



MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Active Ageing:

Einfluss einer 6-monatigen Trainings- und
Ernährungsintervention auf die Mikrokernhäufigkeit
bei institutionalisierten SeniorInnen“

verfasst von

Birgit Koller, BSc

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2013

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Ernährungswissenschaften

Betreut von:

Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

Danksagung

Ich möchte mich in erster Linie bei meinen Laborkolleginnen Karin Geider, Bianca Arnold und Claudia Traxler sowie bei unserem Betreuer Mag. Billy Franzke für die tolle praktische Zusammenarbeit während meiner Masterarbeit bedanken. Bei Univ. Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner bedanke ich mich für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die kompetente Unterstützung und Betreuung in dieser Zeit.

Weiters möchte ich mich bei allen Kollegen und Kolleginnen der Spange E des Instituts für Ernährungswissenschaften für die Unterstützung und Zusammenarbeit in der Laborzeit bedanken.

Vielen Dank auch meinen Eltern, meinem Bruder und den Rest der Familie sowie meinen engsten Freunden, die mir während meiner Studienzeit in guten wie auch in schlechteren Zeiten zur Seite gestanden sind. Ein besonderes „Danke“ gebührt dabei meiner Kollegin und Freundin Karin Geider für die unterstützende, lustige und unvergessliche Studienzeit vom allerersten Tag an.

Vielen Dank!

INHALTSVERZEICHNIS

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IX
III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XII
1. EINLEITUNG	1
2. LITERATURÜBERSICHT	3
2.1 Bedeutung von Proteinbedarf und Krafttraining im Alter	3
2.1.1 Proteinbedarf	3
2.1.2 Krafttraining	4
2.1.3 Sarkopenie	5
2.2 Der Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay (CBMN).....	7
2.2.1 Parameter des CBMN Assay.....	8
2.3 Mikrokernhäufigkeit in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht	12
2.4 Mikrokernhäufigkeit und Krebsrisiko	14
2.5 Einfluss von Lebensstilfaktoren auf das Mikrokernvorkommen	15
2.5.1 Körperliche Aktivität.....	15
2.5.2 Übergewicht und Diabetes	16
2.5.3 Alkohol- und Tabakkonsum	17
2.5.4 Kardiovaskuläre Erkrankungen	18
2.6 Einfluss von Mikronährstoffen auf Chromosomenschäden.....	18
2.6.1 Vitamin B12 und Folat	20
2.6.2 Antioxidantien	22
2.6.2.1 Effekte einzelner Antioxidantien	22
2.6.2.2 Effekte kombinierter Antioxidantien	24
3. MATERIAL UND METHODEN.....	27
3.1 Studiendesign	27

3.1.1 Rekrutierung der Probanden	27
3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien	28
3.2 Interventionsphase	29
3.2.1 Trainingsintervention	30
3.2.2 Ernährungsintervention	30
3.3 Der CBMN-Assay (in Zusammenarbeit mit Karin Geider).....	32
3.3.1 Verwendete Materialien:.....	32
3.3.2 Verwendete Chemikalien:	32
3.3.4 Probenaufbereitung:.....	33
3.3.4 Zählkriterien.....	37
3.3.4.1 Zweikernzellen (BNCs)	38
3.3.4.2 Mikrokerne (MNi)	38
3.3.4.3 Buds (NBUDs)	39
3.3.4.4 Brücken (NPBs).....	39
3.3.4.5 Nekrosen	39
3.3.4.6 Apoptosen	40
3.3.5 Vereinbarte Punkte der Auszählung	40
3.4 Datenauswertungen	42
4. ERGEBNISSE	43
4.1 Deskriptive Statistik	43
4.2 Mittelwertunterschiede und Korrelationen zum Zeitpunkt T1	43
4.2.1 Mittelwertunterschiede von Zweikernzellen mit MNi und MNi total in Abhängigkeit vom Geschlecht.....	43
4.2.2 Korrelation Alter und Mikrokernfrequenz	45
4.2.3 Korrelation Alter mit Apoptosen, Nekrosen, NPBs und NBUDs.....	46
4.3 Vergleich der Mittelwertunterschiede zu den Zeitpunkten T1, T2 und T3 in Abhängigkeit von den Studiengruppen	48

4.3.1 Gruppe Training und Ernährung	48
4.3.2 Gedächtnistrainingsgruppe	51
4.3.3 Übersicht Mittelwerte und Signifikanzen der Parameter in Abhängigkeit von den Studiengruppen zwischen T1 und T3	55
4.4 Vergleiche zwischen den Gruppen Training, Training & Ernährung und Gedächtnistrainingsgruppe	56
4.4.1 BNCs mit Mikrokernen und Gesamtmikrokernanzahl	56
4.4.2 Apoptosen	58
4.4.3 Nekrosen	59
4.4.4 NPBs	60
4.4.5 NBUDs	61
4.5 Vergleich der Mittelwertunterschiede zu den Zeitpunkten T1, T2 und T3 in Abhängigkeit von den Altersgruppen	62
4.5.1 Altersgruppe 65 bis 74 Jahre	62
4.5.2 Altersgruppe 75 bis 85 Jahre	62
4.5.3 Altersgruppe >85 Jahre	63
4.5.4 Übersicht Mittelwerte und Signifikanz der Parameter in Abhängigkeit von den Altersgruppen zwischen T1 und T3	65
5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	66
6. SCHLUSSBETRACHTUNG	71
7. ZUSAMMENFASSUNG	73
8. SUMMARY	74
9. LITERATURVERZEICHNIS	75

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1: Verschiedene mögliche Effekte von kultivierten zytokineseblockierten Zellen nach Exposition zytotoxischer/genotoxischer Agenzien [Fenech, 2007] ..8	
Abb. 2a: BNC mit vier MNi.....	Abb. 2b: BNC mit einem MN.....8
Abb. 3a+b: BNC mit NPBs	9
Abb. 4a: BNC mit abgeschnürtem NBUD	9
Abb. 5b: Apoptose mit einem auflösenden Zellkern.....	10
Abb. 5a: Apoptose mit zwei auflösenden Zellkernen	10
Abb. 6a+b: Nekrose mit auflösendem Zellkern und Cytoplasma	10
Abb. 7: Korrelation zwischen MNi-Frequenz und Alter nach Geschlecht. [Wojda et al., 2007]	13
Abb. 8: Prozentuale Veränderungen der MNi-Frequenz in PBLs für das mittlere und höchste Tertil der Aufnahme von Nährstoffen bezogen auf das Tertil mit der niedrigsten Nährstoffaufnahme [Fenech und Bonassi, 2011]	20
Abb. 9: Mittelwertunterschiede von BNC mit MNi und gesamter MNi-Häufigkeit nach Geschlecht	44
Abb. 10: Korrelation von Alter und gesamter Mikrokernfrequenz zum Zeitpunkt T1.....	45
Abb. 11: Korrelation von Alter und Apoptosen zum Zeitpunkt T1.....	46
Abb. 12: Korrelation von Alter und Nekrosen zum Zeitpunkt T1	47
Abb. 13: Geschlechterverteilung, Gruppe Training und Ernährung	48
Abb. 14: Altersverteilung, Gruppe Training und Ernährung	48

Abb. 15: Vergleich der BNCs mit MNi in Abhängigkeit der Altersgruppen (Gruppe Training & Ernährung)	50
Abb. 16: Vergleich der Gesamtmikrokerne in Abhängigkeit der Altersgruppen (Gruppe Training & Ernährung)	50
Abb. 17: Geschlechterverteilung, Gedächtnistrainingsgruppe	51
Abb. 18 : Altersverteilung, Gedächtnistrainingsgruppe	51
Abb. 19 : Vergleich der BNCs mit MNi in Abhängigkeit der Altersgruppen (Gedächtnistrainingsgruppe).....	53
Abb. 20: Vergleich der Gesamtmikrokerne in Abhängigkeit der Altersgruppen (Gedächtnistrainingsgruppe).....	53
Abb. 21: Gruppenvergleich der BNCs mit Mikrokernen, $p^* \leq 0,05$	56
Abb. 22: Gruppenvergleich der Mikrokerngesamtzahl, $p^* \leq 0,05$	57
Abb. 23: Gruppenvergleich der Anzahl an Apoptosen, $p^* \leq 0,05$	58
Abb. 24: Gruppenvergleich der Anzahl an Nekrosen, $p^* \leq 0,05$	59
Abb. 25: Gruppenvergleich der Anzahl an NPBs, $p^* \leq 0,05$	60
Abb. 26: Gruppenvergleich der Anzahl an NBUDs, $p^* \leq 0,05$	61

II. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Zusammensetzung von 1 Portion FortiFit [modifiziert nach www.nutricia.at , 2013].....	31
Tab. 2: Verteilung der Probanden nach Alters- und Interventionsgruppe	43
Tab. 3: Signifikante und nicht signifikante Mittelwertunterschiede der Parameter des CBMN Assays in Abhängigkeit der Studiengruppe nach sechsmonatiger Intervention (von T1 zu T3).....	55
Tab. 4: Signifikante und nicht signifikante Mittelwertunterschiede der Parameter des CBMN Assays in Abhängigkeit der Altersgruppe nach sechsmonatiger Intervention (von T1 zu T3).....	65

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BNC	Binucleated cell
BNCs	Binucleated cells
CBMN	Cytokinesis-block micronucleus cytome assay
DMSO	Dimethylsulfoxid
DM 1	Diabetes Mellitus Typ 1
DM 2	Diabetes Mellitus Typ 2
DNA	Desoxyribonucleinacid
dTMP	Desoxythymidinmonophosphat
dUMP	Desoxyuridinmonophosphat
EAA	Essential Aminoacid
g	Gramm
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
MetS	Metabolisches Syndrom
ml	Milliliter
MN	Micronucleus
MNi	Micronuclei
MTHFR	Methyltetrahydrofolatreduktase
MPS	Muskelproteinsynthese

NBUD	Nucleoplasmic Bud
NBUDs	Nucleoplasmic Buds
NDCI	Nuclear Division Cytotoxicity Index
NDI	Nuclear Division Index
NPB	Nucleoplasmic Bridge
NPBs	Nucleoplasmic Bridges
PHA	Phytohaemagglutinin
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat Buffered Saline
RDI	Recommended Daily Intake
ROS	Reactive Oxygen Species
Rpm	Revolutions per minute
SPBB	Short Physical Performance Battery
µl	Mikroliter
T1	Testzeitpunkt 1
T2	Testzeitpunkt 2
T3	Testzeitpunkt 3

1. EINLEITUNG

Die am schnellsten wachsende Bevölkerungsgruppe weltweit stellen ältere Personen dar. Die damit verbundene steigende Lebenserwartung bedeutet eine besondere Herausforderung in Bezug auf die Erhaltung der Lebensqualität im Alter [Hammar und Östgren, 2013].

Die Zunahme an Lebensjahren geht mit einer Verminderung der Skelettmuskelmasse einher. Dieser Muskelschwund (Sarkopenie) führt zu einer Einschränkung von motorischer Kraft und Funktionalität sowie in weiterer Folge zum Verlust an Mobilität und Unabhängigkeit im Alltag. Zur Prävention von Sarkopenie werden einerseits ein dem Alter angepasstes Krafttraining und andererseits eine ausreichende Proteinzufuhr empfohlen [Cruz-Jentoft et al., 2010].

Das Älterwerden ist auf zellbiologischer Ebene mit einer erhöhten Mutationsrate der Zellen assoziiert, aufgrund einer verminderten Wirksamkeit der Zellreparaturmechanismen sowie zahlreicher lebensstilabhängiger Faktoren [Iarmarcovai et al., 2007]. Wichtige Marker für chromosomale Schäden stellen Mikrokerne (MNI) dar, deren Frequenz nachweislich mit einem gesteigerten Krebsrisiko einhergeht und anhand des etablierten Cytokinesis-Block-Micronucleus Cytome Assay (CBMN) erfasst werden kann [Fenech, 2007].

Lebensstilfaktoren, wie Ernährung und Bewegung, können Einfluss auf die Mikrokernhäufigkeit haben. Zahlreiche Studien zeigten den positiven Effekt insbesondere von Folsäure, Vitamin B12 und bestimmten Antioxidantien auf das Vorkommen von Mikrokernen [Sharif et al., 2011; Fenech, 2001].

Diese Masterarbeit wurde im Rahmen der Forschungsplattform „Active Ageing“ erstellt. Das Ziel dieser Plattform ist, die Auswirkungen von progressivem Krafttraining sowie einer optimierten Ernährung, in Form eines Supplements, auf die körperliche Leistungsfähigkeit und Gesundheit von älteren Personen in Wiener Pensionisten-Wohnheimen zu untersuchen. Im Detail werden die Auswirkungen dieser zwei Faktoren auf die Chromosomenstabilität und somit auf die Häufigkeit von Mikrokernen und anderen Parametern wie nucleoplasmic

bridges (NPBs), nucleoplasmic buds (NBUDs), Apoptosen und Nekrosen, anhand des CBMN-Assays, erfasst. Die Effekte wurden in drei Gruppen untersucht: Gruppe Training, Gruppe Training und Ernährung und Gedächtnistrainingsgruppe.

Das Kapitel 3.3 wurden zusammen mit meiner Kollegin Karin Geider verfasst. In dieser Masterarbeit kann es zu inhaltlichen Überschneidungen mit anderen Beteiligten der Forschungsplattform Active Ageing kommen.

Mag. Klemens Krejci

Mag. Heidemarie Peherstorfer

Ariane Cremer, Bakk.

Bianca Arnold, MSc.

Claudia Traxler, MSc.

Sarah Proprentner, Msc.

Tanja Spitzer, MSc.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Bedeutung von Proteinbedarf und Krafttraining im Alter

Altern ist mit dem Rückgang von Muskelmasse und Muskelfunktion sowie deren mitochondrialen Kapazität verbunden. Dies führt in weiterer Folge zum Verlust an Muskelkraft. Mangelnde körperliche Aktivität stellt einerseits eine Ursache der Sarkopenie dar, andererseits führt der Verlust an Muskelmasse zu Bewegungseinschränkungen. Weiters ist Sarkopenie mit Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ II und kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert [Irving et al, 2012]. Eine empfohlene tägliche Proteinzufuhr von 0,8 g/kg Körpergewicht, die von den meisten SeniorInnen ab der 8. Lebensdekade nicht erreicht wird, sowie Krafttraining sind besonders im Alter bedeutende Faktoren, um die Muskelproteinsyntheserate zu erhöhen und somit das Risiko für Sarkopenie zu senken [Evans, 2004].

