreten kardiovaskulärer und neurodegenerativer Erkrankungen assoziiert. Das therapeutische Fenster ist jedoch sehr schmal, eine Überdosierung durch übermäßige Supplementeinnahme wäre toxisch (KIM et al., 2004).

2.5.6 Zink

Zink ist Bestandteil der SOD, einem weiteren wichtigen enzymatischen AO. Die Zinkaufnahme über die Nahrung sinkt mit zunehmendem Alter. Im Vergleich zu jüngeren Erwachsenen haben Senioren einen um 30 % niedrigeren Plasma-Zink-Spiegel. Ein Zinkmangel erhöht die Zytokinproduktion, indem Monozyten und Makrophagen zur Produktion angeregt werden. In einer randomisierten, Placebo kontrollierten Studie von Prasad et.al führte eine sechsmonatige Zinksupplementation (45 mg/d) bei Älteren (n= 45; 56-83 y) zu einer Verringerung der Zytokinausschüttung und einer geringeren Plasmakonzentration an Marker für oxidativen Stress (PRASAD et al., 2007).

2.5.7 Protein

Aminosäuren sind die Bausteine antioxidativer Enzyme (z.B. GPX, CAT, Harnsäure).

Eine geringe Proteinaufnahme durch die Ernährung kann daher zu einer geringeren Synthese und infolge dessen zu einem erniedrigten antioxidativen Status führen. Beispielsweise korreliert die Katalase-Konzentration mit der Aufnahme essentieller Aminosäuren. Die schwefelhaltigen Aminosäure Cystein ist Bestandteil des antioxidativen Tripeptid GSH, weshalb dessen Status abhängig von der aufgenommenen Menge dieser Aminosäure ist (ATMACA et al., 2004).

Außerdem gibt es Hinweise, dass eine unzureichende Proteinaufnahme zu einem Mangel an Zink führt. Der Grund dafür ist wahrscheinlich die sinkende Plasmakonzentration an Albumin, welches einen wichtigen Zinktransporter darstellt (FANG et al., 2002).

2.5.8 Zusammenfassung Antioxidantien

Die Nahrungsaufnahme antioxidativer Nährstoffe beeinflusst sowohl die Plasmakonzentration als auch den antioxidativen Status. Eine inadäquate Aufnahme führt zu einer Reduzierung des körpereigenen Abwehrsystems und damit zu einer erhöhten Schädigung durch freie Radikale. Auf Grund der erwähnten Interaktionen einiger Mikronährstoffe, bedarf es einer optimalen Aufnahme aller antioxidativen

Nährstoffe. Der Mangel eines einzelnen Nährstoffes kann nicht kompensatorisch durch eine erhöhte Zufuhr anderer Mikronährstoffe ausgeglichen werden, und hat somit weitreichende Konsequenzen auf die antioxidative Abwehr.

2.6 EINFLUSS VON TRAINING AUF DAS ANTIOXIDATIVE SCHUTZSYSTEM

Sport und regelmäßige Bewegung können das Risiko für altersassoziierte Krankheiten wie Typ 2 Diabetes, Krebs, und Kardiovaskuläre Krankheiten reduzieren (RADAK et al., 2008). Andererseits geht akute, intensive, körperliche Belastung mit der Bildung freier Radikale und oxidativen Schäden einher (POWERS et al., 2011; DAVIES et al., 1982).

Freie Radikale werden im Rahmen des normalen Energiestoffwechsels kontinuierlich produziert. Da bei körperlicher Betätigung die Atemfrequenz und damit der Sauerstoffverbrauch (VO_2) steigt, führt dies auch zu einer höheren Belastung der mitochondrialen Atmungskette.

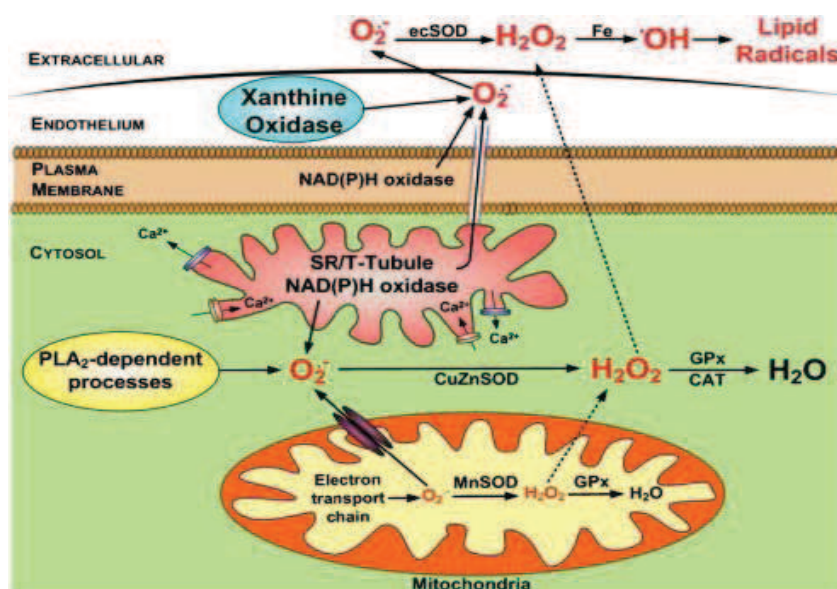


Abbildung 2.3: Elektronenkette in den Mitochondrien generiert Elektronen, welche auf extrazellulären molekularen Sauerstoff übertragen werden (POWERS et al., 2011).

Durch den verstärkten Elektronenstrom kommt es zu einer erhöhten Konzentration an Elektronen, die die Cytochrom-Oxidase der Atmungskette nicht passieren. Diese freigesetzten Elektronen werden durch die NADPH-Oxidase auf extrazellulären molekularen Sauerstoff übertragen. Es entsteht Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), eine reaktive Sauerstoffspezies, die in weiterer Folge oxidative Schäden in der Zelle hervorruft (Abbildung 2.3) (POWERS et al., 2011).

Dagegen hat regelmäßiges, moderates Training positive Auswirkungen auf das Immunsystem und metabolische Funktionen. Durch die erhöhte Produktion freier Radikale während des Trainings wird das antioxidative Schutzsystem stärker beansprucht. Der Körper passt sich der neuen Stresssituation an, indem vermehrt enzymatische und nicht-enzymatische AO im Plasma und den Zellen freigesetzt werden. Je besser der Trainingsstatus, desto geringer fällt die prooxidative Belastung aus. Diese Hochregulierung antioxidativer Enzyme bei regelmäßiger Belastung ist durch viele Studien belegt (KAROLKIEWICZ et al., 2009; WATSON et al., 2005).

Tierstudien haben ergeben, dass die Anpassungsfähigkeit zu einer erhöhten Konzentration relevanter Enzyme in den Mitochondrien führt. Dabei erhöht sich nicht nur die relative Enzymmenge, sondern auch die absolute Anzahl an Mitochondrien pro Zelle, wodurch die prooxidative Belastung der einzelnen Mitochondrien sinkt (YEO et al., 2012).

Zusätzlich erhöht regelmäßige körperliche Aktivität die Harnsäure-Plasma-Konzentration. Neben der antioxidativen Kapazität, ist Harnsäure in der Lage, stabile Eisenkomplexe zu bilden. Dadurch wird die Fe^{3+} katalysierte Vitamin C-Oxidation und Lipidperoxidation gehemmt. Somit stellt Harnsäure einen wichtigen Vitamin C Protektor dar (Finaud et al., 2006).

Aufgrund dieser unterschiedlichen Effekte bei körperlicher Belastung, ist das Gleichgewicht zwischen nutzbringenden und potenziell schädlichen Auswirkungen des Trainings, insbesondere bei Älteren, von besonderer Bedeutung.

2.7 COMET ASSAY

Der Comet assay, der auch Einzel-Zell Gelelektrophorese (single cell gel electrophoresis, SCGE) genannt wird, basiert auf der Quantifikation denaturierter DNA Fragmente, die aus dem Zellkern in einem elektrischen Feld wandern.

Die ersten Versuche wurden 1984 von den schwedischen Wissenschaftlern Ostling und Johanson unter neutralen Bedingungen durchgeführt, wodurch die Detektion von DNA Doppelstrangbrüchen ermöglicht wurde (OSTLING und JOHANSON, 1984).

Einige Jahre später wurde die Methode von Singh et al. (SINGH et al., 1988) und Olive et al. (OLIVE et al., 1991) modifiziert, indem eine Alkalibehandlung ($\text{pH} > 13$) während der Elektrophorese durchgeführt wurde. Unter diesen Bedingungen ist es möglich, Einzelstrangbrüche, Doppelstrangbrüche und oxidierte Basen in der DNA von eukaryotischen Zellen zu messen.

Die Vorteile gegenüber anderen genotoxischen Untersuchungsmethoden sind eine relativ einfache und kostengünstige Durchführung, ein verringerter Zeitaufwand und eine hohe Sensitivität (HARTMANN et al., 2003).

Der Grund für die Namensgebung ist das unter dem Mikroskop erzeugte Bild, bei der die DNA einem astronomischen Kometen ähnelt, wobei der Kometenkopf intakte DNA und der Schweif beschädigte bruchstückhafte DNA beinhaltet (Abbildung 2.4).

Dabei spiegelt die Intensität des Kometen- Schweifes in Relation zum Kopf die Anzahl an DNA Schädigungen wider.

2.7.1 Prinzip Comet Assay

Die anfängliche Lysebehandlung der Zellen führt zu einer vollständigen Abtrennung der DNA von anderen Zellkomponenten. Durch den hohen Salzgehalt werden außerdem nahezu alle Histone solubilisiert.

Was übrig bleibt ist das Nucleotid, welches aufgrund der Windungen der Doppelhelix um die Histone negativ geladen ist. Da die DNA auch ohne das Vorhandensein von Histonen in dieser Struktur verweilt, spricht man von einer „Supercoiled“ DNA.

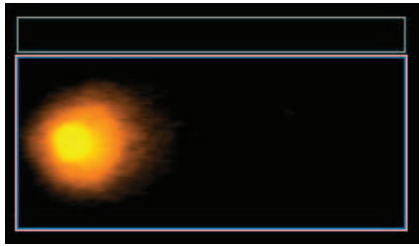


Abbildung 2.4: Geschädigte DNA im Mikroskop.

Durch anschließende Inkubation mit einem alkalischen Puffer denaturiert die DNA und wird einzelsträngig („alkaline unwinding“). Dabei verlieren DNA–Schleifen, die einen Strangbruch beinhalten, ihr Supercoiling und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Je kleiner die Bruchstücke, desto weiter wandern sie.

Durch die nachfolgende Neutralisation renaturieren die intakten DNA Stränge, wodurch sie ihre ursprüngliche supercoiled Struktur erhalten. Die bruchstückhafte DNA im Kometenschweif bleibt weiterhin einzelsträngig.

Um die Resistenz der Zellen gegenüber ROS zu untersuchen, können die lysierten Lymphozyten zusätzlich einer H_2O_2 Behandlung unterzogen werden.

Überdies kann die Sensitivität und Spezifität verbessert werden, indem die Nukleotide mit Reperaturenzymen (Endonukleasen) inkubiert werden. Diese können spezifische Schädigungen in der DNA erkennen, und in einen Bruch umwandeln. Dadurch wird die Schweif-Intensität erhöht und der Assay sensitiver.

Das, in der folgenden Methode, verwendete Reparaturenzym FPG erkennt oxidativ geschädigte Purine, wie 8-OH Guanin, schneidet sie aus der DNA und ruft somit einen Strangbruch hervor.

Um die DNA unter dem Fluoreszenz- Mikroskop zu visualisieren, kann sie mit Ethidiumbromid eingefärbt werden (Abbildung 2.4). Der Farbstoff interkaliert mit der DNA, indem er sich in die Zwischenräume der Basenpaare einfügt. Dadurch verändert sich das Absorptionsspektrum, indem die Intensität der Fluoreszenz-Emission

zunimmt. Auf diese Weise leuchten im Agarosegel die Stellen, an denen sich Nukleinsäuren befinden hell auf. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur DNA Konzentration (AZQUETA et al., 2009)

Um die genotoxischen Schäden zu quantifizieren, wird der Parameter Tail-Intensität herangezogen: $\text{DNA im tail} / \text{DNA in der Zelle} \times 100$ (BURLINSON et al., 2007)

2.7.2 Einsatz bei humanen Interventionsstudien

2.7.2.1 Ernährungsinterventionsstudien und Comet assay

In einer randomisierten, Placebo-kontrollierten Interventionsstudie (n= 80; 45-70 Jahre) von Ribeiro et al. wurde die Auswirkung einer Multivitamin supplementation auf oxidative DNA mittels Comet assay untersucht. Die Probanden der Behandlungsgruppe (n=40) bekamen vier Wochen lang ein Multivitaminpräparat (Vitasay®).

Es konnte eine signifikante Senkung der H_2O_2 -induzierten DNA Schäden zur Vergleichsgruppe festgestellt werden (Abbildung 2.5) (RIBEIRO et al., 2007).

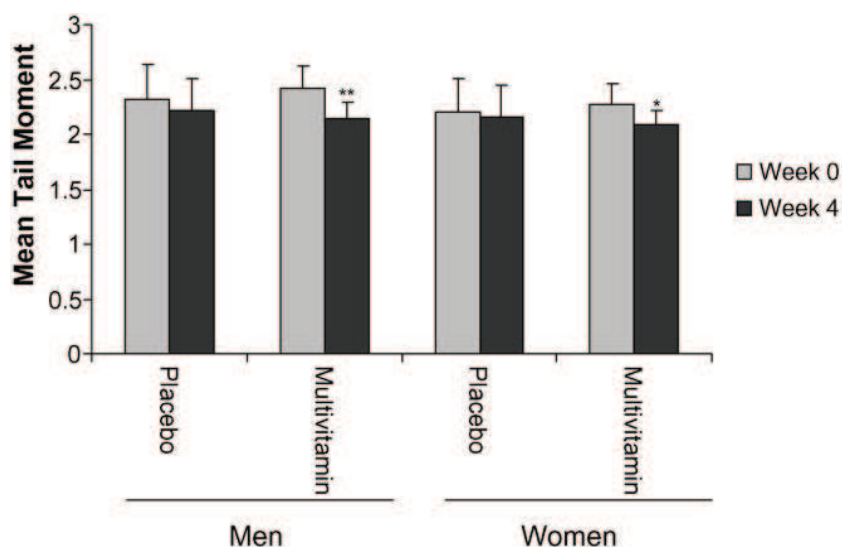


Abbildung 2.5: H_2O_2 induzierte DNA Schäden der Lymphozyten, vor und nach der Vitaminintervention (RIBEIRO et al., 2007).