2.1.1 Proteinbedarf

Die empfohlene Eiweißzufuhr beträgt für alle Erwachsenen (ab 19 Jahren) einschließlich SeniorInnen 0,8 g/kg Körpergewicht pro Tag. Eine ausreichende, den Empfehlungen folgende Proteinzufuhr ist wichtig für die Muskelproteinsynthese (MPS) und den Muskelerhalt bzw. –aufbau. Zahlreiche Studien belegen jedoch, dass der Großteil der älteren Bevölkerung die empfohlene tägliche Eiweißmenge nicht erreicht [Hohenstein et al., 2011]. Als Hauptursachen dafür werden vor allem die niedrigere Energieaufnahme sowie verminderter Appetit genannt [Evans, 2004].

Laut dem österreichischen Ernährungsbericht 2012 ist hierzulande die ältere männliche und weibliche Bevölkerung mit einer täglichen Proteinaufnahme von 0,9kg/KG ausreichend versorgt. Die tägliche Aufnahme von Eiweiß liegt bei 15 Prozent der Gesamtenergieaufnahme. Im Vergleich zu den

Ernährungsberichten aus 2003 und 2008, kann eine stabile Proteinaufnahme bei den Frauen, und eine leicht sinkende Zufuhr bei den Männern zwischen 65 und 80 Jahren verzeichnet werden [Elmadfa et al., 2012]

Die empfohlene Proteinzufuhr sei insbesondere für ältere Personen, die regelmäßig Krafttraining absolvieren, zu niedrig [Campbell und Leidy, 2007]. Zur Vorbeugung von Muskelschwund wird von manchen Autoren eine tägliche Proteinaufnahme zwischen 1 und 1,5g/kg empfohlen [Evans, 2004; Morley et al., 2010].

Es ist erwiesen, dass die Aufnahme essentieller Aminosäuren (EAA) für die Muskelproteinsynthese notwendig ist. Normalerweise kann dieser Bedarf unter einer adäquaten Proteinaufnahme gedeckt werden, dies ist bei älteren Personen oft nicht der Fall. Orale Supplementationen mit täglich 15 g EAA über drei Monate bei gesunden älteren Erwachsenen führten zu einer signifikant gesteigerten Muskelproteinsyntheserate sowie einer höheren Magermasse (lean body mass) [Irving et al., 2012].

Viele Studien zeigten bereits, dass eine Supplementation von EAAs besonders bei älteren Menschen eine erhöhte Muskelproteinsynthese bewirkt. Von großer Bedeutung ist dabei die essentielle Aminosäure Leucin, die nachweislich am effektivsten die MPS stimuliert [Padden-Jones et al., 2004]. Vor allem die tägliche Aufnahme von 15g EAA und eine darin enthaltene Menge von 2,8g Leucin verbesserte kurz- und längerfristig die MPS sowie die Magermasse älterer Personen [Katsanos et al., 2006; Dillon et al., 2009].

2.1.2 Krafttraining

Krafttraining erhöht nachweislich die Muskelmasse und in größerem Ausmaß deren Kraft. Die Erhaltung der Muskelleistungsfähigkeit und –kraft ist für die Verlängerung von Lebensqualität und mobiler Unabhängigkeit im Alter von größter Bedeutung [Gremeaux et al., 2012].

Es wird älteren Personen empfohlen, zwei bis drei Mal wöchentlich, an nicht aufeinanderfolgenden Tagen mit einer Intensität von 70-80 % des Ein-Wiederholungsmaximums (1RM = 1 repetition maximum) zu trainieren [Hohenstein et al., 2011].

Zahlreiche Studien konnten bereits eine Steigerung des Muskelwachstums durch progressives Krafttraining, in Kombination mit Proteinsupplementen, zeigen. Ein zwölf Wochen dauerndes Krafttraining bei älteren Männern zeigte danach eine Verdoppelung der Kraft in Kniestrecker und Kniebeuger sowie eine Muskelhypertrophie. Die Hälfte der Probanden bekam zusätzlich ein Protein-/Energiesupplement und erreichte damit ein größeres Muskelwachstum, jedoch keine Verdopplung der Muskelkraft [Evans, 2004].

Unter demselben Trainingsprogramm, bei Männern und Frauen zwischen 87 und 96 Jahren, erzielten diese nach achtwöchigem Training einen signifikanten Muskelkraftzuwachs, die Gruppe mit Proteinsupplementen sogar größere Muskelkraftergebnisse. Selbst gebrechliche Personen erreichten positive Effekte auf die Beweglichkeit und das Wohlbefinden durch die körperliche Aktivität [Evans, 2004].

Der Einfluss der Proteinaufnahme auf die Muskelhypertrophie in Verbindung mit Krafttraining zeigte, dass die Gruppe mit der doppelten empfohlenen Proteinaufnahme (1,6g/kg KG/d) eine gesteigerte Muskelhypertrophierate im Gegensatz zur Gruppe mit der generell empfohlenen Proteinmenge (0,8g/kg KG/d) aufwies.

Progressives Krafttraining resultiert in erniedrigter Stickstoffausscheidung und erhöhtem Proteinbedarf. Daher ist besonders bei untergewichtigen oder mangelernährten älteren Personen eine erhöhte Proteinzufuhr bei regelmäßig ausgeführtem Krafttraining von großer Bedeutung [Evans, 2004].

2.1.3 Sarkopenie

Der Begriff Sarkopenie leitet sich vom griechischen „sarx“ für Fleisch und „penia“ für Mangel ab und ist definiert als ein geriatrisches Syndrom, das durch

altersassoziierten Verlust von Muskelmasse und Muskelfunktion gekennzeichnet ist. Zu den Faktoren, die zur Entwicklung von Sarkopenie beitragen, zählen neben verminderter Proteinaufnahme und Bewegungsmangel auch der Zustand der chronischen Entzündung und Atrophie von Motoneuronen [Hammar et al, 2013].

Die Prävalenz liegt je nach Definitionskriterien zwischen 5 und 13% der 60-70 Jährigen und zwischen 11 und 50% der über 80 Jährigen. Die altersassoziierte Sarkopenie wird aufgrund der höheren Lebenserwartung und der Zunahme der über 60 Jährigen in den nächsten Jahrzehnten deutlich ansteigen.

Folgende Messungen werden zur Diagnose der Sarkopenie herangezogen: Auf struktureller Ebene kommen anthropometrische Messungen wie Größe, Gewicht, BMI, Oberarm- und Unterschenkelumfang zum Einsatz. Zur Erfassung der Körpermasseanteile werden auf morphologischer Ebene DEXA (Dual-energy X-ray absorptiometry), BIA (bioelektrische Impedanzanalyse), sowie MRT (Magnetresonanztomografie) und CT (Computertomografie) eingesetzt. Des Weiteren wird auf funktioneller Ebene die körperliche Leistungsfähigkeit anhand Ganggeschwindigkeit, Handkraft-Messung, Timed-up-and-Go-Test, Mobilitätstest nach Tinetti sowie der SPPB (Short Physical Performance Battery) Test ermittelt [Hohenstein et al., 2011].

Schlüsselkomponenten in Prävention und Therapie von Sarkopenie stellen körperliches Widerstands- und Ausdauertraining sowie eine adäquate Protein- und Energiezufuhr dar. Vor allem eine mit Leucin angereicherte Mischung essentieller Aminosäuren ist hier von Bedeutung. Der ebenso positive Effekt von Kreatin muss noch näher untersucht werden. Viele Sarkopenie-Patienten weisen einen zu geringen 25(OH)-Vitamin D Status auf, daher sollte dieser überprüft werden, um im Falle eines Mangels Folgeerscheinungen mit Hilfe von Vitamin D Supplementierung zu vermeiden [Morley et al., 2010].

2.2 Der Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay (CBMN)

Der CBMN Assay ist eine weltweit etablierte Methode, um in vitro und in vivo DNA-Schäden auf chromosomaler Ebene anhand des Vorkommens genotoxischer Parameter wie Mikrokerne zu messen. Die Ursprünge der Forschungen dieser Methode gehen bis in die frühen 1980er Jahre zurück. 1997 wurde das human micronucleus (HUMN) Projekt gegründet, ein international koordiniertes Projekt, das die Mikrokernhäufigkeit in Populationen untersucht [Holland et al., 2008]. Hauptziele sind dabei methodische, demografische, genetische und Expositions-Determinanten, die DNA-Schäden und somit Mikrokernbildung induzieren, in humanen Lymphozyten zu erfassen und zu protokollieren [Fenech et al., 2011].

Der CBMN Assay hat sich zu einer umfassenden Methode entwickelt, mit der Chromosomenbrüche (MNi), Chromosomenverluste (MNi), Chromosomenumlagerungen in dizentrischen Zellen (NPBs), Genamplifikationen (NBUDs), Apoptosen und Nekrosen gemessen werden können (**Abbildung 1**). Zytotoxische Effekte werden mittels Verhältnis von Apoptosen zu Nekrosen, zytostatische Effekte anhand des Verhältnisses von Einkernzellen zu Zweikern-, sowie zu Mehrkernzellen bestimmt. Da Mikrokerne und die anderen Parameter erst bei der Zellteilung (Mitose) entstehen, werden die isolierten Blutlymphozyten zunächst zur Zellteilung angeregt und anschließend die entstandene Zweikernzelle mittels Cytochalasin B in der weiteren Teilung gestoppt [Fenech, 2007].

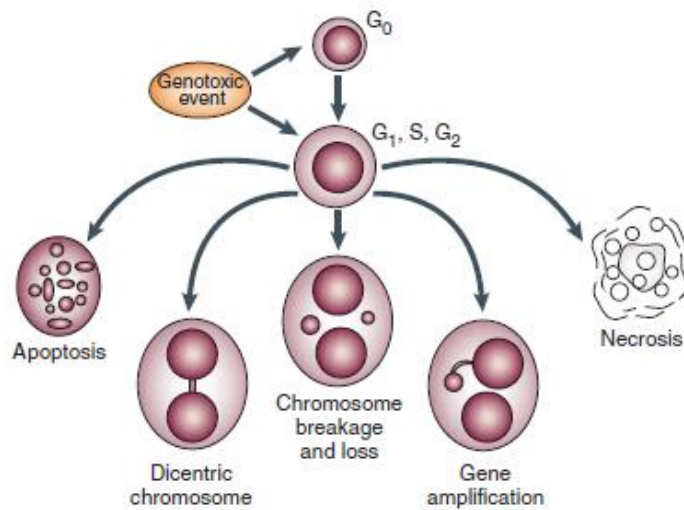


Abb.1: Verschiedene mögliche Effekte von kultivierten zytokineseblockierten Zellen nach Exposition zytotoxischer/genotoxischer Agenzien [Fenech, 2007]

2.2.1 Parameter des CBMN Assay

MNi (**Abbildung 2a und 2b**) sind Biomarker für Chromosomenbrüche oder –verluste und werden während der Anaphase in sich teilenden Zellen aus Chromosomenfragmenten oder ganzen Chromosomen exprimiert. Da sie nach der Kernteilung entstehen, ist die Auswertung in Zweikernzellen (BNCs) mittels CBMN Assay möglich [Fenech, 2000].

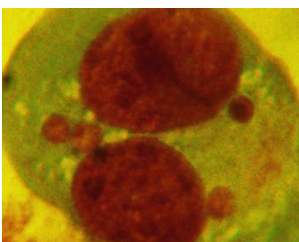


Abb. 2a: BNC mit vier MNi

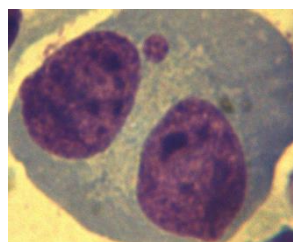


Abb. 2b: BNC mit einem MN

NPBs (**Abbildung 3a und 3b**) sind Biomarker für Chromosomenwiedervereinigungen. Sie treten ebenso in der Anaphase auf, wenn die Zentromere von dizentrischen Chromosomen zu den

gegenüberliegenden Spindelpolen der Zellen gezogen werden. Dizentrische Chromosomen entstehen durch Fehlreperatur von DNA-Strangbrüchen oder durch Fusion der Telomerenden [Fenech, 2007].

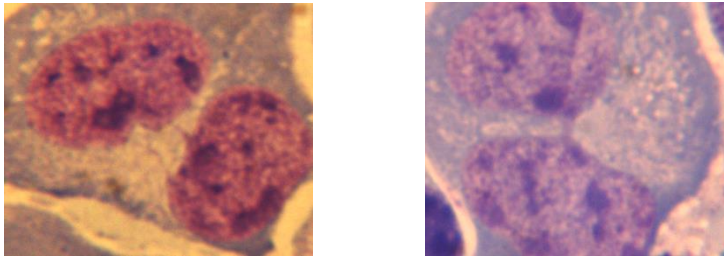


Abb. 3a+b: BNC mit NPBs

NBUDs (**Abbildung 4a und 4b**) stellen ein Maß für Genamplifikationen in BNCs dar [Holland, 2008].

Sie entstehen während der S-Phase der Mitose und gleichen in der Morphologie den MNi, sind jedoch durch einen schmalen oder breiteren Stiel mit dem Zellkern verbunden. Der Prozess dieser Abschnürung wird als „nuclear budding“ bezeichnet, der in Kulturen beobachtet wurde, die unter selektierten Bedingungen unter anderem Genamplifikation oder Folsäuremangel zur Folge hatten [Fenech, 2007].

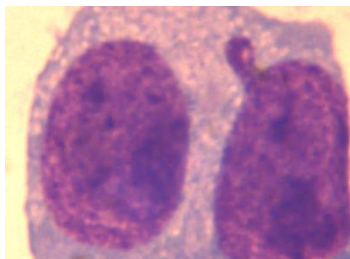


Abb. 4a: BNC mit abgeschnürtem NBUD

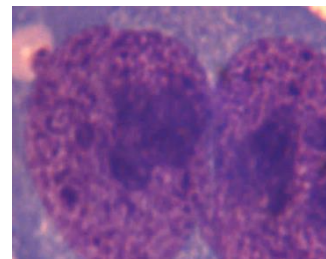


Abb. 4b: BNC mit NBUD in Vakuole

Die Apoptose (**Abbildung 5a und 5b**) ist als programmierter Zelltod definiert, der vor allem für die Eliminierung schädlicher Zellen (z.B. Tumorzellen) verantwortlich ist. Ausgelöst durch oxidativen Stress oder sonstigen Zellschädigungen wird eine Kaskade verschiedener reaktiver Proteine

ausgelöst, die letztendlich mit einer DNA-Fragmentierung und somit Auflösung der Zelle endet [Silbernagl und Lang, 2009].

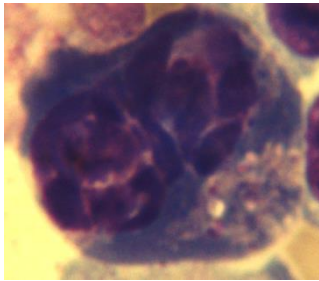


Abb. 5a: Apoptose mit zwei auflösenden Zellkernen

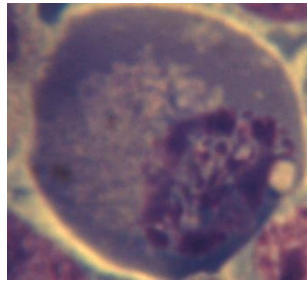


Abb. 5b: Apoptose mit einem auflösenden Zellkern

Eine Nekrose (**Abbildung 6a und 6b**) ist im Gegensatz zur Apoptose ein durch exogene Faktoren (chemische, physikalische Einflüsse) verursachter Zelltod, der in inflammatorischen Reaktionen mündet [Silbernagl und Lang, 2009].

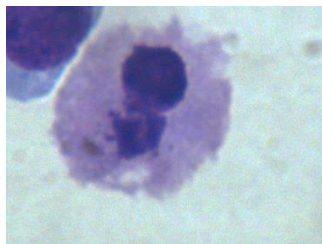
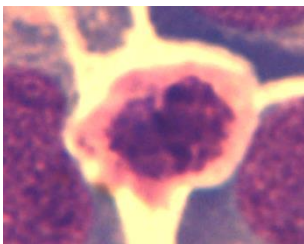


Abb. 6a+b: Nekrose mit auflösendem Zellkern und Cytoplasma

Der NDI gibt den Proliferationsstatus der lebenden Zellfraktionen wider und ist somit ein Indikator für zytostatische Effekte und mitogenetischer Antwort in humanen Lymphozyten. Gezählt werden 500 lebende Zellen um die Häufigkeit von ein, zwei, drei oder vier Kernen festzustellen. Der NDI wird folgendermaßen berechnet:

$NDI = (M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3 + 4 \times M4) / N$, wobei M1-M4 die Zellen mit ein bis vier Kernen und N die Gesamtzahl der Zellen, ausgeschlossen Nekrosen und Apoptosen, sind [Fenech, 2007].

Der NDCI ist ebenso wie der NDI ein Indikator für zytostatische Effekte, inkludiert jedoch auch Apoptosen und Nekrosen. Er wird nach folgender Formel berechnet:

$NDI = (APO + NEC + M1 + 2 \times M2 + 3 \times M3 + 4 \times M4) / N$, wobei APO und NEC die Anzahl der apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen darstellen und die restlichen Variablen wie beim NDI gelten [El-Zein et al., 2008].

2.3 Mikrokernhäufigkeit in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht

Der Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Mikrokernfrequenz konnte schon in den frühen Forschungsjahren des CBMN Assays (1980/1990er) gezeigt werden [Fenech et al., 2011].

Eine Metaanalyse der mit Hilfe des HUMN Projects weltweit aufgezeichneten Daten bestätigte, dass sowohl die Mikrokernhäufigkeit in beiden Geschlechtern mit dem Alter ansteigt, als auch die weibliche Bevölkerung eine erhöhte Mikrokernfrequenz aufweist. Der altersbezogene Mikrokernanstieg dürfte von vielen Faktoren abhängen, wie beispielsweise der kumulativen Wirkung erworbener Mutationen in Genen, die an der DNA-Reparatur oder Chromosomenabtrennung beteiligt sind sowie strukturelle Chromosomenaberrationen, die auf Fehlernährung, endogene und exogene Toxine, oder auf berufs- oder umweltbezogene Genotoxine zurückzuführen sind. Des Weiteren spielt der Lebensstil eine große Rolle in der Mikrokernentstehung (siehe Kap. 2.5).

Die höhere Mikrokernrate bei Frauen erklärt sich durch eine größere Tendenz des X-Chromosoms, als Mikrokern verloren zu gehen, im Vergleich zum Y-Chromosom. Dadurch, dass Frauen zwei X-Chromosome besitzen, lässt sich eine höhere Mikrokernfrequenz gegenüber Männern verzeichnen [Fenech und Bonassi, 2011].

In einer polnischen Studie von Wojda et al. (2007) wurde der Zusammenhang zwischen der altersbedingten Hypoploidie (verringerte Chromosomenzahl) und dem Auftreten von MNi untersucht. 127 Männer und Frauen zwischen 21 und 108 Jahren nahmen teil. Bei beiden Geschlechtern konnte ein MNi-Anstieg bis zum 68. Lebensjahr beobachtet werden. Die MNi-Häufigkeit wies zwischen dem 60. und 68. Lebensjahr die Höchstwerte auf. In der Gruppe der 60 bis 110 Jährigen kam es allerdings zu einer Verringerung der MN-Frequenz (**Abbildung 7**).

Dieser Trend konnte in anderen Studien ebenfalls beobachtet werden [Bolognesi et al., 1999].

Frauen hatten im Vergleich zu Männern generell eine etwas höhere MNi-Frequenz [Wojda et al., 2007].

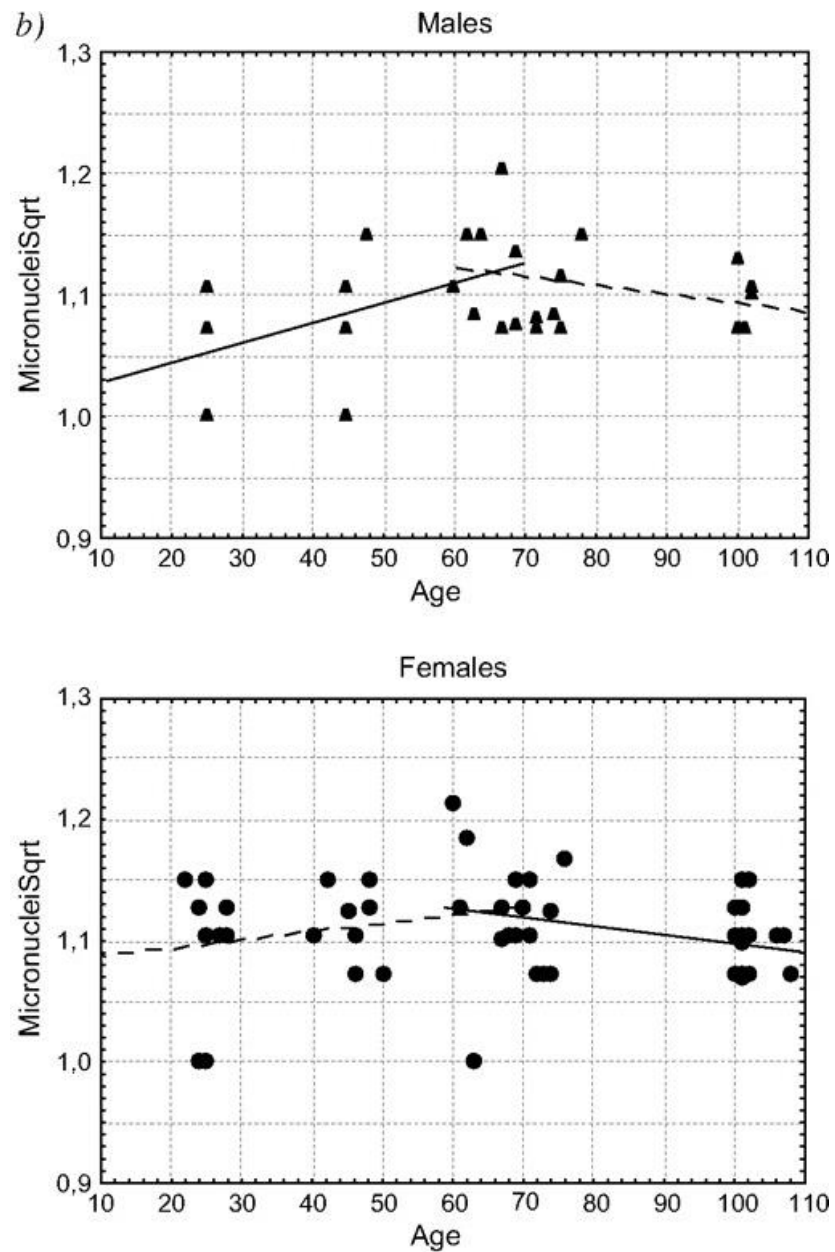


Abb. 7: Korrelation zwischen MNi-Frequenz und Alter nach Geschlecht.
Durchgehende Linie steht für eine signifikante Korrelation [Wojda et al., 2007]

2.4 Mikrokernhäufigkeit und Krebsrisiko

Chromosomale Schäden stellen charakteristische Kennzeichen von Krebs dar. Seit dem Anwendungsbeginn des CBMN Assays können diese genotoxischen Veränderungen anhand der Anzahl an Mikrokernen erfasst werden. Zahlreiche Studien belegen einen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von Mikrokernen und dem Krebsrisiko [Bonassi et al., 2011].

Die heutige Krebsrisikobeurteilung umfasst neben der Mutagensensitivität multiple Faktoren, wie bekannte demografische Faktoren (Alter und Geschlecht), Lebensstilexpositionen (Rauchen und Alkoholkonsum) sowie berufs- oder umweltbedingte Einflüsse [El-Zein et al., 2011].

Folgende Gründe für die Assoziation der MNi-Häufigkeit und Krebsentstehung werden angegeben [Bonassi et al., 2007]:

- Eine hohe MNi-Frequenz korreliert mit unbehandelten Krebspatienten sowie mit einer erhöhten Krebsanfälligkeit in Patienten mit angeborenen Erkrankungen
- Die Anwesenheit hoher MNi-Frequenz in der Mundschleimhaut
- Die existierende Korrelation zwischen genotoxischen, MNi-induzierenden Stoffen und Krebsentstehung
- Die inverse Korrelation zwischen MNi-Häufigkeit und Plasmakonzentrationen von Mikronährstoffen, die antikarzinogen wirken (Folsäure, Vitamin E, Kalzium,...)

Eine groß angelegte internationale Kohortenstudie zeigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen Mikrokernhäufigkeit und Krebsrisiko in gesunden Personen. Zwischen 1980 und 2002 wurden 6718 krebsfreie Personen in zehn Ländern auf den MNi-Status untersucht. Das Ergebnis war ein signifikanter Anstieg des relativen Krebsrisikos sowie eine Abnahme an krebsfrei Überlebenden in den Gruppen mit hoher und mittlerer MNi-Frequenz. Ein erhöhtes Risiko konnte bei allen Krebsarten, außer Leber, Galle und Pankreas,

gezeigt werden, ein signifikant erhöhtes Risiko war bei Urogenitalkrebs gegeben [Bonassi et al., 2007].

Eine Vielzahl an retro- und prospektiven Studien bestätigen die positive Korrelation zwischen Mutagensensitivität und einem erhöhten Erkrankungsrisiko der meisten Krebsarten einschließlich Lungen-, Brust-, Prostata-, Blasen-, Darm-, Gehirn-, Haut-, Kopf- oder Halstumoren. Dabei führen Lungen- und Brustkrebs die Liste der Krebsarten an. Aktuelle Zwillingsstudien, die umwelt- und genetisch bedingte Einflüsse auf die Mutagensensitivität untersuchten, kamen zum Ergebnis, dass die Mutagensensitivität stark erblich bedingt ist [Bonassi et al., 2011].

2.5 Einfluss von Lebensstilfaktoren auf das Mikrokernvorkommen

2.5.1 Körperliche Aktivität

Derzeit existieren sehr wenige und kontroverse Studien über den Einfluss von körperlichem Training auf die MN-Frequenz.

Eine japanische Studie untersuchte chromosomale Schäden in Lymphozyten nach einer 30-minütigen intensiven Laufbelastung in trainierten und untrainierten Personen. Es konnten nur geringe induzierte DNA-Schäden, die in vitro durch Bestrahlung erfolgten, in Untrainierten gemessen werden; spontane chromosomale Schäden zeigten bei keiner Gruppe Veränderungen [Umegaki et al., 1998].

Ebenfalls in Japan untersuchten Huang et al. (2009) bei 208 Metallarbeitern verschiedenste Lebensstileinflüsse auf die MN-Häufigkeit. Neben unausgewogener Ernährung, Schlaf <6 Stunden pro Nacht, Arbeitszeiten >9 Stunden täglich und starkem Zigarettenkonsum, war die MN-Frequenz in Arbeitern, die weniger als zwei Mal wöchentlich körperlich aktiv waren, signifikant erhöht. Andere Einflussfaktoren wie Alkoholkonsum oder psychischer Stress führten zu keinen signifikanten Veränderungen der MN-Frequenz [Huang et al., 2009].

Reichhold et al. (2008) fanden heraus, dass ein Ironman-Triathlon keine langfristigen DNA-Schäden in gut trainierten Teilnehmern verursacht. Es wurden Blutproben 2 Tage vor, direkt nach sowie 5 und 19 Tage nach dem Rennen entnommen und die Lymphozyten auf MNi, NPBs und NBUDs untersucht, die letztendlich nach 19 Tagen keinen Anstieg, sondern eine Abnahme verzeichneten [Reichhold et al., 2008].

Dass extremes, erschöpfendes körperliches Training zu erhöhten DNA-Schäden führt, zeigt eine Untersuchung an sechs Probanden, die bis zur Erschöpfung sprinten mussten. Die Mikrokernfrequenz erhöhte sich signifikant bei fünf von sechs Teilnehmern 24 Stunden nach dem Sprint, bei einem Teilnehmer nach 48 Stunden [Schiffl et al., 1997].