In einer weiteren Placebo-kontrollierten Studie (n=60, 65-85y) wurde die Auswirkung bei Verabreichung zwei verschieden dosierter Vitaminsupplemente und einer Carotinoid-reichen Ernährung auf den antioxidativen Status untersucht. Am Ende der fünf-wöchigen Studie gab es bei den verschiedenen Behandlungsgruppen, im Vergleich zur Placebogruppe, keine signifikante Veränderung hinsichtlich oxidativem Stress. Trotzdem waren die Werte für 8-OHdG bei den Interventionsgruppen geringer als bei der Kontrollgruppe. Es machte dabei keinen Unterschied, ob der Anstieg antioxidativer Vitamine von der veränderten Ernährung oder den Supplementen stammte (NELSON et al., 2003).

In einer randomisierten, parallel angelegten Studie von Møller et al. wurden die Probanden (n=43; 21-56y) in drei Gruppen aufgeteilt. Sie bekamen für einen Zeitraum von 24 Tagen entweder 600 g Obst und Gemüse, ein Supplement einer äquivalenten Menge an AO und Mineralien oder ein Placebo. Zwischen den einzelnen Gruppen gab es keine Unterschiede in Bezug auf oxidative DNA Schäden (Møller et al., 2003).

In einem Review, in dem Humanstudien (n=20) mit Ernährungsintervention mittels Comet assay ausgewertet wurden, konnte gezeigt werden, dass ROS- und Enzymbehandelte Lymphozyten häufiger einen signifikanten Abfall an DNA Schäden verzeichnen können.

Studien, bei denen die Zellen nur einer Lysebehandlung unterzogen wurden konnten nur zu einem Drittel einen Abfall an DNA-Migration aufzeigen. Bei ROS induzierten DNA-Schäden und FPG-behandelten Zellen konnte bei etwa der Hälfte der ausgewerteten Studien ein Abfall registriert werden (Abbildung 2.6) (Hölzl et al., 2009).

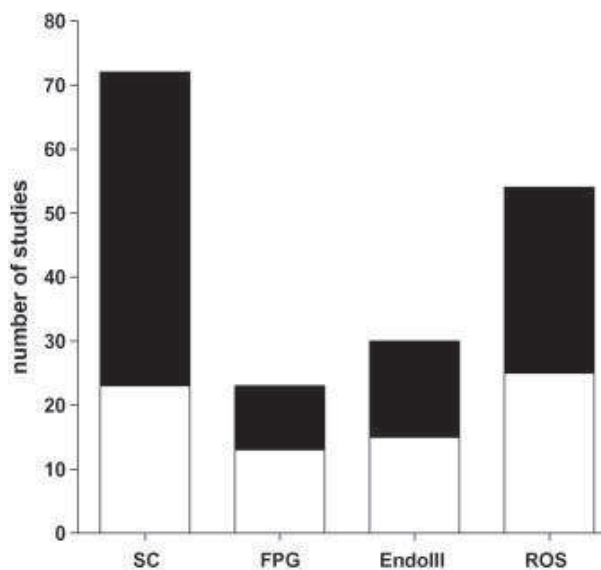


Abbildung 2.6: SC= Lyse-Behandlung; ROS= H₂O₂-induzierter Schaden; weiße Balken: positive Ergebnisse; schwarze Balken: negative Ergebnisse (Hölzl et al., 2009).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie (n=97: 76 diabetische, 21 nicht-diabetische) wurde die Auswirkung einer gesunden Ernährung (300 g Gemüse + 25 ml PUFA-reiches Pflanzenöl/ d) auf oxidative DNA Schäden mittels Comet assay untersucht. Nach 16 Wochen kam es bei den gesunden Probanden im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner signifikanten Verbesserung der DNA Migration. Im Gegensatz dazu konnte bei den diabetischen Studienteilnehmern eine signifikante Verbesserung festgestellt werden (MÜLLNER et al., 2013).

2.7.2.2 Moderates Training und oxidative DNA Schäden

In einer Studie von Allgayer et al. wurde der Unterschied zwischen moderater (0,3-0,4 x Trainingskapazität_{max}) und hoher (0,5-0,6 x Trainingskapazität_{max}) Trainingsintensität auf den oxidativen Status (8 OHdG) gemessen.

Die Probanden, die das gemäßigte Trainingsprogramm absolvierten (n=19) hatten im Gegensatz zu den Studienteilnehmern mit der höheren sportlichen Belastung (n=29) einen signifikant geringeren 8-OHdG Spiegel (Allgayer et al., 2008).

In einer weiteren Studie wurde der Einfluss von ROS auf oxidative DNA-Schäden bei untrainierten (n=135) und trainierten Läufern (n=134) mittels Comet assay nach einem 4000 m Lauf gemessen.

Im Unterschied zu den Läufern konnte bei den untrainierten Probanden ein signifikanter Unterschied zwischen den unbehandelten (Lyse) und den mit ROS (250 μ l H_2O_2) induzierten Leukozyten in Bezug auf oxidative DNA Schäden beobachtet werden (Miranda-Vilela et al., 2010).

2.7.3 Zusammenfassung Interventionsstudien

Die bisher durchgeführten humanen Interventionsstudien zeigen unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Auswirkung oxidativer DNA-Schäden in Lymphozyten. Ein Grund dafür könnte die, in vielen Studien beobachtete, geringe Probandenanzahl und kurze Studiendauer sein.

Über die Auswirkung eines regelmäßigen, moderaten Trainings über einen längeren Zeitraum existieren kaum Daten in Bezug auf oxidativen DNA- Schäden im Menschen. Bessere Daten liefern dagegen Studien bezüglich Ernährungsinterventionen und Comet assay.

Tendenziell ist die Auswirkung der erwähnten Interventionen auf H_2O_2 induzierte DNA Schäden am größten, daher wurde auch bei der vorliegenden Studie ein besonderes Augenmerk auf diese Behandlung gelegt.

3 Material & Methoden

3.1 STUDIENDESIGN

Ziel dieser randomisierten, Beobachter-blinden, kontrollierten Interventionsstudie ist es, die Auswirkung von Training mit und ohne zusätzlicher Ernährungssupplementation auf oxidative DNA-Schäden bei älteren, institutionalisierten Personen zu erfassen.

Die Probanden mit einem Mindestalter von 65 Jahren, wurden aus fünf Wiener Pensionistenhäuser rekrutiert. Es wurden sowohl Männer als auch Frauen aufgenommen. Da in den Wohnhäusern jedoch 90 % Frauen untergebracht sind, waren die Studienteilnehmer vorwiegend weiblich (84,8 %). Die Teilnehmer wurden nach einer Eingangsuntersuchung zufällig, aber stratifiziert nach körperlichem Fitnesszustand (SPPB), Geschlecht und Altersgruppe einer Interventionsgruppe (Krafttraining, Krafttraining und Ernährung, Kontrollgruppe) zugeteilt.

Die Kontrollgruppe wurde als Gedächtnisgruppe angelegt. Sie behielt ihren momentanen Lebensstil bei, an Stelle der Trainings- und Ernährungsintervention wurden eigene Einheiten durchgeführt, bei denen sie kognitive Fähigkeiten trainierten, die keinen unmittelbaren Einfluss auf Muskelkraft und Ernährung hatten. Durch diese Maßnahme konnte einerseits ein Sozialisationseffekt bei den Interventionsgruppen ausgeschlossen werden, andererseits wurde die Compliance der Probanden erhöht.

Einschlusskriterien der Probanden waren ein Mindestalter von 65 Jahren, ein ausreichender kognitiver Zustand, gemessen anhand des Mini-mental state Test (> 24 Punkte), sowie ein für das Trainingsprogramm ausreichender körperlicher Gesundheitszustand.

Als Ausschlusskriterien galten chronische, progrediente Krankheiten, Medikation mit Antikoagulantien oder Cortison, manifeste Osteoporose, schwerwiegende kardiovaskuläre Krankheiten und regelmäßiges Krafttraining (>2x/Woche) in den letzten sechs Monaten.

Den Probanden wurde zu Beginn der Studie (T_1), nach drei (T_2) und sechs Monaten (T_3) Blut abgenommen, mit welchem der oxidative Status mittels Comet assay bestimmt werden konnte.

Aufgrund einer frühzeitigen Beendigung der Studie mancher Teilnehmer oder fehlender Werte aufgrund menschlicher oder technischer Fehler konnten letztlich nur die Daten von 51 Probanden zur Auswertung herangezogen werden. Das Alter dieser 51 Teilnehmer betrug durchschnittlich $82,2 \pm 6,3$ Jahre.

3.2 TRAININGSINTERVENTION

Das Training wurde die ersten sechs Monate unter Aufsicht 2x/Woche in Kleingruppen ($n=15$) durchgeführt. Nach einer vierwöchigen Gewöhnungsphase wurde die Intensität des Krafttrainings kontinuierlich an das Leistungsniveau angepasst.

Anschließend wurde das Training über weitere sechs Monate 1x/Woche angeleitet und 1x/Woche eigenständig absolviert. Im darauffolgenden halben Jahr sollen die Übungen 2x/Woche selbständig durchgeführt werden, wobei ein Supportteam regelmäßig Hilfestellung leisten wird.

Der Fokus des Trainings lag auf Kraft- und Stabilisationsübungen mit dem eigenen Körpergewicht und einem elastischen Band als zusätzlichen Widerstand. Die Übungen wurde nach dem Protokoll des American College of sports medicine durchgeführt (Robert S. Mazzeo: Exercise and the Older Adult).

Die Gesamtdauer einer Einheit betrug 50 Minuten und gliederte sich gemäß Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Ablauf einer Trainingseinheit.

Aufwärmen	10 min.	Propriozeption und Balancetraining
Hauptteil	30 min.	• 6-8 Übungen für die Muskelgruppen Beine, Rücken, Bauch, Brust, Schulter, Arme mit jeweils 10- 15 Wiederholungen bei 60- 80% des 1 RepMax • Stabilisationsübungen mit dem eigenen Körpergewicht • Theraband- Übungen
Schlussteil	10 min.	Entspannungsübungen

3.3 ERNÄHRUNGSINTERVENTION

Bei der Ernährungsinterventionsgruppe wurde zusätzlich zum Training ein Supplement (Fortifit, Nutricia Tabelle 3.2) verabreicht, welches täglich beim Frühstück und zusätzlich nach dem Training eingenommen wurde. Hierbei handelt es sich um ein diätisches Lebensmittel in Form einer Trinklösung für besondere medizinische Zwecke (ergänzende bilanzierte Diät).

Tabelle 3.2: Verabreichte und benötigte Menge der FortiFit Inhaltsstoffe pro Tag.

FortiFit Inhaltsstoffe	Portionsgröße 40g= verabreichte Menge/d	Benötigte Menge/d (>65 Jahre)
Brennwert	150 kcal	1600-2500 kcal
Eiweiß	20.7 g	44-54 g
Leucin	2.8	
KH	9.4g	50-60% der Energie
Fett	3.0g	30% der Energie
Ballaststoffe	1.3g	30 g
Vitamin A	150 µg RE	800-1000 µg RE

Vitamin D3	20 µg	20 µg
Vitamin E	7.5 mg α-TE	11-12 mg
Vitamin K	11 µg	65-80 µg
Thiamin B1	225 µg	1 mg
Riboflavin B2	250 µg	1.2 mg
Niacin B3	2.7 mg-NE	13 mg NE
Panthothensäure B5	800 µg	6 mg
Pyridovin B6	750 µg	1.2-1.4 mg
Folsäure	200 µg	400 µg
Vitamin B12	3 µg	3 µg
Biotin	6 µg	30-60 µg
Vitamin C	32 mg	100 mg
Natrium	150 mg	550 mg
Kalium	279 mg	2000 mg
Chlor	70 mg	830 mg
Calcium	500mg	1000 mg
Phosphor	250mg	700 mg
Magnesium	37mg	300-350 mg
Eisen	2.4mg	10 mg
Mangan	500 µg	2-5 mg
Zink	2.2mg	7-10 mg
Kupfer	270 µg	1-1.5 mg
Fluor	150 µg	3.1-3.8 mg
Molybdän	14 µg	50-100 µg
Selen	15 µg	30-70 µg
Chrom	7.4 µg	30-100 µg
Jod	20 µg	180 µg
Carotinoide	0.3 mg	0.8-1.0 mg

3.4 COMET ASSAY

3.4.1 Chemikalien

Tabelle 3.3: Angaben über Herkunft der verwendeten Chemikalien.

Chemikalien	Abkürzung	Firma	CAS-/ Produktnummer
Bovine serum albumin (0,2 mg/ml)	BSA	Sigma-Aldrich	A2153-50
Phosphat buffered saline	PBS	Sigma-Aldrich	D8537
Normal melting agarose	NMA	Invitrogen	16500-100
Low melting agarose	LMA	Invitrogen	16520-050
2-Amino-2(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol	Tris	Sigma-Aldrich	77-86-1
Ethylendiamintetra-aceticacid	EDTA	Sigma-Aldrich	60-00-4
O-[4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenoxy]polyethoxy-ethanol	Triton X	Sigma-Aldrich	9002-93-1
Natriumchlorid	NaCl	Sigma-Aldrich	60-00-4
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Hepes	Sigma-Aldrich	7365-49-9
Kaliumchlorid	KCl	Merck	493C-0500
Natriumhydroxid	NaOH	Sigma-Aldrich	1310-73.2

Glycerol		Sigma-Aldrich	G901-2
Hydrochloricacid >25%	HCL	Roth	6331-4
Hydrogen peroxide 30%	H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich	H1009
Potassium Hydroxid >86%	KOH	Sigma-Aldrich	60370
Ethidiumbromid 10 mg/ml		Sigma-Aldrich	056 K8907
RPMI- 1640 (without L- Glutamine)	RPMI	PAA	E15.039
Fetal Bovine Serum	FBS	PAA	A15-039
Dimethylsulfoxid	DMSO	Sigma-Aldrich	67-68-5
Trypanblau 0,4%		Sigma-Aldrich	761866

3.4.2 Technische Geräte

Tabelle 3.4: Firmen und Produktnummern der technischen Geräte.

Gerät	Firma	Produktnummer
Countess automates cell counter	Invitrogen	C10283
Power Supply	pwqLab	EV231
Zentrifuge	Eppendorf	5417R
Floureszenzlampe	Zeiss	L200

Floureszenzmikroskop (40x/0,65)	Zeiss	038-03241
------------------------------------	-------	-----------

3.4.3 Equipment

Tabelle 3.5: Firmen und Produktnummern der Materialien.

Material	Firma	Produktnummer
Deckgläser 20x20	VWR	631-1568
Deckgläser 22x22	VWR	631-1570
Objektträger	VWR	631-1551
Heparinröhrchen 9ml	Greiner Bio-one	455-084
Leucosepröhrchen 12ml	Greiner Bio-one	163-288
Zentrifugenröhrchen 50 ml	VWR	525-0159

3.4.4 Lösungen

NMA: 800 mg NMA in 80 ml Aqua_{dest.} in der Mikrowelle aufkochen. Bei Verwendung auf ca. 80°C abkühlen

LMA: 200 mg LMA in 20 ml PBS in der Mikrowelle aufkochen. Bei Verwendung auf 37°C abkühlen

Lyselösung (1Liter, pH=10)

146,1 g 2,5 M NaCl

1211 mg 10 mM Tris

29,2 g 0,1 M EDTA

Neutralisationspuffer (2 Liter, pH=7,5)

96,88 g 0,4 M Tris

25% HCL

Elektrophoreselösung (2Liter, pH=13)

24g 0,3 M NaOH

580 mg 0,1 M EDTA

Ethidiumbromidlösung (0,02 µg/ml)

10 µl Ethidiumbromid (10 µl /ml)

5 ml Aqua_{dest.}

Wasserstoffperoxidlösung

10,3 µl 0,1 M H₂O₂ mit 1 ml Aqua_{dest.} mischen

Davon 80 µl auf 80 ml Aqua_{dest.} auffüllen → 1,03 µM

Stocklösung Enzympuffer (1 Liter)

95,3 g 40mM HEPES

74,56 g 0,1 M KCl

1,46 g 0,5 mM EDTA

2,0 g 0,2 mg/ml BSA

In 50ml Röhrchen aliquotieren, bei -20°C lagern

Gebrauchsfertiger Enzympuffer (500ml)

50 ml der Stocklösung 1:10 mit Aqua_{dest.} verdünnen

Mit 1M KOH auf pH=8 einstellen

FPG-Lösung

1 ml gebrauchsfertigen Enzympuffer mit 10 % (=100 µl) Glycerol mischen

5 µl der FPG Stocklösung 1:50 mit der Enzympuffer-Glycerol-Lösung verdünnen (245 µl)

Auf 10 µl Aliquote verteilen und bei - 80°C lagern

Bei Gebrauch Aliquote mit 300 µl Enzympuffer (ohne Glycerol) verdünnen

(Endkonzentration: 1: 1500)

3.5 VORBEREITUNG DER ZELLEN

3.5.1 Lymphozytenisolation

Um die DNA aus dem Vollblut zu gewinnen, wurden zuerst die zellkernhaltigen Zellen isoliert. Etwa 6 ml Vollblut, das sich in Heparinröhrchen befand, wurde in Leucosep Röhrchen überführt.

Anschließend wurden die Röhrchen bei 1000 rcf/g, 15 Minuten bei 16°C, ohne „brake“ (Bremskraft) zentrifugiert. Das bedeutet, die Zentrifugation wurde nach dieser Zeit nicht abrupt abgebrochen, um die Trennleistung nicht zu gefährden.

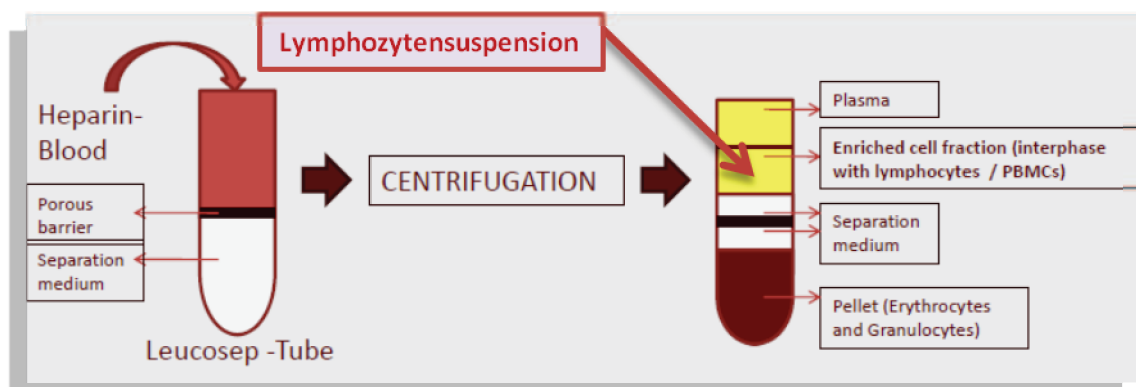


Abbildung 3.1: Trennung der Blutbestandteile in einem Leucosep-Röhrchen nach Zentrifugation (MÜLLNER, 2011).

Die Lymphozyten-Suspension (Abbildung 3.1) wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Darin wurden die Lymphozyten mit 15 ml PBS gewaschen.

Anschließend wurden die Röhrchen bei 304 rcf/g= 1300 rpm für 15 Minuten bei 4°C mit „brake“ zentrifugiert. Die Lymphozyten befanden sich nun als Pellet am Boden des Röhrchens.

Der Überstand wurde bis ca. einem halben Zentimeter über dem Pellet abgesaugt und die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert, um das Zellpellet zu lösen. Um die Zellen zu waschen, wurde erneut 10 ml PBS zugegeben und zentrifugiert.

Nach erneutem Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet mit 1 ml PBS resuspendiert. Um anschließend die Zellzahl zu bestimmen, wurden 20 µl der gewonnenen Lymphozytenlösung 1:4 mit PBS verdünnt.

3.5.2 Zellzahlbestimmung

Anschließend erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels Countess (Abbildung 3.2).



Abbildung 3.2: Countess.

Dafür wurde 10 µl des Farbstoffes Tryphanblau mit der gleichen Menge an Zellsuspension gemischt. Aus dieser Suspension wurden wiederum 10 µl auf Countess-slides pipettiert, welche durch Kapillarkraft in deren Zwischenraum gesaugt wurden. Der blaue Diazofarbstoff bindet an Proteine und kann in geschädigte Zellen eindringen. Während lebendige Zellen nur einen blauen Ring erhalten, werden inaktive Zellen

vollständig eingefärbt. Die Countess ermittelt den Quotient aus lebenden und toten Zellen (=Viability in %) und die Anzahl lebender Zellen pro Volumeneinheit.

Für den Comet assay werden 1×10^6 Zellen/ml benötigt. Um diese Konzentration zu erreichen, wird die Zellsuspension nach Bedarf mit PBS verdünnt. Der Verdünnungsfaktor 4 muss dabei berücksichtigt werden. Nun können die Zellen direkt für die Durchführung des Comet assay verwendet werden.

Für die Kontrollproben wurde die Zellsuspension eingefroren. Zuvor wurde nochmals zentrifugiert, um das PBS zu entfernen.

Das Einfriermedium für die Kontrollproben besteht aus 60% FBS (Kälberserum), 30% RPMI-Medium und 10% DMSO Lösungsmittel. Pro Röhrchen wurden etwa 2ml Einfrierlösung benötigt.

Die Cups wurden über Nacht bei -20°C eingefroren und am nächsten Tag bis zur Weiterverwendung bei -80°C gelagert.

Bei Bedarf können die Kontrollproben nun rasch aufgetaut und weiter verarbeitet werden. Es empfiehlt sich, erneut eine Zellzahlbestimmung durchzuführen und diese gegebenenfalls mit PBS zu korrigieren.

3.6 DURCHFÜHRUNG

Die Durchführung des Comet assays erfolgt nach dem Protokoll von Azqueta et al. (AZQUETA et al., 2009).

3.6.1 Aufbringen auf Objektträger

Die mit NMA beschichteten Objektträger wurden je nach Behandlung der Zellen (Lyse, Wasserstoffperoxid, Puffer, FPG) beschriftet und auf gekühlte Tablettts angeordnet.

Die LMA, die bei der Herstellung erhitzt wurde, musste auf maximal 40°C abkühlen, um die Zellen nicht zu schädigen. Anschließend wurde sie in ein 36°C warmes Wasserbad

gestellt. Die Konzentration der Agaroselösung sollte bei jeder Durchführung möglichst konstant sein, um eine erfolgreiche Analyse zu gewährleisten.

30 μl der Zellsuspension wurden in 140 μl LMA aufgenommen. Daraus wurde im Doppelansatz 70 μl auf die Objektträger aufgetragen (Abbildung 3.3) und mit cover slips der Größe 20 x 20 bedeckt.

Anschließend wurden die Tablettis mit den aufliegenden Objektträgern bei 6°C gekühlt. Nach 10 min. wurden die Deckgläser entfernt und die Objektträger wurden in mit Lyse gefüllte Behälter gestellt. Die Gele, die eine Wasserstoffperoxid Behandlung erhalten, wurden zuvor fünf Minuten mit einer 0,1 molaren H_2O_2 Lösung inkubiert und anschließend 5 min. in bidestilliertem Wasser gewaschen.



Abbildung 3.3: Objektträger mit pipettierter Zellsuspension in Agarose.

3.6.2 Enzymbehandlung

Nachdem die zu behandelten Gele mindestens eine Stunde in der Lyselösung inkubiert wurden, wurden sie drei Mal mit Enzympuffer gewaschen.

Dafür wurde die Lyselösung aus den Trögen entfernt und durch Enzympuffer (pH 8, 6°C) ersetzt. Dieser musste jeweils 5 Minuten inkubieren.

50 μl des Enzympuffers bzw. 50 μl der Enzymlösung wurden auf die Gele pipettiert und mit Cover slips der Größe 22 x 22 mm bedeckt. Anschließend wurden die Slides 30 min. bei 37°C in einer Moist box inkubiert.

Da während der Inkubation (30 min., 37°C) evtl. neue Schäden verursacht werden, wurden die Gele zusätzlich mit der reinen Pufferlösung behandelt. Bei der Auswertung wurde der durch die Inkubation hervorgerufene Schaden vom FPG Wert abgezogen. Dadurch werden nur die Enzym-sensitiven Netto-Schäden erfasst.

3.6.3 Alkalibehandlung und Elektrophorese

Die Slides (Lyse, H₂O₂, Puffer, FPG) wurden mit kaltem Elektrophoresepuffer (pH 12, 6°C,) horizontal in die, zuvor mit einer Wasserwaage tarierte, Elektrophorese gelegt. Freier Platz musste mit leeren, beschichteten Objektträgern gefüllt werden (Abbildung 3.4).

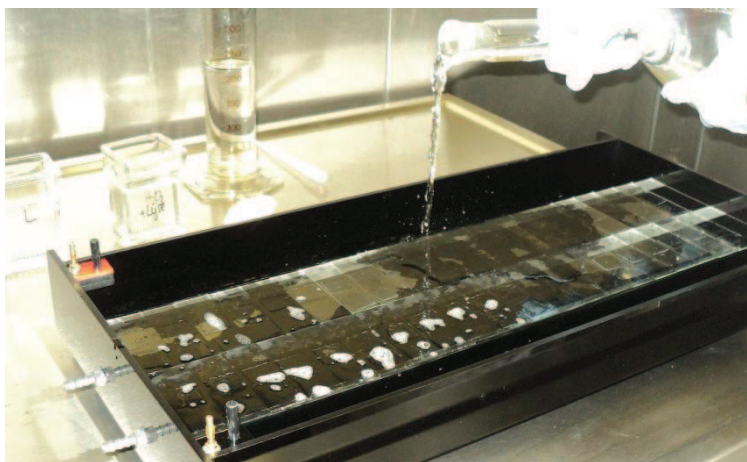


Abbildung 3.4: Befüllte Elektrophorese.

Während der Inkubation wurden mögliche Luftblasen, die sich unter den Objektträgern gebildet haben, entfernt. Außerdem musste der Wasserspiegel überprüft werden, da alle Objektträger vollständig mit Puffer bedeckt sein sollten.

Nach der Alkalibehandlung (20 min.) wurde die Elektrophorese 30 min. an einen Power Supply (25 V) angeschlossen.

Die Stromstärke sollte sich zwischen 290 und 330 mA bewegen und musste überprüft werden. Bei einer zu hohen Amperezahl wird etwas Puffer entfernt. Im umgekehrten Fall wird weiterer Puffer zugegeben.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Objektträger für 5 min. in Neutralisationspuffer und bidestilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Gele für mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Bis zur Weiterverwendung wurden sie bei 6°C gelagert.

3.6.4 Auswertung

Um die DNA unter dem Fluoreszenz-Mikroskop zu visualisieren, wurde sie mit Ethidiumbromid eingefärbt.

30 µl der hergestellten Ethidiumbromid Lösung wurden auf die Mitte des Gels pipettiert und mit einem cover slip der Größe 22 x 22 bedeckt.

Die Auswertung der DNA-Migration erfolgte durch ein computergestütztes Programm (Abbildung 3.5). Pro Gel wurden 50 Zellen gezählt.

Dafür wurde am linken oberen Rand begonnen in Schlangenlinien jede 5. Zelle zu zählen. Nach fünf gezählten Zellen bzw. Kometen beginnt man mit der nächsten von insgesamt 10 Reihen.

Bei jedem gewählten Lymphozyten musste das Mikroskop scharf gestellt werden. Da in den Ecken und Rändern des Gels der Schaden höher ist, wurden diese beim Auszählen weggelassen.

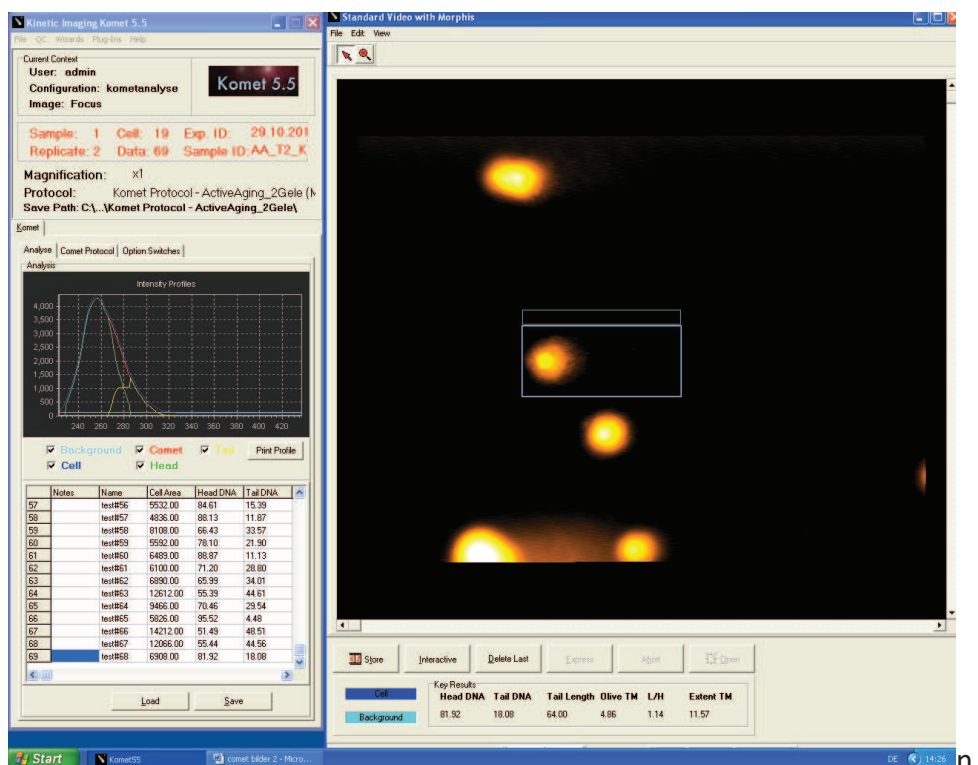


Abbildung 3.5: Kometprogramm 5.5.