2.5.2 Übergewicht und Diabetes

Adipositas, insbesondere abdominelle Adipositas, ist ein Hauptrisikofaktor für das metabolische Syndrom (MetS) und spielt eine große Rolle in der Insulinresistenz und Entstehung von Diabetes Mellitus Typ 2. Einhergehend mit einer Imbalance zwischen freien Radikalen und Antioxidantien, sind die dabei entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) Induktoren für Schäden an der DNA, die für die Initiierung und Progression von DM2 verantwortlich sind. Die derzeit wenigen Studien zeigen signifikant höhere DNA-Schäden bei Personen mit Adipositas oder MetS gegenüber gesunden Probanden. Je mehr metabolische Störungen vorlagen, desto signifikant niedriger war die antioxidative Kapazität und desto mehr DNA-Schäden konnten verzeichnet werden.

Diabetes ist ebenso gekennzeichnet durch oxidativen Stress, überwiegend zurückzuführen auf die übermäßige Produktion von ROS durch Glukose-Autooxidation und nichtenzymatische Glykosylierung. In DM2-Patienten treten generell mehr Chromosomenschäden auf als in DM1-Patienten [Andreassi et al., 2011].

2.5.3 Alkohol- und Tabakkonsum

Sowohl der Alkohol- als auch der Zigarettenkonsum erhöhen nachweislich das Krebsrisiko. Genetische Polymorphismen von den Enzymen ADH1B, CYP2E1 und ALDH2 beeinflussen den Alkoholstoffwechsel. Eine japanische Studie mit über 200 Probanden fand heraus, dass „Vieltrinker“ (4-7 Portionen/Woche), die den ALDH2 Genotypen enthielten, eine signifikant höhere Mikrokernfrequenz hatten im Gegensatz zu den Trinkern mit den anderen Genotypen. Andere Studien zeigten eine signifikante 20%ige Abnahme der MN-Frequenz nach dem Konsum von alkoholfreiem, gegenüber dem Konsum von üblichem, alkoholhaltigen Wein, die auf die protektive Wirkung der Polyphenole gegenüber oxidativen Schäden zurückzuführen ist. Untersuchungen zu den Auswirkungen eines moderaten Weinkonsums auf DNA-Schäden brachten bislang keine signifikanten Ergebnisse.

Aufgrund kontroverser Studien über den Zusammenhang von Rauchen und der MN-Frequenz, zeigte eine gepoolte Reanalyse von 24 Datenbanken des HUMN Projekts folgende Ergebnisse. Die Datenbanken inkludierten insgesamt 5710 Probanden, davon waren 3501 Nichtraucher, 1409 regelmäßige Raucher und 800 ehemalige Raucher. Die regelmäßigen und ehemaligen Raucher wiesen einen nichtsignifikanten Anstieg der Mikrokernhäufigkeit im Gegensatz zu den Nichtrauchern auf. Signifikant erhöht war die Mikrokernfrequenz in starken Rauchern mit einem Konsum von über 30 Zigaretten pro Tag [Fenech und Bonassi, 2011].

Tabakkonsum ist stark mit Lungenkrebs assoziiert. El Zein et al. (2008) erfasste schon in mehreren Studien den Zusammenhang des Tabak-spezifischen Nitrosamins 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) und der Genotoxizität, deren Ausmaß dann mittels CBMN assay ermittelt wurde. Nicht nur eine erhöhte MN-Frequenz, sondern auch NPBs, NBUDs sowie die wichtigen zytotoxischen Parameter Nekrosen und Apoptosen haben sich als effektive Biomarker für das Lungenkrebsrisiko erwiesen [El Zein et al., 2008].

2.5.4 Kardiovaskuläre Erkrankungen

Langzeitstudien haben gezeigt, dass eine erhöhte Mikrokernhäufigkeit ein prädiktiver Biomarker für kardiovaskuläre Mortalität innerhalb gesunder Populationen sowie in Patienten mit bestehenden kardiovaskulären Erkrankungen ist. Eine erhöhte MNi-Frequenz korreliert stark mit dem Auftreten und der Schwere von koronarer Herzkrankheit [Andreassi et al., 2011]. Des Weiteren muss beachtet werden, dass DNA-Schäden vermehrt in Patienten gefunden werden konnten, die aufgrund chronischer Erkrankungen wiederholt Röntgenstrahlen oder Nitrattherapien im Rahmen medizinischer Untersuchungen ausgesetzt sind.

Studien haben gezeigt, dass Nährstoffmangel und genetische Veränderungen von Enzymen die im Homocystein-Stoffwechsel involviert sind, das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöhen. Dabei wurde eine Hyperhomocysteinämie als Risikofaktor für zerebrale, koronare und periphere Artherosklerose identifiziert [Andreassi et al., 2011].

2.6 Einfluss von Mikronährstoffen auf Chromosomenschäden

Die Auswahl und Menge an Nährstoffen, sei es in Form von Lebensmittel oder Supplementen, haben großen Einfluss auf die zelluläre Konzentration der Mikronährstoffe, die als Co-Faktoren oder Substrate für die DNA-Synthese und –Reparatur benötigt werden [Fenech und Bonassi, 2011].

Sowohl ein Mangel als auch ein Überschuss an Mikronährstoffen können negative Auswirkungen auf die Genomintegrität aufgrund Nährstoff-Gen-Interaktionen oder Interaktionen zwischen mehreren Nährstoffen haben und dies scheint von der individuellen Genkonstitution abzuhängen. Daher ist es wichtig, ernährungsbedingte Faktoren, die in der Minimierung der Genominstabilität sowie der MNi-Frequenz von Bedeutung sind, zu

identifizieren, mit dem Ziel, zukünftige Erkrankungsrisiken zu reduzieren [Thomas et al., 2011].

Einige in vitro sowie in vivo Studien konnten bereits signifikante Zusammenhänge zwischen der MNi-Frequenz und der Plasmakonzentration bestimmter Mikronährstoffe, wie Folat, Vitamin B12, Vitamin E, Kalzium, Retinol, Nikotinsäure, β -Carotin, Riboflavin, Pantothersäure und Biotin, belegen [Fenech et al, 2005; Titank-Holland et al., 1998; Umegaki et al., 1994].

Fenech und Bonassi (2011) identifizierten letztendlich in einer in vivo Studie neun Mikronährstoffe, die signifikant mit der MNi-Häufigkeit korrelieren (**siehe Abbildung 8**). Dazu wurde die Assoziation zwischen der täglichen Nährstoffaufnahme mit Genomschäden mittels Food frequency Questionnaire (FFQ) und CBMN Assay an 190 Probanden untersucht.

Das Tertil mit der höchsten Aufnahme von Vitamin E, Retinol, Folat, Nikotinsäure und Kalzium war, im Gegensatz zum Tertil mit der niedrigsten Aufnahme, mit einer signifikanten Reduktion von MNi assoziiert. Hingegen war das Tertil mit der höchsten Aufnahme von Riboflavin, Biotin und Pantothersäure mit einer gesteigerten MNi-Frequenz assoziiert. Das Tertil mit der mittleren Aufnahme von β -Carotin war, gegenüber dem ersten Tertil, mit einer 18%igen Reduktion von MNi, das Tertil mit der höchsten Aufnahme (>6400 $\mu\text{g}/\text{Tag}$) jedoch mit einer 18%igen Steigerung der MNi-Häufigkeit gegenüber dem niedrigsten Tertil assoziiert. Dies ist auf die Tatsache zurückzuführen, dass sowohl ein Mangel als auch eine Überdosis, die vorwiegend durch Supplemente erreicht wird, zu Chromosomenschäden führen kann [Fenech und Bonassi, 2011].

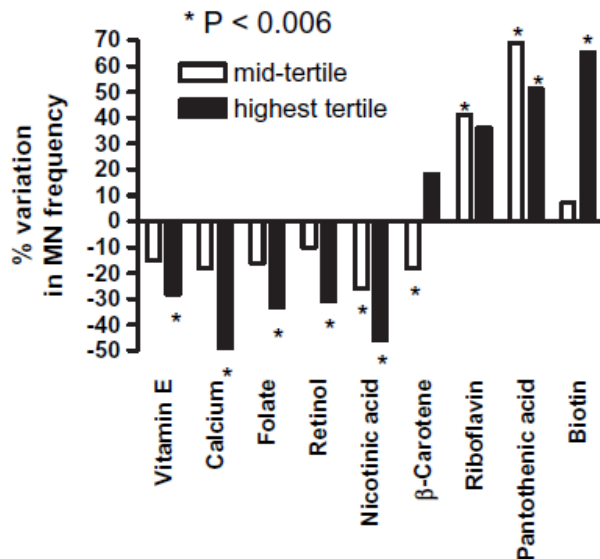


Abb. 8: Prozentuale Veränderungen der MNi-Frequenz in PBLs für das mittlere und höchste Tertil der Aufnahme von Nährstoffen bezogen auf das Tertil mit der niedrigsten Nährstoffaufnahme [Fenech und Bonassi, 2011]

Über den Einfluss von Makronährstoffen auf die MNi-Häufigkeit existieren bis dato keine Studien [Fenech und Bonassi, 2011].

2.6.1 Vitamin B12 und Folat

Folat und Vitamin B12 fungieren im DNA-Metabolismus als Donatoren in der DNA-Methylierung und tragen somit zur DNA-Stabilisierung bei. Folat spielt eine wichtige Rolle in der Synthese von Deoxythymidinmonophosphat (dTMP) aus Deoxyuridinmonophosphat (dUMP), und bei Mangel an Folat wird vermehrt Uracil statt Thymidin in die DNA eingebaut. Dieser vermehrte Uracileinbau führt zu Punktmutationen, DNA-Einzel- und Doppel-Strangbrüchen, Chromosomenbrüchen sowie Mikrokernbildung. Folat und Vitamin B12 werden weiters für die Synthese von Methionin und S-Adenosyl-Methionin (SAM) benötigt, die essentiell für die Genexpression und Chromosomenkonformation sind. Da Vitamin B12 ein essentieller Cofaktor der Methylmalonyl Coenzym A Mutase (MMCoA Mutase) ist, bewirkt dessen Mangel eine Akkumulation von Methylmalonsäure (MMA) und dies führt letztendlich zur Bildung von ROS. ROS

bilden sich hier unter anderem in Folge der Freisetzung inflammatorischer Cytokine wie Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und in Folge eines Homocysteinanstiegs, der wiederum auf die Hemmung der Methioninsynthase (MTR) zurückzuführen ist.

Ein Mangel an Folat und Vitamin B12 einerseits kann dementsprechend zu erhöhten DNA-Schäden sowie veränderter DNA-Methylierung führen, beide Faktoren stellen ein erhöhtes Krebsrisiko dar. Andererseits ist ein erhöhter Homocysteinspiegel ein deutlicher Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen [Fenech, 2012].

Erhöhte Homocysteinwerte können selbst bei adäquater Folat- und Vitamin B12 Versorgung chromosomale Schäden verursachen. Das zeigt eine Studie an 64 gesunden Männern zwischen 50 und 70 Jahren. Männer mit Folat- und Vitamin B12 Spiegel im optimalen Bereich aber erhöhten Homocysteinspiegel ($>10 \mu\text{mol/l}$) wiesen eine signifikant höhere MNI-Frequenz, im Vergleich zu jenen Probanden mit normalen Folat-, Vitamin B12- und Homocysteinspiegel, auf. Eine placebokontrollierte Studie innerhalb dieser Kohorte zeigte, dass eine 2-monatige Supplementierung mit 0,7mg Folat und eine darauffolgende 2-monatige Supplementierung mit 2mg Folat eine 11%ige Reduktion von Homocystein, jedoch keine Verminderung des MNI-Index, bewirkte [Fenech et al., 1997]

Eine Studie an 106 jungen Erwachsenen zwischen 18 und 32 Jahren zeigte eine positive Korrelation der MNI-Frequenz mit dem Homocysteinspiegel bei Männern, und eine negative Korrelation mit Vitamin B12 Defiziten bei Frauen. Eine signifikante Reduktion der MNI-Frequenz war bei einer Plasmakonzentration von Homocystein $<7,5 \mu\text{mol/l}$, von Vitamin B12 $>300 \text{ pmol/l}$ sowie von Folat $>700 \text{ nmol/l}$ zu verzeichnen. Diese Konzentrationen waren jedoch nur erreicht bei einer Supplementation über den jeweiligen RDI-Wert hinaus [Fenech et al., 1998].

Bei Patienten mit Nierenversagen sind Krebsinzidenz und MNI-Frequenz signifikant erhöht. Eine Studie von Stopper et al. (2008) zeigte eine signifikante Reduktion der MNI-Häufigkeit nach 17 wöchiger Supplementation mit Folsäure sowie mit einer Kombination von Folsäure und Vitamin B12. Die Patienten in

der Folatgruppe wiesen nach der Intervention eine 28%ige Reduktion der MNi-Frequenz sowie eine 32%ige Reduktion des Plasmahomocysteinspiegels auf. Eine größere Reduktion verzeichnete die Patientengruppe nach der kombinierten Supplementierung. Der MNi-Index verringerte sich um 41% und die Homocysteinkonzentration um 47% [Stopper et al., 2008].

Studien, die Unterschiede zwischen Vegetariern und Nicht-Vegetariern untersuchten, fanden keine signifikanten Veränderungen zwischen den MNi-Frequenzen der beiden Gruppen, obwohl bekannt ist, dass die Mikronährstoffkonzentration dennoch anders ist. So weisen Vegetarier oft einen Vitamin B12 Mangel auf, der in diesen Untersuchungen signifikant mit einer erhöhten MNi-Frequenz bei vegetarisch lebenden Männern korreliert hat [Fenech und Bonassi, 2011].

Basierend auf den Ergebnissen wäre eine über die empfohlenen Referenzwerte für die Nährstoffe Folat und Vitamin B12 hinaus gehende Zufuhr nötig, um DNA-Schäden vorzubeugen bzw. zu reduzieren. Fakt ist, dass die Nährstoffaufnahme von der individuellen Absorptions- und Metabolisierungsfähigkeit sowie von individuellen Genotypen abhängt [Ferguson und Fenech, 2012].

2.6.2 Antioxidantien

Im gesunden Organismus halten sich Antioxidantien und freie Radikale, die natürlicherweise im Stoffwechsel entstehen, die Waage. Überwiegen dauerhaft freie Radikale, führen diese zu oxidativem Stress und in Folge zu vermehrten zellulären und genetischen Schäden [Thomas et al., 2011].