Das Ausmaß der DNA-Schäden wurde durch den Parameter Tail ratio bestimmt. Dieser Wert gibt an, wie viel Prozent der DNA, sich im Kometenschweif befindet (% tail-DNA).

3.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die Auswertung der Daten der Comet assay Analyse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS-Statistics 17.0 und Microsoft Office Excel 2007.

Vor Ausführung der Auswertungsverfahren wurden die Daten mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung geprüft. Mit Hilfe der Kontrollen, die bei jeder Elektrophorese mitgeführt wurden, konnten Ausreißer identifiziert und gegebenenfalls isoliert werden. Ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurden als statisch signifikant gewertet. Die graphische Darstellung wurde mit Excel erstellt und in Form von Säulen- und Kreisdiagrammen umgesetzt.

4 ERGEBNISSE & DISKUSSION

4.1 DATENAUSWERTUNG

4.1.1 Studienkollektiv

Von den anfänglich 120 Studienteilnehmern beendeten insgesamt 49 Probanden aus zeitlichen und/oder gesundheitlichen Gründen die Studie vorzeitig. Desweiteren lagen beim Haus 5 (Leopoldau) die T_3 Daten zum Zeitpunkt der Auswertung noch nicht vor, weshalb die Werte dieser Studienteilnehmer ($n=25$) nicht mit einbezogen wurden.

Außerdem kam es aufgrund einzelner fehlender Werte, die wahrscheinlich auf Pipettierfehler zurückzuführen sind, zu weiteren Verlusten, da nur jene Probanden in die Auswertung mit einbezogen wurden, bei denen die Werte aller drei Zeitpunkte (T_1 , T_2 , T_3) vollständig vorlagen.

Nach der Ausreißerbereinigung standen letztlich 51 Teilnehmer für die Auswertung zu Verfügung (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Anzahl der ausgewerteten Probanden pro Studiengruppe.

Studiengruppe	Anzahl ausgewerteter Probanden
Training	18
Nutrition	15
Control	18

4.1.2 Korrekturfaktoren

Das für die Behandlung der Zellen verwendete Enzym FPG, das eine erhöhte Sensibilität und Sensitivität der oxidativen Schäden ermöglichte, führte aufgrund des

langen Untersuchungszeitraums zu einigen Problemen hinsichtlich seiner inkonstanten Aktivität.

Während des Untersuchungszeitraums von Oktober 2011 bis September 2012 wurde ab dem 13. Juli ein neues FPG verwendet. Nachdem die Daten tabellarisch in SPSS eingetragen wurden, konnte ab diesem Zeitpunkt eine Veränderung der Werte, aufgrund einer verminderten Enzymaktivität festgestellt werden. Möglicherweise kam es zu einer Unterbrechung der Kühlkette während des Transports. Anhand der mitgeführten Kontrollen konnte ein Korrekturfaktor von 1,245 berechnet werden, mit dem die Daten wieder vergleichbar gemacht werden konnten.

Zusätzlich konnte zwischen den beiden Untersuchungszeiträumen (Oktober 2011-Februar 2012 und April 2012 - August 2012) ein signifikanter Abfall der Enzymaktivität des zuerst verwendeten FPG Enzyms festgestellt werden.

Das Enzym wurde bereits vor Untersuchungsbeginn (Oktober 2011) auf die entsprechende Menge (10 µl) aliquotiert, gebrauchsfertig in Cups abgefüllt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Obwohl das FPG Enzym relativ stabil sein sollte, wurde ein signifikanter Abfall der Aktivität festgestellt, welcher auch anhand der mitgeführten Kontrollen korrigiert werden konnte (Korrekturfaktor: 2,09).

4.1.3 Altersverteilung

Die 51 Studienteilnehmer waren durchschnittlich $82,3 \pm 6,5$ Jahre alt, wobei die jüngste Probandin 65, der älteste 98 Jahre alt war.

Das Durchschnittsalter des Kollektives entspricht in etwa der Lebenserwartung in Österreich, die bei Männern derzeit bei 78,1 Jahren und bei Frauen bei 83,5 Jahren liegt (STATISTIK AUSTRIA, 2012).

Wie aus Abbildung 4.1 ersichtlich, stellt die Gruppe der über 85-Jährigen mit knapp 50 % den Großteil der Probanden dar. Eine weitere Aufteilung der Altersklassen auf die Kontroll- und Interventionsgruppen ist der Abbildung 4.2 zu entnehmen.



Abbildung 4.1: Prozentuale Aufteilung der Studienteilnehmer nach Altersgruppen.

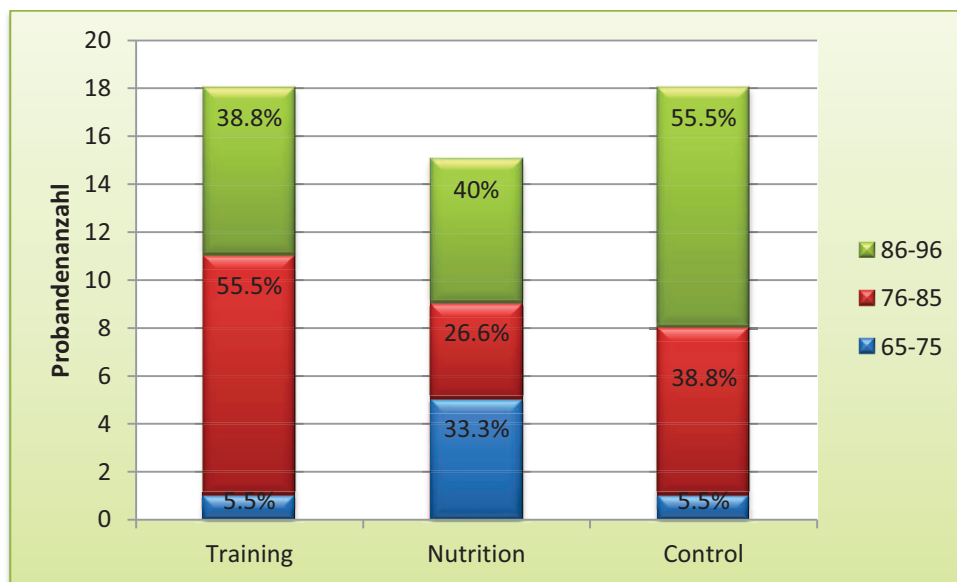


Abbildung 4.2: Prozentuale Verteilung der Alterskategorien in den Studiengruppen

In der Trainingsgruppe war mit 55,5 % der Anteil der mittleren Alterskategorie am höchsten. In der Ernährungsgruppe stellte diese Alterskategorie mit 26,6% den

niedrigsten Anteil der Studienteilnehmer dar. Das Durchschnittsalter war in der Kontrollgruppe mit über 85 Jahren am höchsten (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Durchschnittliches Alter der Studiengruppen

Studiengruppe	Alter $\bar{x}$
Training	83,7 $\pm$ 4,7
Nutrition	80,5 $\pm$ 7,9
Control	85,5 $\pm$ 5,5
Gesamt	82,2 $\pm$ 6,3

4.1.4 Geschlechterverteilung

Aufgrund der unterschiedlichen Lebenserwartung von Frauen (83,5 Jahre) und Männern (78,1 Jahre) und einem Durchschnittsalter der Probanden von 82,2 Jahren (Tabelle 4.2) war der Großteil der Studienteilnehmer (84 %) weiblich (Abbildung 4.3). Auch in den fünf Pensionistenhäusern, aus denen die Probanden rekrutiert wurden, stellten Frauen die Mehrheit der Bewohner dar.

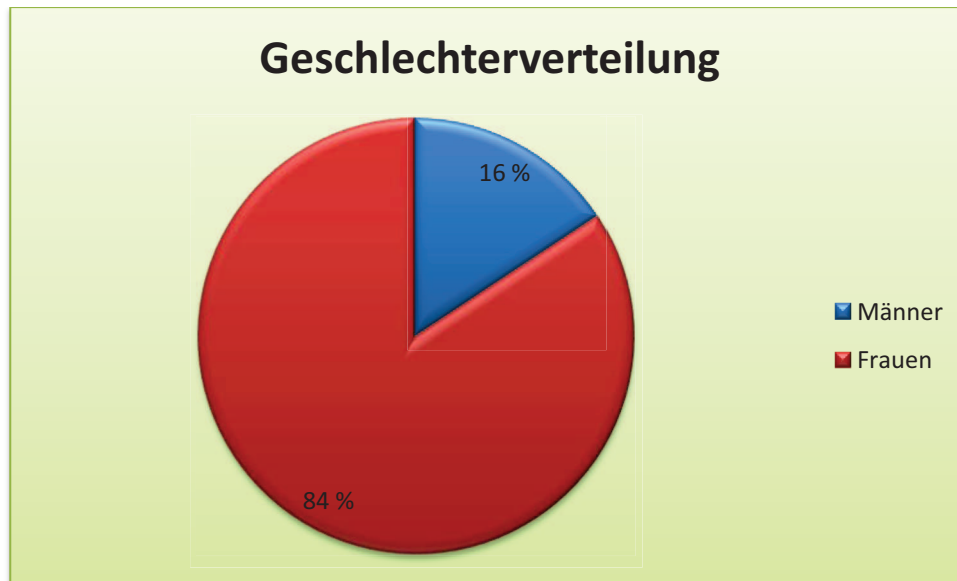


Abbildung 4.3: Geschlechterverteilung der Probanden.

4.1.5 Body Mass Index

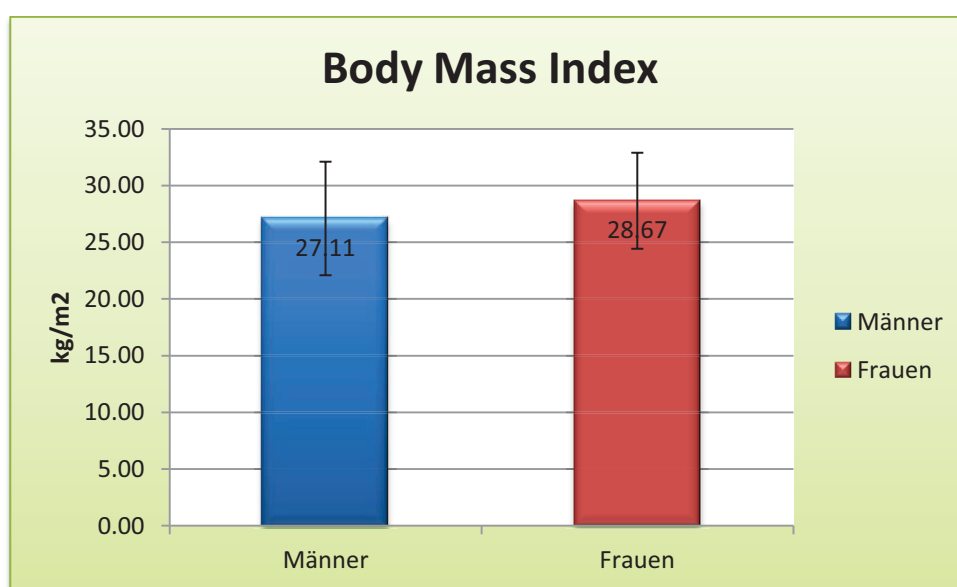
Der Body Mass Index [BMI= Körpergewicht/Körpergröße² (kg/m²)] ist die häufigste Messmethode, um Personen in unter-, normal- oder übergewichtig (bzw. adipös) einzuteilen.

Im Gegensatz zu Erwachsenen herrscht über die Stärke des BMI als Indikator für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko bei Senioren noch Uneinigkeit. Da höhere BMI-Werte im Gegensatz zu jüngeren Personen eher mit einem geringeren Mortalitätsrisiko verbunden sind, kommen bei Senioren hier etwas höhere Grenzwerte zur Anwendung. Für die Auswertung wurde die BMI Klassifizierung für Personen ab 65 Jahren laut Tabelle 4.3 herangezogen (ELMADFA et al., 2008).

Der durchschnittliche BMI der Probanden lag zu Beginn der Studie bei $28,58 \pm 4,3$ kg/m², wobei Frauen einen durchschnittlich höheren BMI aufwiesen, der aber nicht signifikant war (Abbildung 4.4). Nach der Klassifizierung des BMI ab 65 Jahren (Tabelle 4.3) lag der Wert damit im oberen Drittel der Kategorie Normalgewicht.

Tabelle 4.3: BMI Klassifizierung ab 65 Jahren.

< 24	Untergewicht
24 -29	Normalgewicht
>29	Übergewicht

**Abbildung 4.4:** Durchschnittlicher BMI der Geschlechter.

Der BMI war in den verschiedenen Studiengruppen und Altersklassen gleichmäßig verteilt. Zum Zeitpunkt T₃ verringerte sich der BMI des Studienkollektivs nur marginal (0,1 %) auf $28,55 \pm 4,3 \text{ kg/m}^2$.

4.2 ERGEBNISSE COMET ASSAY

Nach Bereinigung und Korrektur der Daten wurden die Mittelwerte der Hauptzielgröße (% tail DNA) der einzelnen Gruppen und Behandlungen berechnet.

Um signifikante Unterschiede zwischen den Interventionsgruppen zu den Testzeitpunkten aufzuzeigen, wurden anschließend mit Hilfe des T-Tests für gepaarte Stichproben die berechneten Mittelwerte miteinander verglichen.

4.2.1 Lyse Behandlung

Unter Standardbedingungen kam es sowohl bei der Ernährungs- (21,9 %) als auch bei der Trainingsgruppe (27,5 %) zu einem geringfügigen Anstieg der DNA-Migration, der jedoch nicht signifikant war (Abbildung 4.5).

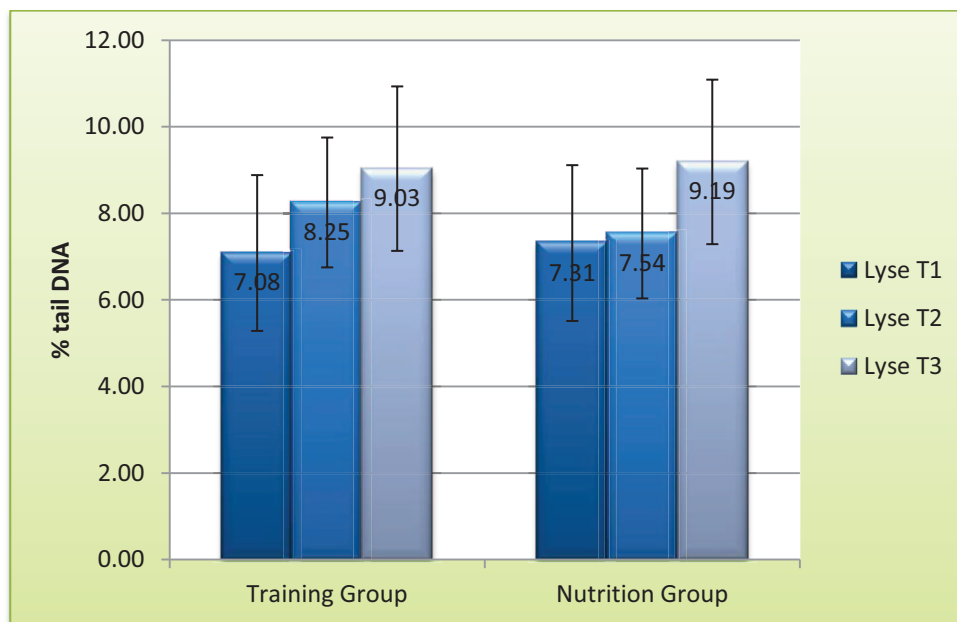


Abbildung 4.5: Lyse Behandlung der Interventionsgruppen.