2.6.2.1 Effekte einzelner Antioxidantien

Vitamin C als Redoxverbindung besitzt in vitro und in vivo sowohl antioxidative als auch prooxidative Eigenschaften. Seine antioxidative Kapazität beruht auf

der geringen Reaktivität des bei der Reaktion mit ROS entstehenden Semi-hydroascorbad Radikals. Die Fähigkeit, die Bildung von ROS zu drosseln, reduziert damit Schäden an Protoonkogenen und Tumor-Suppressorgenen, wodurch das Krebsrisiko gesenkt wird. Epidemiologische Studien belegen, dass eine Vitamin C-reiche Kost das Krebsrisiko um 50% reduzieren kann [Crott und Fenech, 1999].

Die prooxidative Wirkung beruht auf der Reduktion von DNA-gebundenen Anionen wie Kupfer und Eisen, die Hydrogenperoxide reduzieren um hochreaktive Hydroxylradikale zu bilden. Die Interaktion dieser Hydroxylradikale mit der DNA-Hauptkette führt zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen und zur Bildung von MNi [Thomas et al, 2011].

In einer Studie von Crott und Fenech (1997) wurde ex vivo untersucht, ob eine hohe Dosis Vitamin C eine schützende oder fördernde Wirkung von genetischen Schäden hat. Blutabnahmen erfolgten vor und nach einer zweitägigen Antioxidantien-armen Diät, dies bewirkte eine Reduktion der Vitamin C -Plasmakonzentration um 15%. Eine folgende Gabe von 2 mg Ascorbinsäure erhöhte die Konzentration nach zwei Stunden um 115%, nach vier Stunden um 125%. Die Supplementierung ergab keine Änderung der MNi- sowie Apoptosen-Bildung in der Kontrollgruppe sowie in der Gruppe, in der MN-Bildung mittels Hydroperoxid getestet wurde. Nekrosen hingegen waren mäßig erhöht. Die Analyse der kombinierten Daten zeigte eine positive Korrelation zwischen Nekrosen und MNi-Häufigkeit und eine negative Korrelation zwischen Nekrosen und Apoptosen. Unter normalen physiologischen Bedingungen scheint eine erhöhte Vitamin C Gabe keine DNA-Schäden zu verursachen, aber auch nicht protektiv gegen Hydroperoxidschäden zu wirken [Crott und Fenech, 1999].

Vitamin E spielt ebenfalls eine wichtige Rolle im Abfangen von ROS, insbesondere in der Fettoxidation. Eine placebokontrollierte, doppelblinde Interventionsstudie an 60 älteren Männern untersuchte, ob eine hohe Dosis d- α -tocopherol vor DNA-Schäden schützt. Der RDI von d- α -Tocopherol beträgt 10 mg. Nach einer ersten acht-wöchigen Supplementierung des 5-fachen RDI an

d- α -Tocopherols (50mg), folgte eine zweite acht-wöchige Phase mit einer mehr als 30fachen RDI Dosis d- α -Tocopherols (335mg). Nach Phase 1 stieg die Plasmakonzentration von d- α -Tocopherol um 22%, nach Phase 2 um 89%. Die MNI-Frequenz verringerte sich um 32% in der Interventions- und Kontrollgruppe. Es ist unklar, ob nicht der beobachtete Rückgang auf den in den Supplementen bzw. Placebos enthaltenen Sojaölcarrier zurückzuführen ist [Fenech et al, 1997].

Selen ist ein essentieller Cofaktor von antioxidativen Enzymen wie Glutathionperoxid und gilt vor allem als protektiv gegen Prostatakrebs. Der Konsum von Selen angereicherten Weizenbiscuits verbesserte zwar den Plasma-Selenstatus, bewirkte jedoch keine Veränderungen der MNI-Frequenz. Dies ist damit zu erklären, dass der minimale Plasma-Selenstatus von 120 $\mu\text{g/ml}$, der erforderlich ist um antikarzinogen zu wirken, erreicht wurde [Karunasinghe et al., 2004].

Eisen spielt eine wichtige Rolle im oxidativen Metabolismus, insbesondere bei der DNA-Synthese und -reparatur. Es existiert vorläufige Evidenz, dass eine optimale Eisenaufnahme notwendig ist, um genetische Schäden zu verhindern. Eine Studie an Kindern und Jugendlichen zwischen 7 und 17 Jahren zeigte eine 50% niedrigere Rate an MNI und NPBs bei Kindern mit adäquater Eisenzufuhr von 20 mg pro Tag, im Gegensatz zu Kindern mit einer Eisenaufnahme von 7mg pro Tag [Pra et al., 2012].

2.6.2.2 Effekte kombinierter Antioxidantien

Eine placebokontrollierte Interventionsstudie untersuchte die Wirkung von α -Tocopherol (100mg/Tag), β -Carotin (6mg/Tag), Vitamin C (100mg/Tag), und Selen (50 μg /Tag) auf oxidativen Stress, die MNI-Häufigkeit und den Einfluss des Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) – Gens. Die Intervention umfasste eine Gruppe von 28 männlichen Probanden mit

Herz-Kreislaufkrankungen und eine gesunde Kontrollgruppe (N=58) und dauerte 12 Wochen. Die MNI-Frequenz wurde in Zusammenhang mit dem MTHFR-Genotyp, Homocystein- und Folatplasmalevels gemessen. Dabei korrelierten die MNI-Häufigkeiten nicht mit dem Plasmafolatspiegel und dem Genotyp. Nach der Intervention reduzierte sich die MNI-Frequenz signifikant in Patienten mit normalen Folatkonzentrationen um 39%. Bei Patienten mit niedrigem Folatstatus war eine starke Korrelation der MNI-Frequenz und dem Homocysteinspiegel vor und nach der Supplementation zu beobachten [Smolkova et al., 2004].

Eine randomisiert-kontrollierte Studie an 190 Teilnehmern untersuchte, inwiefern eine sechsmonatige kombinierte Supplementation mit β -Carotin (18mg), Vitamin E (250mg), Vitamin C (900mg) und Zink (12mg) einen Einfluss auf Genomschädigungen in PBLs hat. Weitere Mikronährstoffe wurden mit einem FFQ erfasst. Im Vergleich zur Ausgangssituation war die MNI-Frequenz am Ende der Studie signifikant um 25% in der Supplementengruppe reduziert [Fenech et al., 2005].

Die MNI-Frequenz wurde in einer Studie bei Rauchern und Nichtrauchern nach einwöchiger Supplementation mit 1000mg Vitamin C und anschließender einwöchiger Supplementation von 1000mg Vitamin C gemeinsam mit 335mg Vitamin E untersucht. Raucher wiesen zum Ausgangszeitpunkt niedrigere Plasmakonzentrationen der beiden Antioxidantien sowie eine höhere MNI-Frequenz gegenüber den Nichtrauchern auf. Die MNI-Häufigkeit reduzierte sich signifikant in beiden Gruppen nach der Supplementation, wobei der Unterschied stärker bei den Rauchern ausgeprägt war [Thomas et al., 2011].

Die Vielzahl an Studien deutet darauf hin, dass die Kombination mehrerer Mikronährstoffen eine effiziente Reduktion von DNA-Schäden bzw. MNI bewirken kann als Mikronährstoffe im Einzelnen. Dabei ist zu beachten, dass dies besonders für einen adäquaten Folat- und Vitamin B12 -Status gilt [Thomas et al., 2011].

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Studiendesign

Diese Arbeit ist im Rahmen der Forschungsplattform „Active Ageing“ entstanden. Dabei handelt es sich um eine Studie zur Untersuchung der Auswirkungen von Krafttraining und Nahrungsergänzung auf die körperliche Leistungsfähigkeit von Senioren in Pensionistenwohnhäusern.

Die Ernährungssupplementation und die körperliche Aktivität sollen dabei die Auswirkungen der Sarkopenie minimieren. Dies soll zu einer gesteigerten Lebensqualität durch mehr Unabhängigkeit, geringere Gebrechlichkeit sowie verminderte Sturzhäufigkeit führen.

Die Interventionsstudie ist randomisiert, Beobachter-blind und kontrolliert. Die Probanden wurden vor der Teilnahme in 3 Gruppen eingeteilt: Trainingsgruppe, Trainings- und Ernährungsgruppe, sowie eine Gedächtnistrainingsgruppe.

Das Training wurde 6 Monate lang 2 Mal/Woche angeleitet durchgeführt, die nächsten 6 Monate wurde 1 Mal/Woche mit geschulten Trainern und 1 Mal/Woche selbstständig absolviert und weitere 6 Monate mussten die Probanden das Training komplett selbstständig durchführen.

Diese Arbeit ist eine Teilanalyse der Studie, bei allen 3 Gruppen wurde mit Hilfe des CBMN-Assays die Mikrokernfrequenz bestimmt, und zwar zu 3 verschiedenen Messpunkten, T1 (Beginn), T2 (nach 3 Monaten) und T3 (nach 6 Monaten).

3.1.1 Rekrutierung der Probanden

Die Pensionistenwohnhäuser wurden mit dem Kuratorium Wiener Pensionistenhäuser (KWP) ausgewählt. Mittels einer Informationsveranstaltung

informierte man die Bewohner ausführlich über den Studienablauf, fix teilnehmende Probanden wurden anschließend nochmals zusätzlich aufgeklärt. Um die Ein- und Ausschlusskriterien, wie z.B. das Vorliegen chronischer oder schwerer kardiovaskulärer Erkrankungen, zu überprüfen, vereinbarte man Einzeltermine mit allen Teilnehmern.

Insgesamt konnten 117 Probanden im Alter von 65 bis 93 Jahren von 5 verschiedenen Pensionistenwohnhäusern rekrutiert werden. Die Teilnehmer waren größtenteils weiblich, da in den Wohnhäusern ein durchschnittlicher Frauenanteil von knapp über 80 % verzeichnet wird.

3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien:

- Alter mindestens 65 Jahre
- Ausreichender geistiger Zustand (Mini-Mental-State > 23)
- Distanz von 10 m muss ohne Hilfsmittel zurückgelegt werden können
- Mindestens 4 Punkte bei der Short Physical Performance Battery (SPPB)

Ausschlusskriterien:

- Chronische Erkrankungen (Kontraindikation für eine medizinische Trainingstherapie)
- Schwere kardiovaskuläre Erkrankungen
- Manifeste Osteoporose
- Diabetische Retinopathie
- Antikoagulantia
- Medikation mit Antikoagulantia oder Cortison Präparaten

- Regelmäßiges Krafttraining (> 2x / Woche) in den letzten 6 Monaten vor Einschluss
- Trainingsgruppe: Teilnahme bei weniger als 70 % der möglichen Trainingseinheiten oder bei weniger als 3 Einheiten in den letzten beiden Wochen jeweils vor den Tests
- Training + Ernährungsgruppe: Einnahme von weniger als 5 Portionen / Woche über den Durchrechnungszeitraum oder weniger als 5 Portionen in jeweils der letzten 2 Wochen vor den Tests

Von allen Probanden wurden anthropometrische Daten, wie Größe, Gewicht und Körperzusammensetzung ermittelt, sowie Krafttests zur Überprüfung der körperlichen Leistungsfähigkeit durchgeführt.

Dazu zählen unter anderem der Chair-Sit & Reach Test zur Erfassung der Beweglichkeit, der Single Leg Balance Test zur Erhebung der Gleichgewichtsfähigkeit, der Chair-Rising Test zur Messung der dynamischen Kraftfähigkeit der Extremitäten, sowie der 6 min Walking Test zur Erfassung der aeroben Ausdauer.

3.2 Interventionsphase

Die erste Interventionsphase dauerte drei Monate und beinhaltete die Trainings- und Ernährungsintervention. Die Probanden, die alle Ein- und Ausschlusskriterien erfüllten, wurden randomisiert den Gruppen Training, Training und Ernährung oder der Gedächtnistrainingsgruppe (Kontrollgruppe) zugeordnet.

In der Gedächtnistrainingsgruppe wurde weder Krafttraining noch eine Ernährungsintervention durchgeführt, sondern kognitive Aufgaben gelöst, um den Sozialisierungsfaktor zu berücksichtigen.

Zu Beginn (T1) sowie nach drei (T2) und sechs (T3) Monaten der Interventionsphase fanden jeweils Blutabnahmen, immer morgens und nüchtern, statt.

3.2.1 Trainingsintervention

In der Trainingsgruppe wurde, angeleitet von Sportwissenschaftlern, zwei Mal pro Woche ein progressives Krafttraining absolviert, über die Dauer von sechs Monaten. In weiteren sechs Monaten mussten die Kraftübungen einmal pro Woche selbstständig, und einmal pro Woche unter Aufsicht durchgeführt werden.

Eine Trainingseinheit begann mit einem 10 minütigem Aufwärmen in Form eines Balancetrainings und Mobilisierungsübungen.

Der Hauptteil des Trainings bestand aus einem 30 minütigem Kraft- und Stabilisationstraining mit dem eigenem Körpergewicht und Übungen mit dem Theraband. Es wurden etwa 6-8 Übungen mit je 2 Sätzen zu 6 Muskelgruppen durchgeführt. Dabei besteht ein Satz aus 8-10 Wiederholungen bei einer Intensität von 60-80% des One Repetition Maximums (1 RM). Konnten die Probanden beim letzten Satz mehr als 12 Wiederholungen durchführen, wurde die Intensität erhöht, im Sinne des progressiven Krafttrainings.

Am Ende der Einheit erfolgte ein 10 minütiges Abwärmen mit Entspannung.

Insgesamt dauerte eine Trainingseinheit etwa 50-60 Minuten.

3.2.2 Ernährungsintervention

Die zweite Interventionsgruppe, Training und Ernährung, nahm zusätzlich zum Krafttraining die Nahrungsergänzung „FortiFit“.

Das Produkt zeichnet sich durch einen hohen Gehalt an essentiellen Aminosäuren, insbesondere Leucin aus, die wichtige Faktoren in der

Muskelproteinsynthese darstellen. Damit soll in weiterer Folge Sarkopenie vorgebeugt bzw. entgegengewirkt werden.

Außerdem ist in FortiFit eine dem Alter empfohlene Menge an Vitamin D (20mg/Portion) zur Unterstützung der Muskelfunktion, sowie Antioxidantien, Magnesium, Vitamin B6 & B12 und Folsäure enthalten.