In dem bereits erwähnten Review, in dem Humanstudien mit Ernährungsintervention mittels Comet assay ausgewertet wurden, konnte gezeigt werden, dass Studien, bei denen die Zellen einer Lysebehandlung unterzogen wurden, nur zu einem Drittel einen Abfall an DNA-Migration aufzeigten. Bei ROS induzierten DNA-Schäden und FPG-behandelten Zellen konnte bei etwa der Hälfte der ausgewerteten Studien ein Abfall registriert werden (Abbildung 2.6) (Hoelzl et al., 2009).

Da unter Standardbedingungen nur Doppel- und Einzelstrangbrüche detektiert werden, hat die alleinige Behandlung der Zellen mit Lyse eine geringere Sensitivität und Spezifität hinsichtlich oxidativer DNA Schäden. Sie ist damit weniger aussagekräftig als die zusätzliche Behandlung mit FPG.

4.2.2 Wasserstoffperoxid Behandlung

Bei der Behandlung der Zellen mit H_2O_2 konnte sowohl bei den Interventionsgruppen (Abbildung 4.6, Abbildung 4.7) als auch bei der Kontrollgruppe (Abbildung 4.8) eine signifikante Verbesserung der oxidativen Schädigung nach sechs Monaten festgestellt werden.

Zwischen den Zeitpunkten T_2 (nach 3 Monaten) und T_3 (nach 6 Monaten) gab es keine statistisch signifikante Veränderung. Folgendermaßen hatte die Resistenz der Zellen gegenüber ROS schon nach drei Monaten ihr Maximum erreicht.

Obwohl es hinsichtlich des Verlaufs der Werte zwischen den drei Studiengruppen (Training, Ernährung und Kontrolle) keinen Unterschied gab, fiel das Signifikanzniveau der Interventionsgruppen mit $p < 0,01$ etwas besser aus als bei der Kontrollgruppe (Tabelle 4.4). Auch bei der relativen Differenz schnitt die Interventionsgruppen sieben Prozentpunkte besser ab als die Kontrollgruppe (Tabelle 4.4).

Tabelle 4.4: Signifikanzniveau p und relative Senkung der Werte der H₂O₂ Behandlung von T₁ auf T₃.

Gruppe	Signifikanzniveau p	Relative Senkung
Training	0.002	26,65 %
Nutrition	0.009	25,39 %
Control	0.016	19,05 %

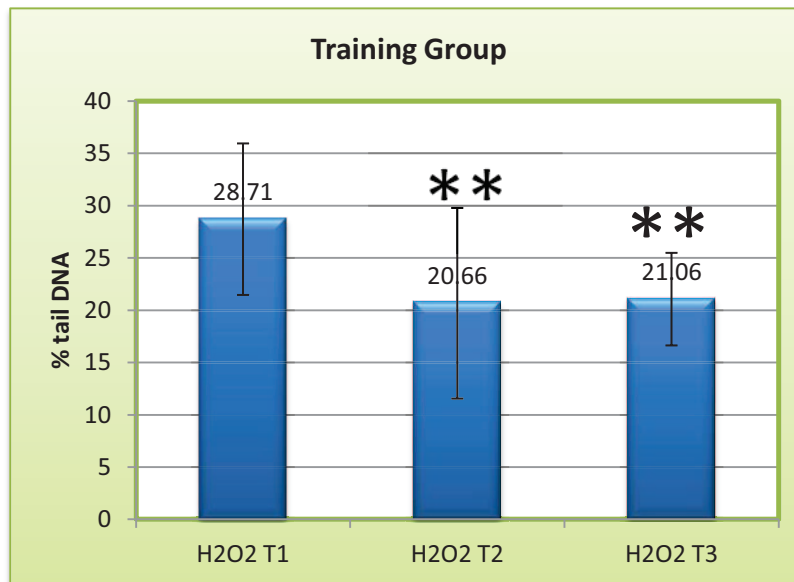


Abbildung 4.6: Auswirkung der H₂O₂ Behandlung auf % tail DNA der Trainingsgruppe.

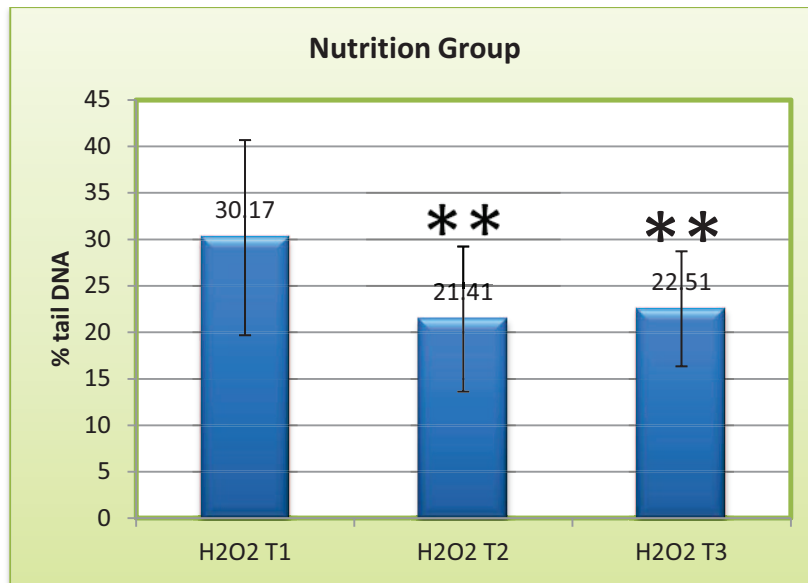


Abbildung 4.7: Auswirkung der H₂O₂ Behandlung auf % tail DNA der Ernährungsgruppe.

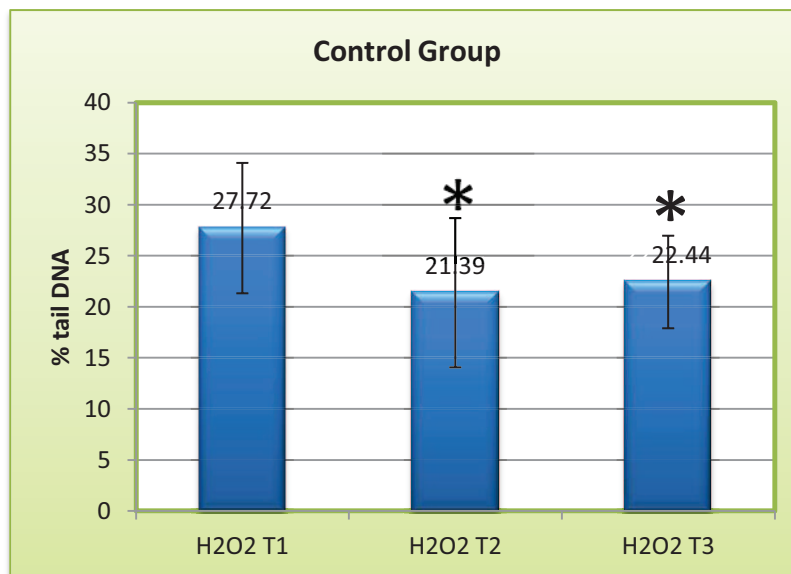


Abbildung 4.8: Auswirkung der H₂O₂ Behandlung auf % tail DNA der Kontrollgruppe.

Eine Studie von Parco et al. (2011) untersuchte die Auswirkung eines 8- oder 20-wöchigen moderaten Trainings auf oxidative DNA Schäden und die antioxidative Enzymaktivität. 40 Ratten wurden randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt (Kontroll-

und Trainingsgruppe n=20). Die Ratten der Trainingsgruppe hatten 24 Stunden freien Zugang zu einem Laufrad, das mit einem digitalen Messgerät ausgestattet war, um die tägliche Distanz, die zurückgelegt wurde, zu erfassen. Die Kontrollratten wurden in Käfigen ohne Laufrad gehalten. Nach 8 bzw. 20 Wochen wurde den Ratten Blut abgenommen. Die Aktivität der SOD war im Vergleich zur Kontrollgruppe um 39 % erhöht. Die Glutathionaktivität war sogar um 290 % höher. Oxidativ induzierte DNA Schäden (gemessen mit Comet assay), die durch Inkubation der Zellen mit 45 μM H_2O_2 hervorgerufen wurden, waren um 21 bzw. 45 % (8 bzw. 20 Wochen) reduziert (Abbildung 4.9).

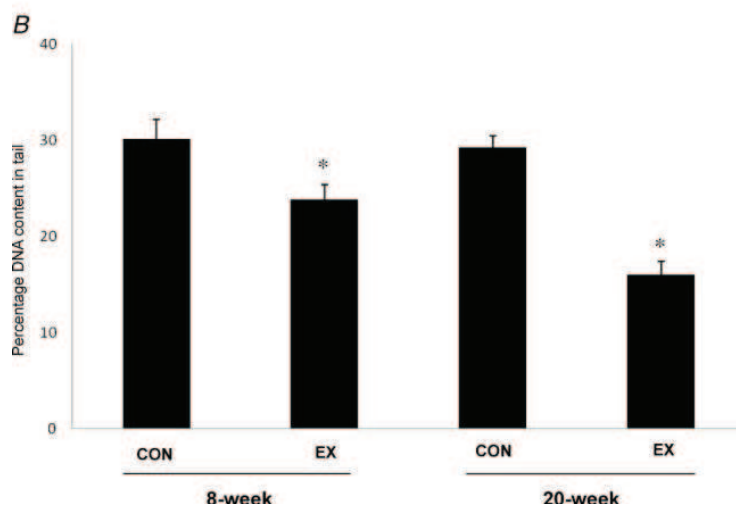


Abbildung 4.9: Unterschiedliche DNA Migration bei Zugabe von μM H_2O_2 in der Kontroll- (CON) und Trainingsgruppe (EX) (Parco et al., 2011).

Diese Ergebnisse zeigen, dass regelmäßiges, moderates Training die Resistenz der Lymphozyten gegenüber ROS erhöht. Die Autoren vermuten, dass die schützende Wirkung auf die trainingsinduzierte erhöhte Expression an Antioxidantien zurückzuführen ist. Die Ergebnisse stimmen mit den Resultaten der Interventionsgruppen überein. Sowohl die Trainings- als auch die Ernährungsgruppe konnte einen

hoch signifikanten Abfall ROS-induzierter Schädigung verzeichnen. Die Ernährungssupplementation hatte dabei aber keinen zusätzlich positiven Effekt auf den Verlauf.

Ein Grund für die fehlende Verbesserung in der Ernährungsgruppe könnte die relativ niedrige Konzentration der aufgenommenen Antioxidantien durch das Supplement sein. Das lag vor allem daran, dass die Trinklösung FortiFit für die Sarkopenieprophylaxe und nicht zur Verbesserung des antioxidativen Schutzsystems konzipiert wurde, und daher keine hohe Konzentration an AO aufwies.

Eine parallel durchgeführte Arbeit untersuchte den Status der Vitamine B₁, B₂, B₆ und C mittels einer reversed phase HPLC. Die Ergebnisse der Analysen zeigten schon vor Studienbeginn eine überdurchschnittliche Versorgung der genannten Vitamine.

Die Vitamin B Versorgung, die anhand der Konzentration im Vollblut gemessen wurde, war bei allen Studienteilnehmern über dem Referenzbereich. Da Vitamine der B-Gruppe Risikonährstoffe im Alter darstellen, werden sie häufig prophylaktisch supplementiert.

Mit Ausnahme der Ascorbinsäure konnte während des Studienverlaufs keine signifikante Verbesserung des Vitaminstatus bei den Interventionsgruppen beobachtet werden.

Besonders auffällig waren die, im Vergleich zu den Probanden der Interventionsgruppen, höheren Anfangs- und Endwerte (T₂) der Kontrollgruppe (MÜLLER, 2012).

Das könnte ein Grund für die beachtliche Verbesserung der Werte der Kontrollgruppe sein. Möglicherweise könnte die Studienteilnahme auch zu einem höheren Gesundheitsbewusstsein hinsichtlich des Bewegungs- und Ernährungsverhaltens geführt haben.

Um mögliche Korrelationen der Ergebnisse mit dem Alter zu untersuchen, wurden die Probanden in Altersgruppen (1. Gruppe < 85 Jahre; 2. Gruppe ≥ 85 Jahre) unterteilt. Da das durchschnittliche Alter der Studienteilnehmer bei 82,3 Jahren lag, waren die

Probanden bei dieser Zuordnung relativ gleichmäßig auf die zwei Gruppen aufgeteilt (Abbildung 4.10).

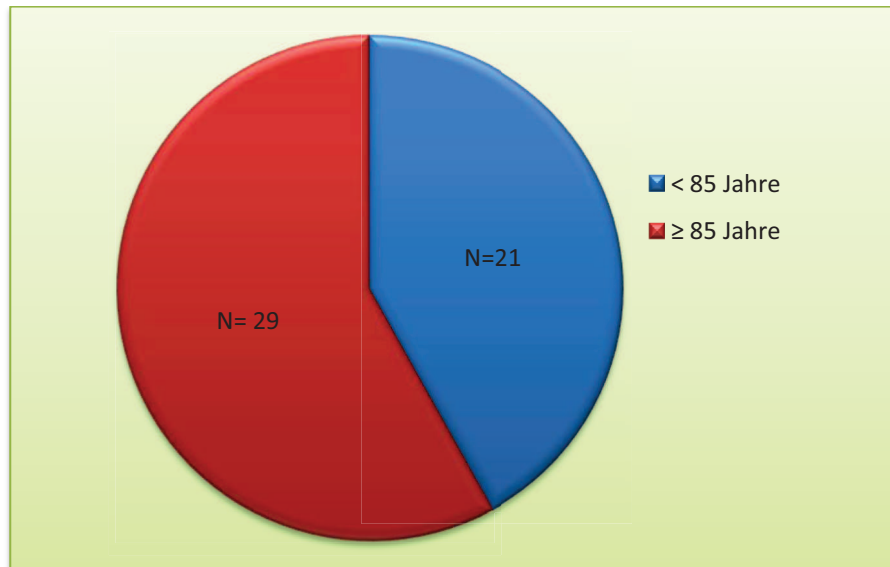


Abbildung 4.10: Mengenmäßige Verteilung der Altersgruppen.

Bei der Aufteilung der Probanden in die beschriebenen Altersgruppen ergaben sich, bei den mit Wasserstoffperoxid behandelten Zellen, unterschiedliche Werte.

Im Vergleich zu der jüngeren Alterskategorie (Abbildung 4.11) gab es in der Kategorie 85+ nach der sechs-Monatigen Intervention weiterhin einen signifikanten Abfall der durch H_2O_2 induzierten Schäden ($p=0,02$) sowohl bei der Trainings- als auch bei der Ernährungsgruppe (Abbildung 4.12).

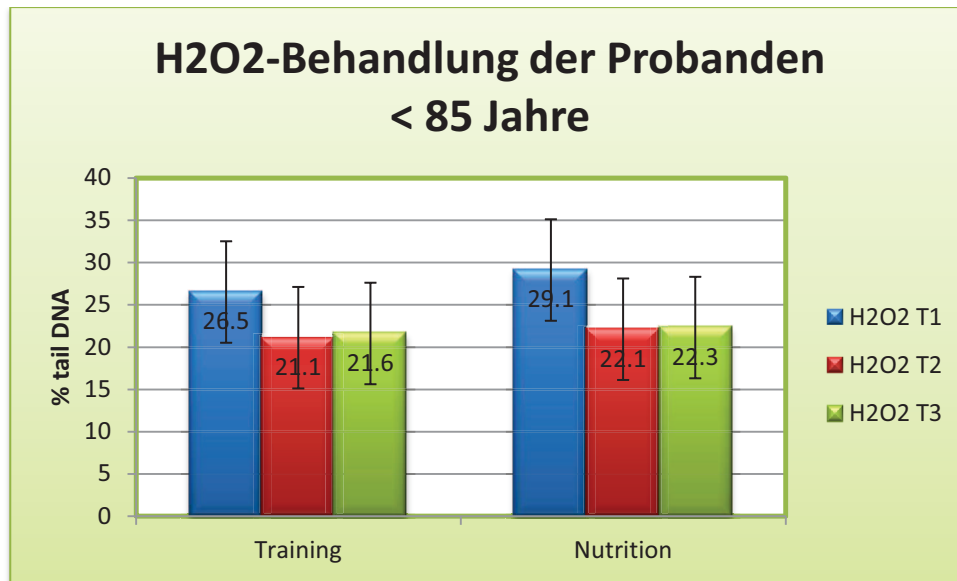


Abbildung 4.11: Auswirkung der H₂O₂ Behandlung der Studienteilnehmer < 85 Jahren.

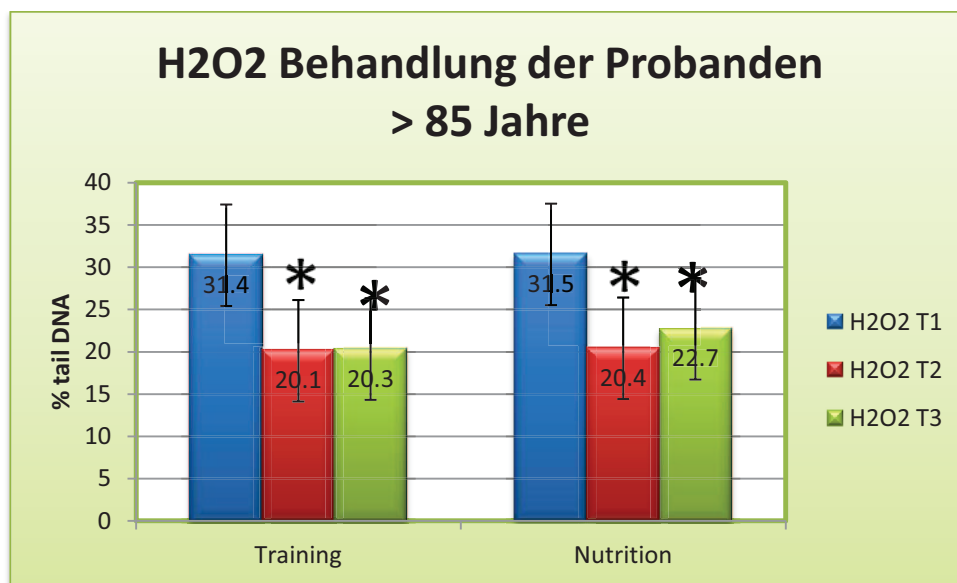


Abbildung 4.12: Auswirkung der H₂O₂ Behandlung der Studienteilnehmer > 85 Jahren.

Diese Ergebnisse stimmen mit einer parallel durchgeführten Arbeit überein, bei der mittels Fragebogen, der Einfluss der Ernährungs- und Bewegungsintervention auf die Lebensqualität der Studienteilnehmer untersucht wurde.

Hier wurden eindeutige Alterseffekte in Kombination mit Depression und dem Ernährungsscore ermittelt. In der Altersgruppe 75-85 Jahre war bei einem schlechteren Depressions- und Ernährungsstatus auch die Lebensqualität niedriger (KELLNER, 2012).

Das könnte eine Erklärung für die geringere Verbesserung der jüngeren Alterskategorie sein.

Wie aus *Abbildung 4.2* ersichtlich, war in der Kontrollgruppe der Großteil (55 %) der Teilnehmer der höchsten Altersgruppe zugehörig. Möglicherweise ist dies eine weitere Ursache für das gute Abschneiden der Kontrollgruppe.

4.2.3 Behandlung mit FPG

Wie beschrieben, gibt es auch oxidative DNA Schäden, die nicht unmittelbar zu einem Strangbruch führen. Diese Schäden konnten unter Standardbedingungen nicht detektiert werden. Durch die Behandlung der Zellen mit dem Restriktionsenzym FPG werden auch oxidierte Purine in einen Strangbruch umgewandelt. Aus diesem Grund spiegeln die Daten der mit FPG behandelten Zellen ein genaueres Ergebnis wider.

Wie aus den folgenden Abbildungen ersichtlich, sank die DNA Migration nach sechsmonatiger Intervention sowohl bei den Interventions- als auch bei der Kontrollgruppe. In den beiden Interventionsgruppen betrug der Abfall oxidativer DNA Schäden beachtliche 35 %, die jedoch in der Trainingsgruppe mit $p = 0,9$ nicht signifikant war. Da es in der Ernährungsgruppe zu einem leichten Anstieg der DNA-Migration nach drei Monaten kam, war die Senkung von T_2 auf T_3 mit $p = 0,033$ signifikant. Bei der Kontrollgruppe betrug der Abfall oxidativer Schäden lediglich 24 % (*Abbildung 4.15*).

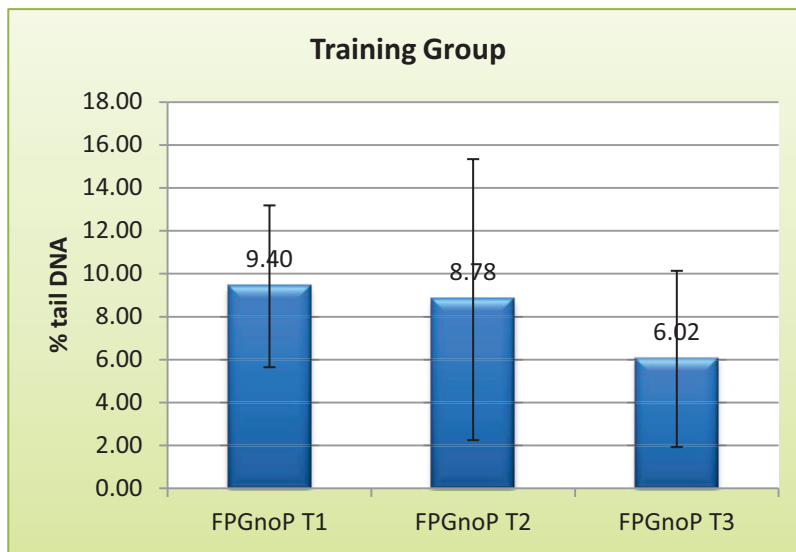


Abbildung 4.13: Auswirkung der Behandlung mit FPG auf die DNA Migration der Trainingsgruppe.

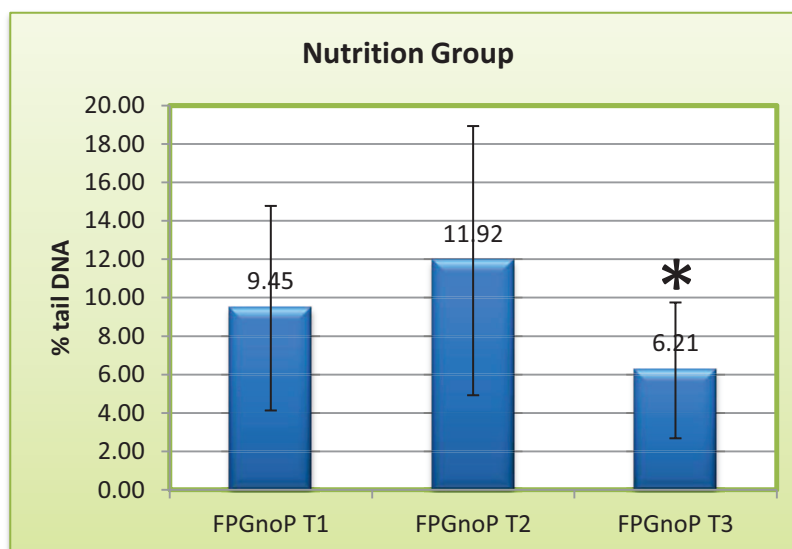


Abbildung 4.14: Auswirkung der Behandlung mit FPG auf die DNA Migration der Ernährungsgruppe.

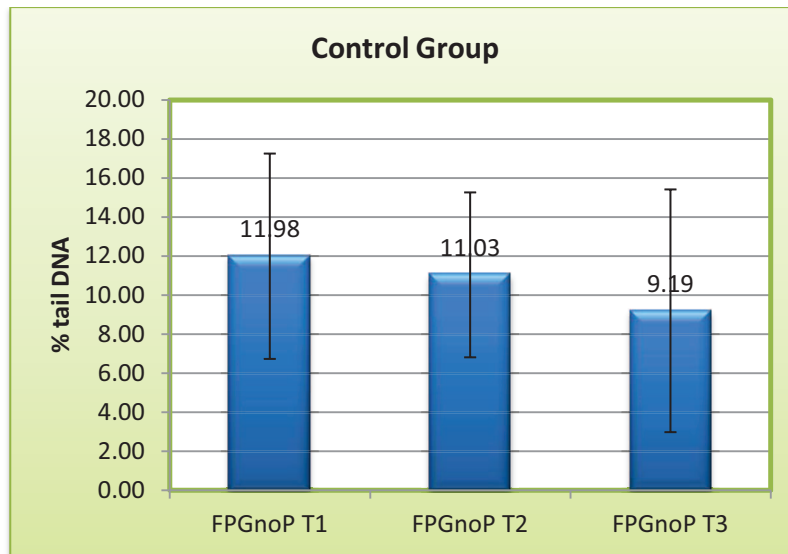


Abbildung 4.15: Auswirkung der Behandlung mit FPG auf die DNA Migration der Kontrollgruppe.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Humanstudie von Hölzl et al. (2008) in der die Probanden (n=8) während einer sechs-tägigen Intervention 300 g Kohlsprossen pro Tag konsumierten. Den Studienteilnehmern wurde vor und nach der Intervention Blut abgenommen, welches mittels Comet Assay auf oxidative DNA- Schäden untersucht wurde. Unter Standardbedingungen kam es zu keiner signifikanten Änderung oxidativer DNA-Schäden. Bei der Behandlung der Zellen mit FPG kam es zu einer Reduktion der DNA-Migration um 45 % (Abbildung 4.16). Die Autoren vermuten, dass der hohe Vitamin-C-Gehalt der Kohlsprossen für die antioxidative Wirkung verantwortlich ist.

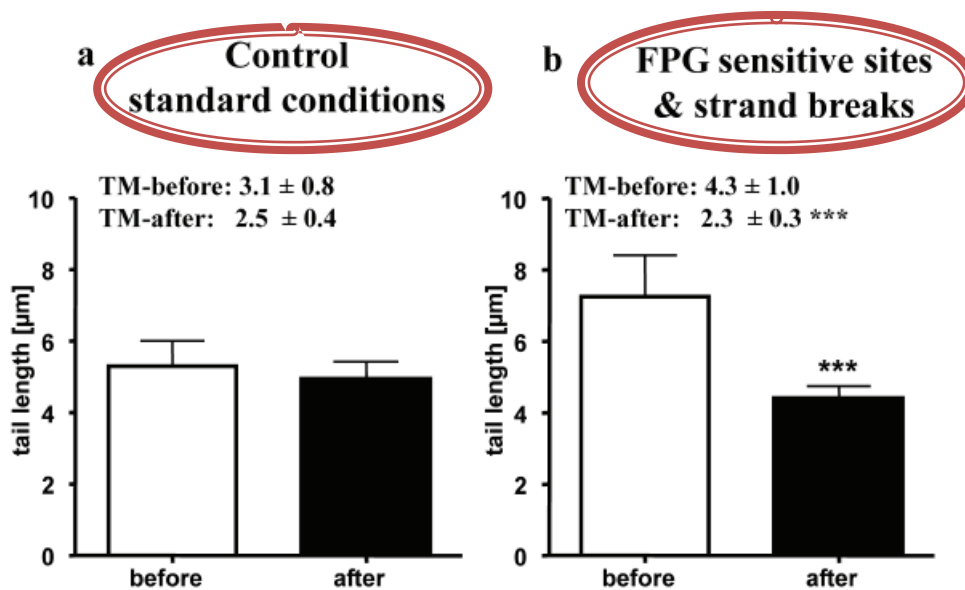


Abbildung 4.16: DNA Migration vor und nach der Kohlsprossen-Intervention (Hölzl et al. 2008).

Möglicherweise ist das eine Erklärung für die signifikante Verbesserung der DNA-Schäden der Ernährungsgruppe. Zudem hatte diese Gruppe zu Studienbeginn mit $13,21 \mu\text{l/l}$, die niedrigste Vitamin C-Plasma Konzentration, die jedoch gegenüber der anderen Studiengruppen nicht signifikant geringer war (Tabelle 4.5).

Tabelle 4.5: Ascorbinsäurekonzentration der Interventionsgruppen vor Studienbeginn (MÜLLER,2012).

Interventionsgruppe	Ascorbinsäurekonzentration in $\mu\text{l/l}$
Training	$15,14 \pm 3,8$
Nutrition	$13,21 \pm 4,4$
Control	$14,04 \pm 5,4$

Durch die zusätzliche Supplementierung von 60 mg Ascorbinsäure pro Tag während der gesamten Studiendauer könnte sich der antioxidative Status am stärksten verbessert haben. Da die Vitamin-C Konzentration der Probanden nach sechs-monatiger Intervention zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht vorliegt, können hier nur Vermutungen angestellt werden.

Dass die beachtliche Senkung der Interventionsgruppen von 35 % kaum Signifikanz aufwies, lag vermutlich auch an der hohen Standardabweichung der Behandlung der Zellen mit FPG im Vergleich zu den anderen Behandlungen (Lyse, Wasserstoffperoxid).