FortiFit ist in Pulverform verpackt und sechs Messlöffel davon werden in 125 ml Wasser aufgelöst. Die Zubereitung erfolgte von den Heimbetreuern, die Probanden tranken die Mischung täglich zum Frühstück sowie zwei Mal pro Woche nach dem Krafttraining.

Zusammensetzung	FortiFit/150ml (1 Portion)
Energie	150 kcal
Eiweiß	20,7 g
Molkenprotein	19,7 g
Leucin	3 g
Essentielle Aminosäuren	>10 g
Kohlenhydrate	9,3 g
Fett	3 g
Ballaststoffe	1,2 g
Vitamin D	20 mg

Tab. 1: Zusammensetzung von 1 Portion FortiFit [modifiziert nach www.nutricia.at, 2013]

3.3 Der CBMN-Assay (in Zusammenarbeit mit Karn Geider)

3.3.1 Verwendete Materialien

- 50 ml Zentrifugenröhrchen
- 15 ml Zentrifugenröhrchen
- Spritzen
- sterile Filter
- elektronische Pipettierhilfe
- Pasteurpipetten
- Glaspipetten
- 5 ml Falcon-Röhrchen
- 12 ml Leucosept-Röhrchen
- Countess cell-counting chamber slides
- Cups
- Objektträger
- Deckgläser

3.2.2 Verwendete Chemikalien

- RPMI 1640 steril
- L-Glutamin steril
- Fetal Bovine Serum (FBS)
- Dulbeccos Phosphate buffered saline steril (PBS)
- Sodium–L–Pyruvat steril
- Cytochalasin B
- Phytohaemagglutinin (PHA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO)
- Trypanblau
- Diff Quick
- Diff Quick I

- Diff Quick II
- Entellan

3.3.4 Probenaufbereitung:

TAG 1:

Zu Beginn erfolgt die Herstellung des Mediums. Dafür werden die benötigten Reagenzien zuerst im Wasserbad erwärmt bzw. aufgetaut und DNA mit einer Pipette vereint. Die Zusammensetzung des Mediums ist wie folgt: 30 ml RPMI, 3,3 ml FBS, 330 µl Sodium-L-pyruvat sowie 330 µl L-Glutamin.

Lymphozytenisolierung:

Die Lymphozytenisolierung wird im Abzug unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Zuerst überführt man das Vollblut mit Hilfe von sterilen Pasteurpipetten in je ein Zentrifugenröhrchen. Dabei werden je zwei Proben (jeweils ca. 7 ml) in ein Röhrchen vermengt.

Danach werden die Proben 15 Minuten lang bei 16 °C und 2400 rpm ohne Bremse zentrifugiert.

Nun können die Lymphozyten abgetrennt werden, was wiederum mit Pasteurpipetten durchgeführt wird. Die Lymphozyten werden dabei in Proberöhrchen überführt, die anschließend bis zur 15 ml Marke mit PBS aufgefüllt werden. Durch die PBS Zugabe werden die Lymphozyten gewaschen und gereinigt.

Ab jetzt wird auf Eis gearbeitet, da die Lymphozyten sehr empfindlich sind und ansonsten schnell zerstört werden würden.

Es folgt ein weiterer 15 minütiger Zentrifugierschritt bei 1300 rpm, 4 °C und ab jetzt immer mit Bremse.

Danach wird der Überstand abgesaugt, sodass nur noch das Pellet übrig bleibt. Danach löst man dieses in 1 ml PBS und füllt bis zur 10 ml Marke auf.

Es wird nochmals 10 Minuten zentrifugiert, bei 1300 rpm und 4 °C. Der Überstand wird wiederum abgesaugt.

Danach resuspendiert man die Zellen in 1 ml PBS und löst das Pellet mit Hilfe von leichtem klopfen. 2 Probandenröhrchen werden nun nach vorherigem Schwenken mit Hilfe einer Pipette vereint.

Bestimmung der Zellzahl:

20 µl der Zellsuspension wird in je einem Cup mit 40 µl PBS vermischt. Dabei wird die Spitze eingetaucht und einmal gespült.

Davon werden in einem weiteren Cup 10 µl der verdünnten Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau vermengt. Man befüllt damit die Neubauer-Zählkammer der Countess und liest die Anzahl der lebenden Zellen pro Milliliter ab.

Mit Hilfe des Excel-Programms kann die benötigte Menge der Zellsuspension und des Mediums berechnet werden.

Die Zellsuspension wird nun nochmals 10 Minuten bei 1300 rpm und 22 °C zentrifugiert. Danach wird der Überstand abgesaugt und mit Medium (1880 ml) aufgefüllt.

Inkubation:

Die Falconröhrchen werden im Doppelansatz laut Excel-Berechnung mit der jeweiligen Menge an Zellsuspension und Medium befüllt. Danach werden je 15 µl PHA zugegeben, um die mitotische Zellteilung zu stimulieren.

Da der Platz in der Zentrifuge begrenzt ist, werden nur 3 Proben auf einmal mit PHA versetzt.

Nach einer 20 minütigen Pause erfolgt die Zugabe bei den nächsten 3 Proben, die in der Zwischenzeit verschlossen und mit Alufolie abgedeckt im Abzug stehen gelassen werden.

Die mit PHA versetzten Falcons werden bei 37°C, 5% CO₂ für genau 44 Stunden lang inkubiert.

TAG 2:

Die benötigten Reagenzien Cytochalasin B und RPMI werden im Wasserbad aufgetaut bzw. erwärmt.

In einem Mediumröhrchen vermengt man 180 µl Cytochalasin B mit 1620 µl RPMI, sodass man eine 1:10 Verdünnung des Cytochalasin B erhält.

Von jedem Falconröhrchen werden mit Hilfe einer Pipette genau 56,2 µl vom Überstand entfernt und anschließend 56,2 µl der Cytochalasin B / RPMI-Mischung zugeben. Die Pipettenspitze wird dabei nur im Überstand gespült. Durch das Cytochalasin B wird die Zellteilung gestoppt. Die Falcons werden nochmals für weiterd 28 Stunden bei 37 °C inkubiert.

TAG 3:

Nach insgesamt 72 Stunden Inkubationszeit erfolgt das Auftragen der Zellen auf die Objektträger. Dabei wird im Doppelansatz und nicht mehr unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

Zentrifugieren im Cytospin:

Zuerst werden die Objektträger vorbereitet. Dafür befestigt man Filterpapier und Trichter in Klammern, die dann der Reihe nach im Cytospin eingeordnet werden.

Von der Zellsuspension entfernt man 200 µl vom Überstand und gibt 46 µl DMSO hinzu, das durch leichtes Klopfen mit der Zellsuspension vermischt wird. Davon werden 120 µl in die Öffnung des Trichters pipetiert. Nach 5 minütigem Zentrifugieren bei 600 rpm werden die Objektträger 10 Minuten getrocknet. Diese Zeit darf nicht überschritten werden da sonst die Morphologie der Zellen verändert wird, was das spätere Auszählen erheblich erschwert.

Färben der Objektträger:

Zuerst werden die Wannen zur Färbung vorbereitet, dazu gießt man Diff-Quick Fix, Diff-Quick I und Diff-Quick II in je eine Glaswanne. Bei Diff-Quick Fix handelt es sich um Ethanol, darum muss dies stets zugedeckt werden.

Die Objektträger werden in die Färbekammer Rücken an Rücken geschichtet, dabei finden bis zu zwölf Objektträger Platz.

Man taucht die befüllte Färbekammer für 10 Minuten in Diff-Quick Fix, danach 10 Mal in Diff-Quick I und 8 Mal in Diff-Quick II.

Anschließend werden die Objektträger kurz mit Leitungswasser, dann mit bidestiliertem Wasser abgespült und zum Trocknen 10 bis 15 Minuten auf Papier gelegt.

Die Färbung wird mit Hilfe des Mikroskops kontrolliert, im gegebenen Fall muss nochmals mit Diff-Quick I und Diff-Quick II nachgefärbt werden.

Die Objektträger werden nach einer kurzen Trocknungszeit mit Deckgläsern verschlossen, um die Lymphozyten haltbar zu machen.

Dazu tropft man Entellan auf den Objektträger neben den Spot und verschließt diesen mit einem Deckglas.

Über Nacht werden die Objektträger getrocknet und bis zum späteren Auszählen in Boxen geordnet.

3.3.4 Zählkriterien

Die Zählkriterien wurden anhand der Literatur von M. Fenech (2007) und in Absprache mit unseren Kollegen Klemens Krejci und Heidemarie Peherstorfer, die den CBMN-Assay zum Zeitpunkt T1 und T2 durchgeführt haben, bestimmt.

Es werden Ein-, Zwei- und Mehrkernzellen gezählt, des weiteren MNi, NBUDs, NPBs zur Bestimmung der DNA-Schäden sowie Apoptosen und Nekrosen.

Um gezählt zu werden, müssen die Kerne aller Ein-, Zwei- und Mehrkernzellen eine schöne Morphologie aufweisen und vollständig mit einem intakten Zytoplasma umschlossen sein.

Ein Proband wurde auf jeweils 4 Objektträger aufgeteilt, pro Objektträger wurden 500 Zweikernzellen gezählt.

Folgende Parameter wurden bis 250 Zweikernzellen gezählt:

- Einkernzellen
- Mehrkernzellen
- Nekrosen
- Apoptosen

Folgende Parameter wurden bis 500 Zweikernzellen gezählt:

- BNCs mit MNi
- MNi insgesamt in der BNC
- BNCs mit NBUDs
- BNCs mit NPBs

Laut Literatur von M. Fenech (2007) sind folgende Zählkriterien für den CBMN-Assay zu berücksichtigen:

3.3.4.1 Zweikernzellen (BNCs)

BNCs sind Zellen mit zwei Zellkernen. Die Kernmembran ist intakt und die Kerne liegen innerhalb des Cytoplasmas.

Die Zellkerne müssen eine normale Morphologie, also etwa die gleiche Farbe, Größe und Farbintensität aufweisen.

Die Kerne dürfen sich nicht überlappen, sollte dies doch der Fall sein, müssen die zwei Kerne trotzdem klar erkennbar voneinander abgegrenzt sein.

Die cytoplasmatische Membran der Zweikernzellen muss klar von benachbarten Zellen abgegrenzt und unterscheidbar sein.

3.3.4.2 Mikrokerne (MNi)

Der Durchmesser der Mikrokerne muss mindestens $1/16$ und maximal $1/3$ des Durchmessers der Hauptkerne betragen.

Mikrokerne müssen die gleiche Farbintensität wie auch die Zellkerne aufweisen, eventuell kann die Färbung etwas stärker ausgeprägt sein.

MNi liegen innerhalb des Cytoplasmas und sind nicht mit den Zellkernen verbunden.

Die Grenze der Mikrokerne muss klar erkennbar sein, eine Überlappung darf nicht gegeben sein. MNi sind weder verbunden noch verknüpft mit den Zellkernen.

Mikrokerne sind rund oder oval und klar unterscheidbar von gefärbten Partikeln, da sie keine Lichtbrechung aufweisen.

MNi sind nicht verknüpft oder verbunden mit dem Hauptkern, sie können jedoch den Hauptkern berühren.

3.3.4.3 Buds (NBUDs)

NBUDs sind direkt mit dem Zellkern über Brücken verbunden. Diese Brücken sind meist etwas schmaler als der Durchmesser des Bud, können aber auch sehr dünn sein.

Es ist auch möglich, dass NBUDs direkt benachbart zum Hauptkern innerhalb einer Vakuole zu finden sind.

Bezüglich der Färbung besitzen Buds die gleiche Intensität wie Mikrokerne.

3.3.4.4 Brücken (NPBs)

NPBs verbinden die Hauptkerne einer Zweikernzelle miteinander. Eine Brücke kann unterschiedlich dick sein, in der Regel ist sie jedoch maximal so breit wie etwa ein 1/4 des Durchmessers der Zellkerne einer BNC.

Farblich sind NPBs gleich den Hauptkernen. Kommen innerhalb einer Zelle mehrere Brücken vor, so wird trotzdem nur eine NPB gezählt.

3.3.4.5 Nekrosen

Nekrosen sind eine Form des Zelltodes und dadurch gekennzeichnet, dass die Membran des Cytoplasmas nicht mehr intakt ist.

In der frühen Phase erscheint das Cytoplasma hell und es sind zahlreiche Vakuolen zu beobachten. Diese Vakuolen finden sich meist im Cytoplasma, können jedoch auch unter Umständen im Zellkern vorkommen.

Handelt es sich um Nekrosen in der späteren Phase, so ist ein Verlust des Cytoplasmas zu beobachten. Die Kernmembran ist außerdem beschädigt und die Kernstruktur nicht mehr voll intakt.

In beiden Fällen weisen Cytoplasma und Zellkern bei nekrotischen Zellen eine geringere Farbintensität auf als bei lebenden Zellen.

3.3.4.6 Apoptosen

Apoptosen entstehen im Rahmen des programmierten Zelltodes.

Bei der frühen Phase der Apoptose ist eine Chromatin-Kondensation innerhalb des Zellkerns zu beobachten. Die Membran von Zellkern als auch von Cytoplasma ist intakt.

Handelt es sich um Apoptosen in der späteren Phase, so kommt es zu einer Kernfragmentierung. Sowohl Cytoplasma als auch dessen Membran sind intakt. Der Zellkern, die Kernfragmente und das Cytoplasma sind intensiver gefärbt und so gut erkennbar.

3.3.5 Vereinbarte Punkte der Auszählung (in Absprache mit Klemens Krejci und Heidemarie Peherstorfer):

Wenn nicht sicher ist, ob es sich um einen NBUD oder aber MN handelt, wird ein MN gezählt.

Ein MN muss eine runde oder ovale Form haben. Er wird nur gezählt, wenn die Farbintensität gleich der Hauptkerne oder etwas dunkler ist. Hellere Kerne werden nicht beachtet.

Befindet sich ein Mikrokern genau zwischen zwei Zellkernen einer BNC, so muss darauf geachtet werden, diesen nicht mit einer NPB zu verwechseln.

Der mittlere Durchmesser einer Zweikernzelle wird von der kurzen Seite der BNC gemessen.

Sind innerhalb einer BNC mehr als ein NBUD vorhanden, so wird dennoch nur einer gezählt.

NBUDs müssen eine deutliche Abschnürung haben, die Verbindung zum Zellkern muss also etwas dünner als der BUD selbst sein.