Die durchschnittliche Standardabweichung der FPG-Behandlung von 5,11 entspricht einem Variationskoeffizienten von außerordentlichen 56 %. Bei der Behandlung mit Wasserstoffperoxid hatte die Standardabweichung mit 6,11 einen ähnlichen Wert, der Variationskoeffizient betrug hier aber lediglich 26 %. Unter Standardbedingungen ergab sich mit 27 % ein ähnlicher Wert (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: Standardabweichung und Variationskoeffizient der Behandlungen.

Behandlung	Durchschnittliche Standardabweichung	Variationskoeffizient
Lyse		
Training	2,33	29,21
Nutrition	2,16	27,72
Control	2,01	26,07
Lyse Gesamt	2,17	27,77
Wasserstoffperoxid		
Training	6,93	30,11

Nutrition	5,31	24,24
Control	6,08	25,80
Wasserstoffperoxid gesamt	6,1	26,72
FPG		
Training	4,81	60,95
Nutrition	5,29	57,31
Control	5,23	49,96
FPG gesamt	5,11	56,07

4.2.4 Abschließende Betrachtung

Tabelle 4.7 fasst die Mittelwerte der Hauptzielgröße (% tail DNA) der verschiedenen Behandlungen im Studienverlauf zusammen.

Tabelle 4.7: Mittelwerte (% tail DNA) der verschiedenen Behandlungen zu den Zeitpunkten T_1 , T_2 , T_3 .

	T_1	T_2	T_3
Lyse			
Training	$7.08 \pm 2,8$	$8.25 \pm 2,3$	$9.03 \pm 1,6$
Ernährung	$7.31 \pm 2,4$	$7.53 \pm 2,3$	$9.18 \pm 1,6$
Kontrolle	$6.01 \pm 1,5$	$8.48 \pm 3,1$	$8.37 \pm 1,4$
H₂O₂			
Training	$28.71 \pm 7,2$	$20.66 \pm 9,1$	$21.06 \pm 4,4$
Ernährung	$30.16 \pm 10,5$	$21.41 \pm 7,8$	$22.51 \pm 6,2$
Kontrolle	$27.72 \pm 6,4$	$21.39 \pm 7,3$	$22.44 \pm 4,5$

FPGnoP			
Training	9.40 ± 3,8	8.78 ± 6,5	6.02 ± 4,1
Ernährung	9.45 ± 5,3	11.92 ± 7,0	6.21 ± 3,5
Kontrolle	11.98 ± 5,3	11.03 ± 4,2	9.19 ± 6,2

Durch die tabellarische Darstellung aller Ergebnisse wird nochmals verdeutlicht, dass hinsichtlich der Datenentwicklung, sowohl bei den Interventions- als auch bei der Kontrollgruppe ähnliche Tendenzen zu erkennen sind.

Ein weiterer Erklärungsansatz für das ähnliche Abschneiden der Kontrollgruppe, könnte die Tatsache sein, dass sie als Gedächtnisgruppe angelegt wurde.

Durch diese Maßnahme waren alle Probanden gleichermaßen in der Studie involviert, wodurch ein Sozialisationseffekt der Interventionsgruppen verhindert werden sollte. Die Teilnahme an der Studie führte damit bei allen Probanden zu organisierten, regelmäßigen, themazentrierten und sinnhaften Zusammentreffen. Somit wurde den Teilnehmern der Kontrollgruppe die gleiche Aufmerksamkeit und Wertschätzung entgegengebracht, wie den Probanden der Interventionsgruppen.

Bei den von uns betrachteten Parametern hatte eventuell die Studienteilnahme per se und der damit verbundene veränderte Alltag, einen größeren Effekt auf das psychische und das physische Wohlbefinden, als die Ernährungs- und Trainingsintervention.

Eine Studie von Sung et al. (2009) untersuchte anhand spezifischer Fragebögen die Auswirkung eines 16-wöchigen Gruppentrainings auf die mentale Gesundheit, depressive Symptome und das Selbstwertgefühl bei Frauen über 65 Jahre. Die Frauen (n=40) wurden dabei in zwei Altersklassen eingeteilt (n(<75)=16; n(>75)=21).

Allgemein konnte ein Anstieg des Selbstwertgefühls (ermittelt durch den Selbsteinschätzungs-Fragebogen nach Rosenberg) der Probanden festgestellt werden.

Im Vergleich zu den jüngeren Studienteilnehmern waren die Verbesserungen bei den >75-Jährigen jedoch deutlich drastischer.

Die Ergebnisse der Studie bestätigen die Vermutung, dass insbesondere Ältere durch regelmäßige Gruppenaktivitäten hinsichtlich ihres mentalen Befindens profitieren. Da die Verbesserung bei den älteren Studienteilnehmern deutlicher ausfiel, könnte der positive Verlauf der Kontrollgruppe während der Studie auch darauf beruhen, dass sie mit einem Durchschnittsalter von 85,5 Jahren die älteste Studiengruppe darstellte.

In einer weiteren Studie von Tomaka et al. wurde die Beziehung zwischen sozialer Isolation und dem Auftreten bestimmter Krankheiten (Diabetes, Krebs, Schlaganfall, kardiovaskuläre Krankheiten) untersucht, die mit oxidativen Stress in Verbindung stehen. Die Ergebnisse bestätigten Korrelation zwischen sozialen Variablen und klinischen Ergebnissen. Einsamkeit und fehlender sozialer Kontakt haben eine bedeutende Wirkung auf die Gesundheit der älteren Bevölkerung (TOMAKA et al., 2006).

Die Studienergebnisse bestätigen die Hypothese, dass soziale Aktivitäten nicht nur zu einer Verbesserung des Selbstwertgefühls, sondern auch zu einem verbesserten Gesundheitszustand führen.

5 SCHLUSSBETRACHTUNG

Durch die vorliegende Arbeit, sollte die Fragestellung geklärt werden, ob eine sechsmonatige Trainings- bzw. Ernährungsintervention einen Einfluss auf oxidative DNA Schäden und die Resistenz der Zellen gegenüber ROS hat.

Auffallend war, dass sich die Werte der Interventionsgruppen und der Kontrollgruppe nach sechs-monatiger Studiendauer in die gleiche Richtung entwickelt haben. So kam es bei der Messung des oxidativen Status unter Standardbedingungen zu keiner signifikanten Veränderung. Bei der Behandlung der Zellen mit Wasserstoffperoxid konnte bei allen Studiengruppen eine signifikante Verbesserung festgestellt werden. Durch die zusätzliche Behandlung der Lymphozyten mit dem Restriktionsenzym FPG konnte ein starker Abfall an oxidativen Schäden festgestellt werden, der jedoch kaum signifikant war.

Besonders auffällig war die signifikante Verbesserung der Resistenz der Zellen gegenüber Wasserstoffperoxid. Die Interventionsgruppen konnten bei dieser Behandlung einen größeren Abfall an DNA Migration verzeichnen als die Kontrollgruppe.

Durch den Vergleich mit aktueller Literatur, könnte die erhöhte Widerstandsfähigkeit der Lymphozyten auf eine trainingsinduzierte erhöhte Expression an endogenen Antioxidantien zurückzuführen sein.

Hier wird es besonders interessant, ob sich der Trend in den anschließenden Ergebnissen, die nach einem Jahr Intervention analysiert werden, fortsetzt.

Gründe für die weniger aussagekräftigen Resultate unter Standardbedingungen und der FPG-Behandlung könnten neben den hohen Variationskoeffizienten auch die starke Reduktion der Probanden von anfänglich 120 auf 51 Teilnehmer sein.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse der vorliegenden Studie darauf hinweisen, dass durch die verwendete Bewegungs- bzw. Ernährungsintervention bei Hochbetagten die Resistenz gegenüber ROS erhöht werden könnte.

Die vorliegenden Befunde reichen jedoch noch nicht aus, um spezielle Bewegungs- oder Ernährungsempfehlungen für Senioren auszusprechen.

Die Auswertung der Daten der weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Studie werden für die endgültige Beurteilung der Resultate noch eine wichtige Rolle spielen.

Es wurden bisher nur relativ wenige Studien durchgeführt, die eine Kombination aus Bewegungs- und Ernährungsintervention auf DNA-protective Eigenschaften im Menschen untersuchten.

Es bedarf in jedem Fall weiterer Langzeitstudien mit einer höheren Probandenzahl zu dieser Thematik. Um einen Sozialisationseffekt auszuschließen, sollte in zukünftigen Studien die Kontrollgruppe ihren kompletten Lebensstil beibehalten.

Um die Fragestellung zu klären, ob eine Ernährungsintervention Auswirkung auf DNA-protective Eigenschaften hat, wäre es ratsam ein Supplement mit einer höheren Konzentration an AO zu verwenden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Durch die vorliegende Studie sollte die Fragestellung geklärt werden, ob eine sechs-monatige Trainings- bzw. Ernährungsintervention einen Einfluss auf oxidative DNA-Schäden und die Resistenz der Zellen gegenüber ROS hat.

Als Endpunkte wurden die DNA-Migration als Folge von Einzel- und Doppelstrangbrüchen mittels Comet assay bestimmt.

Die insgesamt 51 Studienteilnehmer, welche durchschnittlich $82,2 \pm 6,3$ Jahre alt waren, wurden zufällig, aber stratifiziert einer Interventionsgruppe (Training, Training + Ernährung, Kontrolle) zugeteilt. Die Probanden der Trainingsgruppe absolvierten zwei Mal wöchentlich ein 50-minütiges Trainingsprogramm, welches nach dem Protokoll des American College of sports medicine durchgeführt wurde. Der Ernährungsinterventionsgruppe wurde zusätzlich zum Training ein Supplement in Form einer Trinklösung für besondere medizinische Zwecke verabreicht. Die Kontrollgruppe wurde als Gedächtnisgruppe angelegt. Sie behielt ihren momentanen Lebensstil bei, an Stelle der Trainings- und Ernährungsintervention wurden eigene Einheiten durchgeführt, bei denen kognitive Fähigkeiten trainiert wurden.

Den Probanden wurde zu Beginn der Studie, nach drei und sechs Monaten Blut abgenommen, aus welchem die DNA isoliert wurde. Mit Hilfe des Comet Assays konnte daraus der Grad oxidativer Schädigung ermittelt werden.

Unter Standardbedingungen kam es weder bei den Interventions- noch bei der Kontrollgruppe zu signifikanten Veränderungen der DNA-Migration. Im Gegensatz dazu, konnte bei allen Studiengruppen eine signifikante Verbesserung der Resistenz gegenüber ROS festgestellt werden, wobei das Signifikanzniveau der Interventionsgruppen mit $p < 0.01$ etwas besser ausfiel als das der Kontrollgruppe ($p = 0.016$). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass regelmäßiges, moderates Training die Widerstandsfähigkeit der Lymphozyten aufgrund einer trainingsinduzierten erhöhten Expression an endogenen Antioxidantien gegenüber ROS erhöht.

Bei der Behandlung der Lymphozyten mit dem läsionsspezifischen Enzym FPG, das oxidierte Purine in einen DNA Strangbruch umwandelt, konnte bei beiden Interventionsgruppen ein starker Abfall an oxidativen Schäden festgestellt werden, der jedoch nur bei der Ernährungsgruppe signifikant war.

Besonders auffällig war der ähnliche Verlauf der drei Studiengruppen (Training, Training + Ernährung, Kontrolle) während der sechs-monatigen Intervention. Da die Kontrollgruppe als Gedächtnisgruppe angelegt wurde, brachte man den Teilnehmern die gleiche Aufmerksamkeit und Wertschätzung entgegen, wie den Probanden der Interventionsgruppen. Eventuell hatte die Studienteilnahme per se und der damit verbundene veränderte Alltag, einen größeren Effekt auf das psychische und physische Wohlbefinden, als die Ernährungs- und Trainingsintervention. Der Vergleich mit aktueller Literatur bestätigte die Vermutung, dass regelmäßige Gruppenaktivitäten zu einer Verbesserung des mentalen aber auch körperlichen Wohlbefindens, insbesondere bei Älteren, führen können.

Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben der Ernährungs- und Bewegungsintervention auch noch andere Aspekte wie die Sozialisation einen gewichtigen Einfluss auf die Ergebnisse der Studie hatten.

7 SUMMARY

The aim of this thesis was to assess the influence of a six month lasting nutritional and training intervention on oxidative DNA damage and resistance of cell towards ROS. By using the comet assay, DNA migration as a consequence of single and double strand breaks was detected.

The 51 participants, who were on average $82, 2 \pm 6,3$ years old, were randomly but stratified divided into three groups (training, training + nutrition, control).

The test persons of the control group received a training program (50 min.) twice a week, which was implemented according to the protocol of the American college of sports medicine. Additionally to the exercise programme, the test persons of the nutrition group were given a supplement, which is used for specific medical purposes. The members of the control group retained their lifestyle and did cognitive training instead of the training and nutrition intervention.

Blood samples of the participants were taken and DNA isolated at the beginning of the study and after three and six months of intervention. With the comet assay the level of oxidative damage was detected.

Significant changes of DNA migration were neither noticeable for the control group nor for the intervention group at standard conditions. Opposed to this, a significant improvement of the resistance towards ROS was revealed for all three study groups. The level of significance of the intervention groups was even better ($p < 0,01$) than the one of the control group ($p=0,016$). Based on these results, it is evident that regular, moderate training enhances the resistance of the lymphocytes towards ROS and this may be due to an increased expression of endogenic antioxidants.

The treatment with the lesion-specific enzyme FPG induces a transformation of oxidised purins into a strand break. It caused a strong decrease in oxidized damages in both intervention groups, whereas only the nutrition group was significant.

Particularly interesting was the similar trend of the three different study groups during the intervention. Since the control group was cognitive trained, same attention and dedication as for the participants of the intervention groups was committed to its members. Potentially, the study attendance as such, and the changed daily routine had a greater effect on the mental and physical wellbeing, than the intervention itself.

Current literature confirms the assumption that regular group activities can lead to an improvement of the mental and physical wellbeing, especially in the elderly.