Wenn mehrere NPBs in einer Zweikernzelle auftauchen, so wird nur eine NPB gezählt.

Berühren sich die Kerne einer BNC und ist die Brücke dadurch nicht eindeutig erkennbar, so wird diese nicht mitgezählt.

Bei Apoptosen gilt, dass jene mit hellem Cytoplasma nicht als solche gewertet werden.

Handelt es sich um eine frühe Phase der Apoptose, so muss ein Kern mit hellen Vakuolen zu erkennen sein, und es muss eine deutliche beginnende Auflösung vorhanden sein.

Bezüglich Nekrosen gilt, dass diese nicht gezählt wird, sollte nur mehr das Zellkernmaterial zu erkennen sein.

Das Cytoplasma einer Nekrose muss rosa oder hellblau sein, eventuell sind Vakuolen vorhanden.

Im Zweifelsfall, ob eine Nekrose oder Apoptose vorhanden ist, wird eine Nekrose gezählt.

3.4 Datenauswertungen

Die Studienergebnisse wurden statistisch mit dem Statistikprogramm SPSS 19.0 ausgewertet.

Zu Beginn erfolgte die Prüfung auf Normalverteilung anhand des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest. Da sowohl viele normalverteilte als auch nicht normalverteilte Daten vorhanden waren, wurden alle Daten anhand des nichtparametrischen Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben durchgeführt. Neben der deskriptiven Statistik wurden die Mittelwertunterschiede jedes einzelnen Parameters zwischen den Untersuchungszeitpunkten T1 und T2, T2 und T3 sowie T1 und T3 untersucht, in Abhängigkeit der Interventions- sowie nach Altersgruppen. Des Weiteren wurde die Korrelation zwischen den genotoxischen Parametern und Geschlecht, Alter sowie Gruppe nach Pearson berechnet.

Es gilt ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$.

4. ERGEBNISSE

4.1 Deskriptive Statistik

Es wurden Daten von insgesamt 99 Teilnehmern, 12 männliche und 87 weibliche, ausgewertet.

Die Verteilung der Probanden nach Interventions- und Altersgruppe ist in folgender Tabelle zusammengefasst:

Altersgruppe	Häufigkeit	Gruppe Training	Gruppe Training & Ernährung	Gedächtnis- trainingsgruppe
1 (65-74 Jahre)	12	4	5	3
2 (75-84 Jahre)	40	18	9	13
3 (>85 Jahre)	47	14	16	17
Gesamt	99	36	30	33

Tab. 2: Verteilung der Probanden nach Alters- und Interventionsgruppe

4.2 Mittelwertunterschiede und Korrelationen zum Zeitpunkt T1

4.2.1 Mittelwertunterschiede von Zweikernzellen mit MNi und MNi total in Abhängigkeit vom Geschlecht

Keiner der untersuchten Parameter, ausschließlich der Gesamtzellzahl ($p=0,020$), unterscheiden sich signifikant zwischen den Geschlechtern. Dennoch ist eine höhere Mikrokernanzahl, sowohl in Zweikernzellen als auch im Gesamten, bei Frauen vorzufinden, auch wenn die Anzahl der teilgenommenen Männer ($N=12$) der der Frauen ($N=87$) deutlich geringer war.

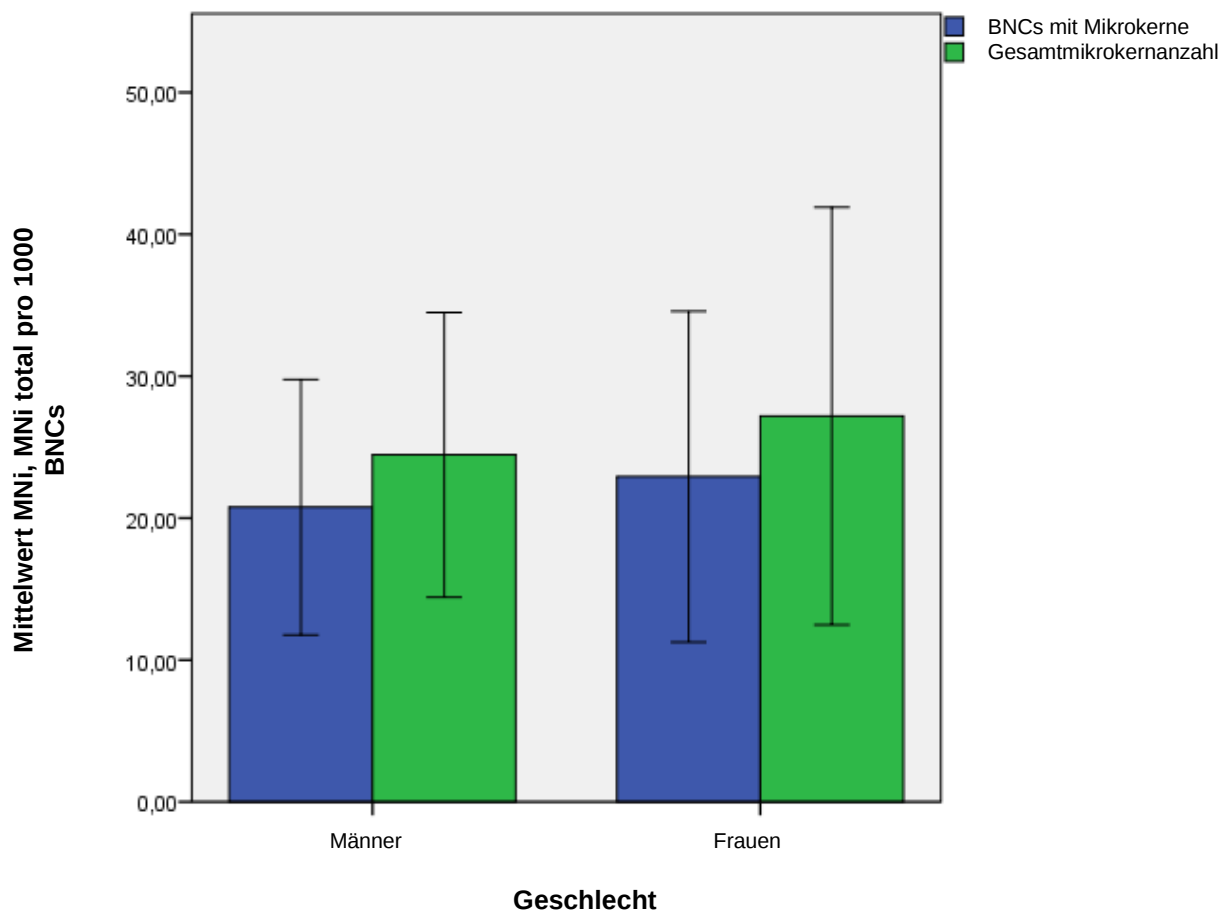


Abb. 9: Mittelwertunterschiede von BNC mit MNi und gesamter MNi-Häufigkeit nach Geschlecht

4.2.2 Korrelation Alter und Mikrokernfrequenz

Wojda et al. (2007) beschrieben in ihrer Studie eine Zunahme der Mikrokernfrequenz bis zum 60. Lebensjahr und eine leichte Abnahme dieser zwischen dem 70. und 110. Lebensjahr (siehe Kap. 2.3). Wir untersuchten, ob letzterer Trend auch zu Beginn (T1) der Active-Ageing Studie zu beobachten war. Es konnte jedoch kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter und der Mikrokernhäufigkeit festgestellt werden.

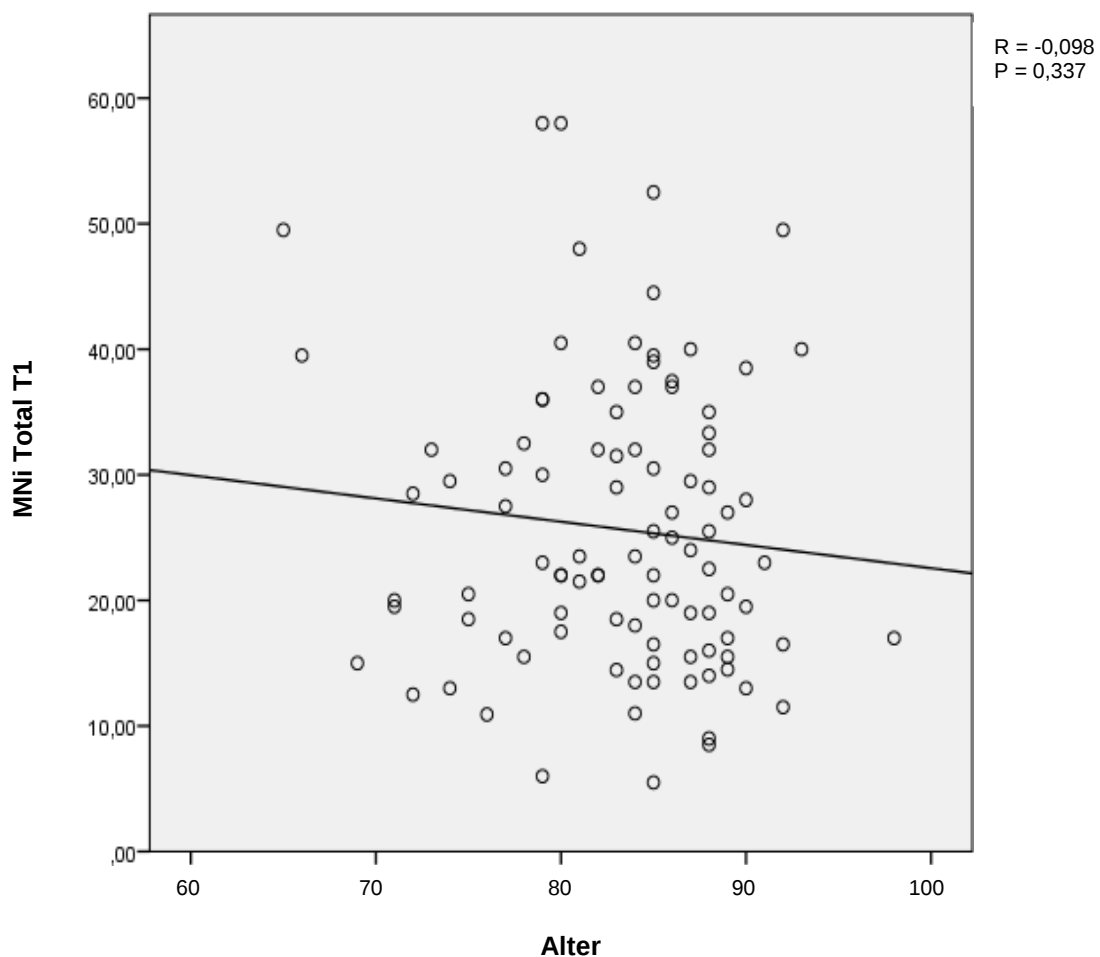


Abb. 10: Korrelation von Alter und gesamter Mikrokernfrequenz zum Zeitpunkt T1

4.2.3 Korrelation Alter mit Apoptosen, Nekrosen, NPBs und NBUDs

Ebenso wurde eine mögliche Korrelation zwischen dem Alter und den restlichen genotoxischen Biomarkern (Apoptosen, Nekrosen, NPBs und NBUDs) getestet. Auch hier konnte keinerlei signifikante Korrelation beobachtet werden. Die Grafiken der NPBs und NBUDs werden nicht abgebildet.