Therefore it cannot be ruled out that beside the intervention also other aspects such as socialising, may had a major impact on the results of the study.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ALBANES, D., HEINONEN, O. P., TAYLOR, P. R., VIRTAMO, J., EDWARDS, B. K., RAUTALAHTI, M., HARTMAN, A. M., PALMGREN, J., FREEDMAN, L. S., HAAPAKOSKI, J., BARRETT, M. J., PIETINEN, P., MALILA, N., TALA, E., LIIPPO, K., SALOMAA, E. R., TANGREA, J. A., TEPPÖ, L., ASKIN, F. B., TASKINEN, E., EROZAN, Y., GREENWALD, P. & HUTTUNEN, J. K. 1996. Alpha-Tocopherol and beta-carotene supplements and lung cancer incidence in the alpha-tocopherol, beta-carotene cancer prevention study: effects of base-line characteristics and study compliance. *J Natl Cancer Inst*, 88, 1560-70.
- ALLGAYER, H., OWEN, R. W., NAIR, J., SPIEGELHALDER, B., STREIT, J., REICHEL, C. & BARTSCH, H. 2008. Short-term moderate exercise programs reduce oxidative DNA damage as determined by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry in patients with colorectal carcinoma following primary treatment. *Scand J Gastroenterol*, 43, 971-8.
- ATMACA, G. 2004. Antioxidant effects of sulfur-containing amino acids. *Yonsei Med J*, 45, 776-88.
- AZQUETA, A., SHAPOSHNIKOV, S. & COLLINS, A. R. 2009. DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutat Res*, 674, 101-8.
- BARTOSZ, G. 2009. Reactive oxygen species: destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol*, 77, 1303-15.
- BERGENDI, L., BENES, L., DURACKOVA, Z., & FERENCIK, M. 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci*.
- BIRNINGER, M., PILAWA, S. & FLOHÉ, L. 2002. Trends in selenium biochemistry. *Nat Prod Rep*, 19, 693-718.
- BURLINSON, B., TICE, R. R., SPEIT, G., AGURELL, E., BRENDLER-SCHWAAB, S. Y., COLLINS, A. R., ESCOBAR, P., HONMA, M., KUMARAVEL, T. S., NAKAJIMA, M., SASAKI, Y. F., THYBAUD, V., UNO, Y., VASQUEZ, M., HARTMANN, A. & IN VIVO COMET ASSAY WORKGROUP, P. O. T. F. I. W. O. G. T. 2007. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res*, 627, 31-5.
- DALLE-DONNE, I., ROSSI, R., COLOMBO, R., GIUSTARINI, D., & MILZANI, A. 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin. Chem.*,
- DAVIES, K. J., QUINTANILHA, A. T., BROOKS, G. A. & PACKER, L. 1982. Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, 107, 1198-205.
- DUARTE, T. L. & LUNEC, J. 2005. Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radic Res*, 39, 671-86.
- ELMADFA, I. 2004. Wasserlösliche Vitamine. In: Ernährungslehre. Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co, Stuttgart; 127-143.
- ELMADFA, I., FREISLING, H., NOWAK, V., HOFSTÄDTER, D., HASENEGGER, V., FERGE, M., FRÖHLER, M., FRITZ, K., MEYER, AL., PUTZ, P., RUST, P., GROSSGUT, R., MISCHKE, D., KIEFER, I., SCHÄTZER, M., SPANBLÖCHEL,

- J., STURTZEL, B., WAGNER, KH., ZILBERSZAC, A., VOJIR, F., PLSEK, K. 2009. Österreichischer Ernährungsbericht 2008. 1. Auflage, Wien 2009; 46-47.
- EVANS, M. D., DIZDAROGLU, M. & COOKE, M. S. 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*, 567, 1-61.
- FANG, Y. Z., YANG, S. & WU, G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-9.
- FERRUCCI, L., CORSI, A., LAURETANI, F., BANDINELLI, S., BARTALI, B., TAUB, D.D., GURALNIK, J.M., & LONGO, D. L. 2005. The origins of age-related proinflammatory state. *Blood*.
- FINAUD, J., LAC, G. & FILAIRE, E. 2006. Oxidative stress : relationship with exercise and training. *Sports Med*, 36, 327-58.
- GOODYEAR-BRUCH C, P. J. 2002. Oxidative stress in critically ill patients. 6, 543-551.
- HALLIWELL, B., & GUTTERIDGE, J. M. C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3er ed. ed. Oxford University Press.
- HARMAN, D. 2003. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal*, 5, 557-61.
- HARTMANN, A., AGURELL, E., BEEVERS, C., BRENDLER-SCHWAAB, S., BURLINSON, B., CLAY, P., COLLINS, A., SMITH, A., SPEIT, G., THYBAUD, V., TICE, R. R. & WORKSHOP, T. I. C. A. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, 18, 45-51.
- HENSLEY, K., BENAKSAS, E. J., BOLLI, R., COMP, P., GRAMMAS, P., HAMDHEYDARI, L., MOU, S., PYE, Q. N., STODDARD, M. F., WALLIS, G., WILLIAMSON, K. S., WEST, M., WECHTER, W. J. & FLOYD, R. A. 2004. New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radic Biol Med*, 36, 1-15.
- HERBERT, K. E., FLETCHER, S., CHAUHAN, D., LADAPO, A., NIRWAN, J., MUNSON, S. & MISTRY, P. 2006. Dietary supplementation with different vitamin C doses: no effect on oxidative DNA damage in healthy people. *Eur J Nutr*, 45, 97-104.
- HOELZL, C., GLATT, H., MEINL, W., SONTAG, G., HAIDINGER, G., KUNDI, M., SIMIC, T., CHAKRABORTY, A., BICHLER, J., FERK, F., ANGELIS, K., NERSESYAN, A. & KNASMÜLLER, S. 2008. Consumption of Brussels sprouts protects peripheral human lymphocytes against 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and oxidative DNA-damage: results of a controlled human intervention trial. *Mol Nutr Food Res*, 52, 330-41.
- HOELZL, C., KNASMÜLLER, S., MISÍK, M., COLLINS, A., DUSINSKÁ, M. & NERSESYAN, A. 2009. Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: recent results and trends. *Mutat Res*, 681, 68-79.
- KAREN SUAREZ KRABBE, M. P., HELLE BRUUNSGAARD 2004. Inflammatory mediators in the elderly. *Experimental Gerontology*.
- KAROLKIEWICZ, J., MICHALAK, E., POSPIESZNA, B., DESKUR-SMIELECKA, E., NOWAK, A. & PILACZYŃSKA-SZCZEŚNIAK, Ł. 2009. Response of oxidative stress markers and antioxidant parameters to an 8-week aerobic physical activity program in healthy, postmenopausal women. *Arch Gerontol Geriatr*, 49, e67-71.
- KELLNER, M. 2012. Einfluss einer Bewegungs- und Ernährungsintervention auf die

- Lebensqualität von Wiener Pensionisten. Wien: Universität Wien, Institut für Ernährungswissenschaften.
- KIM SH, J. V., SHIN TY, SHARMA RP 2004. Selenium attenuates lipopolysaccharide-induced oxidative stress responses through modulation of p38 MAPK and NF-kappa B signaling pathways. *Exp Biol Med*(Maywood).
- LÖSER CH, L. H., MAHLKE R, LANKISCH PG. Der ungewollte Gewichtsverlust des alten Menschen. *Deutsches Ärzteblatt*.
- MASELLA, R., DI BENEDETTO, R., VARI, R., FILESÌ, C., & GIOVANNINI, C. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J. Nutr. Biochem.*
- MATEOS, R. & BRAVO, L. 2007a. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *J Sep Sci*, 30, 175-91.
- MATEOS, R. & BRAVO, L. 2007b. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *J Sep Sci*, 30, 175-91.
- MATÉS, J. M., PÉREZ-GÓMEZ, C. & NÚÑEZ DE CASTRO, I. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem*, 32, 595-603.
- MILES, E. A., REES, D., BANERJEE, T., CAZZOLA, R., LEWIS, S., WOOD, R., OATES, R., TALLANT, A., & CESTARO, B., YAQOOB, P., WAHLE, K.W., CALDER, P.C., 2008. Age-related increases in circulating inflammatory markers in men are independent of BMI, blood pressure and blood lipid concentrations. *Atherosclerosis*.
- MIRANDA-VILELA, A. L., ALVES, P. C., AKIMOTO, A. K., PEREIRA, L. C., NAZARÉ KLAUTAU-GUIMARÃES, M. & GRISOLIA, C. K. 2010. The effect of hydrogen peroxide-induced oxidative stress on leukocytes depends on age and physical training in healthy human subjects carrying the same genotypes of antioxidant enzymes' gene polymorphisms. *Am J Hum Biol*, 22, 807-12.
- MITHAL, A., BONJOUR, J. P., BOONEN, S., BURCKHARDT, P., DEGENS, H., EL HAJJ FULEIHAN, G., JOSSE, R., LIPS, P., MORALES TORRES, J., RIZZOLI, R., YOSHIMURA, N., WAHL, D. A., COOPER, C., DAWSON-HUGHES, B. & GROUP, F. T. I. C. N. W. 2012. Impact of nutrition on muscle mass, strength, and performance in older adults. *Osteoporos Int*.
- MORTENSEN, A., SKIBSTED, L. H. & TRUSCOTT, T. G. 2001. The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch Biochem Biophys*, 385, 13-9.
- MØLLER, P., VOGEL, U., PEDERSEN, A., DRAGSTED, L. O., SANDSTRÖM, B. & LOFT, S. 2003. No effect of 600 grams fruit and vegetables per day on oxidative DNA damage and repair in healthy nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 12, 1016-22.
- MÜLLER, B. 2012. Auswirkungen von Krafttraining und Nahrungsergänzung auf den Status von Vitamin B1, B2, B6 und Vitamin C älterer Wiener Heimbewohner. Wien: Universität Wien, Institut für Ernährungswissenschaft.
- MÜLLNER, E., BRATH, H., PLEIFER, S., SCHIERMAYR, C., BAIERL, A., WALLNER, M., FASTIAN, T., MILLNER, Y., PALLER, K., HENRIKSEN, T., POULSEN, H. E., FORSTER, E. & WAGNER, K. H. 2013. Vegetables and PUFA-rich plant oil reduce DNA

- strand breaks in individuals with type 2 diabetes. *Mol Nutr Food Res*, 57, 328-38.
- NELSON, J. L., BERNSTEIN, P. S., SCHMIDT, M. C., VON TRESS, M. S. & ASKEW, E. W. 2003. Dietary modification and moderate antioxidant supplementation differentially affect serum carotenoids, antioxidant levels and markers of oxidative stress in older humans. *J Nutr*, 133, 3117-23.
- OLIVE, P. L., WLODEK, D. & BANÁTH, J. P. 1991. DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res*, 51, 4671-6.
- OSTLING, O. & JOHANSON, K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123, 291-8.
- PARISE, G., PHILLIPS, S. M., KACZOR, J. J. & TARNOPOLSKY, M. A. 2005. Antioxidant enzyme activity is up-regulated after unilateral resistance exercise training in older adults. *Free Radic Biol Med*, 39, 289-95.
- POWERS, S. K., NELSON, W. B. & HUDSON, M. B. 2011. Exercise-induced oxidative stress in humans: cause and consequences. *Free Radic Biol Med*, 51, 942-50.
- PRASAD, A. S., BECK, F. W., BAO, B., FITZGERALD, J. T., SNELL, D. C., STEINBERG, J. D. & CARDOZO, L. J. 2007. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *Am J Clin Nutr*, 85, 837-44.
- RADAK, Z., CHUNG, H. Y. & GOTO, S. 2008. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med*, 44, 153-9.
- RAHMAN, K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clin Interv Aging*, 2, 219-36.
- RIBEIRO, M. L., ARÇARI, D. P., SQUASSONI, A. C. & PEDRAZZOLI, J. 2007. Effects of multivitamin supplementation on DNA damage in lymphocytes from elderly volunteers. *Mech Ageing Dev*, 128, 577-80.
- ROBERTS, C. K. & SINDHU, K. K. 2009a. Oxidative stress and metabolic syndrome. *Life Sci*, 84, 705-12.
- SINGH, N. P., MCCOY, M. T., TICE, R. R. & SCHNEIDER, E. L. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175, 184-91.
- SIU, P. M., PEI, X. M., TENG, B. T., BENZIE, I. F., YING, M. & WONG, S. H. 2011. Habitual exercise increases resistance of lymphocytes to oxidant-induced DNA damage by upregulating expression of antioxidant and DNA repairing enzymes. *Exp Physiol*, 96, 889-906.
- SOMMER, A. & VYAS, K. S. 2012. A global clinical view on vitamin A and carotenoids. *Am J Clin Nutr*, 96, 1204S-6S.
- SUNG, K. 2009. The effects of 16-week group exercise program on physical function and mental health of elderly Korean women in long-term assisted living facility. *J Cardiovasc Nurs*, 24, 344-51.
- TOMAKA, J., THOMPSON, S. & PALACIOS, R. 2006. The relation of social isolation, loneliness, and social support to disease outcomes among the elderly. *J Aging Health*, 18, 359-84.
- WATSON, T. A., MACDONALD-WICKS, L. K. & GARG, M. L. 2005. Oxidative stress and

antioxidants in athletes undertaking regular exercise training. *Int J Sport Nutr Exerc Metab*, 15, 131-46.

YEO, S. & DAVIDGE, S. T. 2001. Possible beneficial effect of exercise, by reducing oxidative stress, on the incidence of preeclampsia. *J Womens Health Gend Based Med*, 10, 983-9.

Quellen aus dem Internet

STATISTISCHES BUNDESAMT (2012): 12. koordinierte
Bevölkerungsvorausberechnung: Bevölkerung Deutschlands bis 2060
<http://www.destatis.de> zuletzt zugegriffen am 16.11.12

STATISTIK AUSTRIA (2012): Lebenserwartung für ausgewählte Altersjahre 1868/71
bis 2000/02 sowie 1951 bis 2011.
[http://www.statistik.at/web_de/statistiken/bevoelkerung/demographische_m
asszahlen/sterbetaefeln/index.html](http://www.statistik.at/web_de/statistiken/bevoelkerung/demographische_masszahlen/sterbetaefeln/index.html) zuletzt zugegriffen am 20.12.12

9 LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Bianca Arnold
Geburtsdatum / -ort	7. Februar 1986, Nürnberg
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

STUDIUM UND SCHULISCHE AUSBILDUNG

05/2010- 02/2013	Masterstudium Molekulare Ernährung an der Universität Wien
02/2012 - 02/2013	Masterarbeit: experimentelle Durchführung & Auswertung einer Interventionsstudie
09/2006 - 05/2010	Bachelorstudium Ernährungswissenschaften an der Universität Wien Abschluss: Bakkalaureus rer. nat. (Note: 1,7)
10/2005 - 08/2006	Studium der Werkstoffwissenschaften an der Friedrich-Alexander Universität Erlangen
09/1996 - 05/2005	Gymnasium Wilhelm-Löhe-Schule Nürnberg

BERUFSERFAHRUNG

Tutortätigkeit

03/2010 - 01/2012	Tutor der „ernährungsphysiologischen Übungen“ am Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien
-------------------	---

Praktika

07/2008 - 09/2008	Schwan Stabilo, Erlangen (Mikrobiologisches Labor)
05/2006 - 07/2006	MAN, Nürnberg (Chemisches Labor)
03/2003 - 05/2003	Sana Klinik, Nürnberg (Innere Medizin)

WEITERE KENNTNISSE & QUALIFIKATIONEN

Sprachen

Englisch: fließend in Wort und Schrift

Spanisch, Französisch: Grundkenntnisse

EDV-Kenntnisse

Microsoft Office, SPSS, Endnote

MITGLIEDSCHAFTEN

- VEÖ Verband der Ernährungswissenschaftler Österreichs
- VDO_E Verband der Oekotrophologen E.V.

Wien, den 05.02.2013



Bianca Arnold