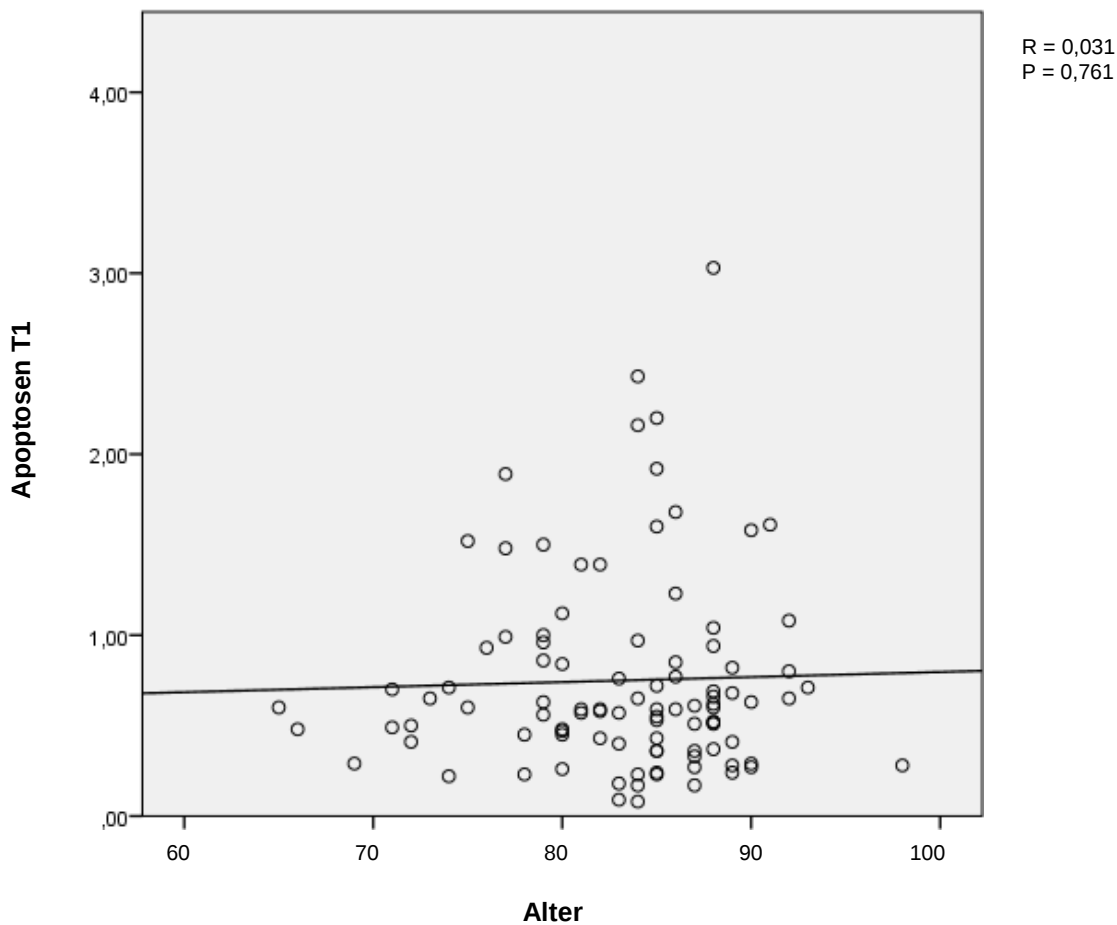


Abb. 11: Korrelation von Alter und Apoptosen zum Zeitpunkt T1

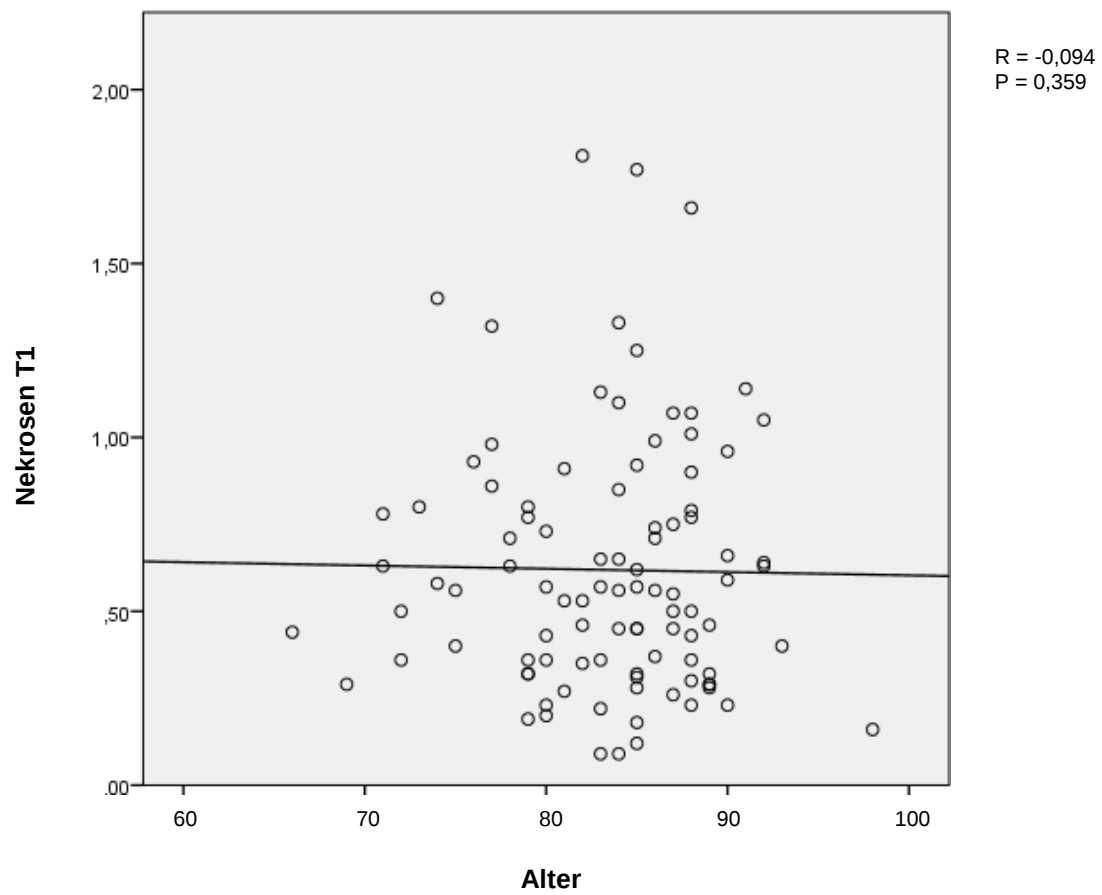


Abb. 12: Korrelation von Alter und Nekrosen zum Zeitpunkt T1

4.3 Vergleich der Mittelwertunterschiede zu den Zeitpunkten T1, T2 und T3 in Abhängigkeit von den Studiengruppen

In dieser Arbeit werden die Ergebnisse der Gruppe Training und Ernährung sowie die der Gedächtnistrainingsgruppe untersucht. Meine Kollegin Karin Geider behandelt in ihrer Arbeit die Ergebnisse der Gruppe Training.

4.3.1 Gruppe Training und Ernährung

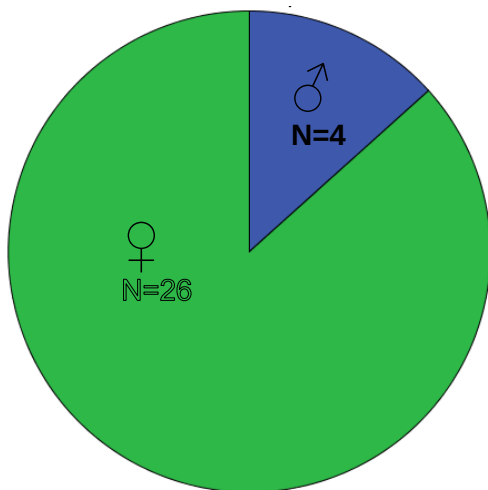


Abb. 13: Geschlechterverteilung, Gruppe Training & Ernährung

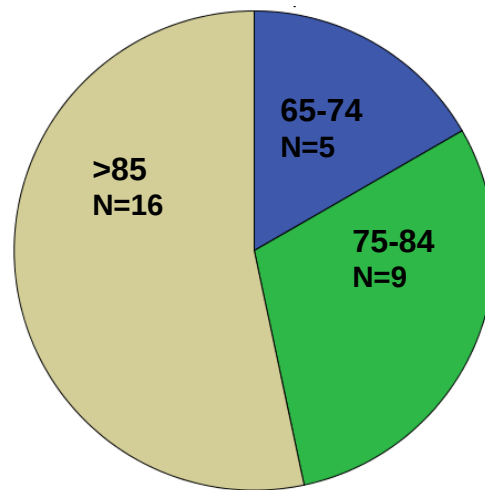


Abb. 14: Altersverteilung, Gruppe Training & Ernährung

Zum Zeitpunkt T1 konnten Daten von 29, zum Zeitpunkt T2 27 und zum Zeitpunkt T3 14 Probanden in der Trainings- und Ernährungsgruppe ausgewertet werden.

Vergleich der Mittelwertunterschiede von T1 zu T2

Signifikant nahmen Apoptosen ($p=0,022$) sowie NPBs ab ($p=0,042$). Nicht signifikante Verringerungen verzeichneten die Gesamtzellzahl Nekrosen,

Zweikernzellen mit MNi, Gesamtmikrokerne und NBUDs. Der NDI und NDCI zeigten keine Veränderungen.

Vergleich der Mittelwertunterschiede von T2 zu T3

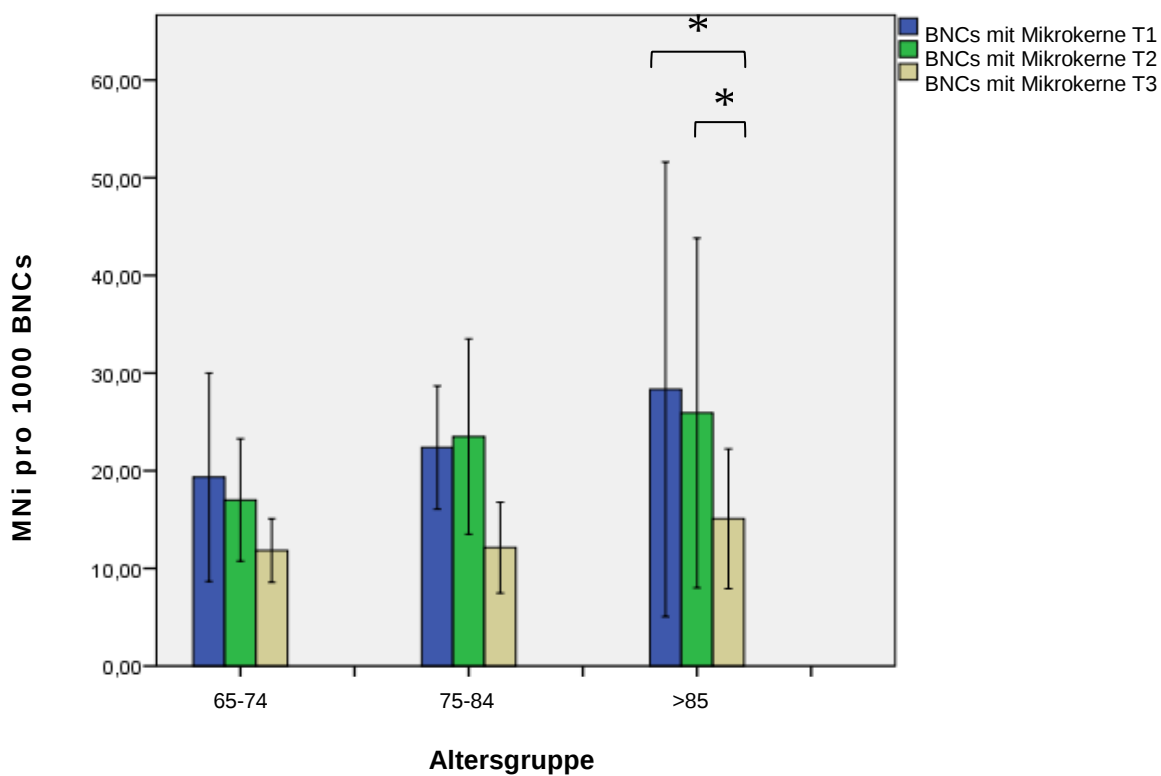
Zweikernzellen mit MNi sowie Gesamtmikrokerne nahmen signifikant ab ($p=0,011$ bzw. $p=0,023$). Eine leichte, nicht signifikante Abnahme gab es bei der Gesamtzellzahl, Nekrosen, NPBs und NBUDs. NDI und NDCI änderten sich kaum. Apoptosen verzeichneten einen geringen, nicht signifikanten Anstieg.

Vergleich der Mittelwertunterschiede von T1 zu T3

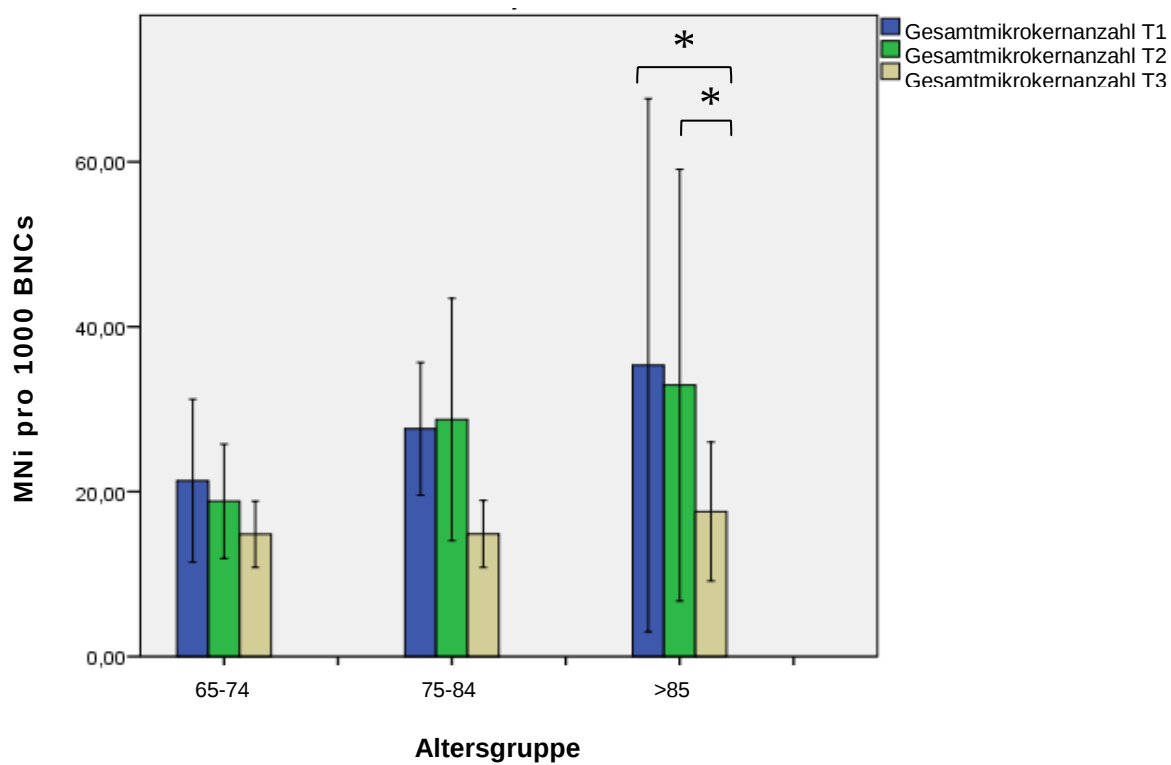
Nach sechsmonatiger Intervention kam es zu einer signifikanten Reduktion von Apoptosen ($p=0,022$), Zweikernzellen mit MNi ($p=0,003$), Gesamtmikrokerne ($p=0,003$), NPBs ($p=0,011$) und NBUDs ($p=0,033$). Eine nicht signifikante Verringerung war bei der Gesamtzellzahl und den Nekrosen zu verzeichnen.

Vergleich der Zweikernzellen mit MNi und Gesamtmikrokerne in den Altersgruppen zwischen den Zeitpunkten T1, T2 und T3

In allen Altersgruppen reduzierte sich die Anzahl an BNCs mit MNi sowie Gesamtmikrokerne zwischen T1 und T3. Lediglich in der Altersgruppe der 75 bis 84 Jährigen nahm die Anzahl der Zweikernzellen signifikant zwischen T2 und T3 ($p=0,043$) sowie zwischen T1 und T3 ($p=0,046$) ab. Ebenso verringerten sich die Gesamtmikrokerne in dieser Altersgruppe zwischen T2 und T3 sowie zwischen T1 und T3 signifikant (jeweils $p=0,046$).



**Abb. 15: Vergleich der BNCs mit MNI in Abhängigkeit der Altersgruppen
(Gruppe Training & Ernährung)**



**Abb. 16: Vergleich der Gesamtmikrokerne in Abhängigkeit der Altersgruppen
(Gruppe Training & Ernährung)**

4.3.2 Gedächtnistrainingsgruppe

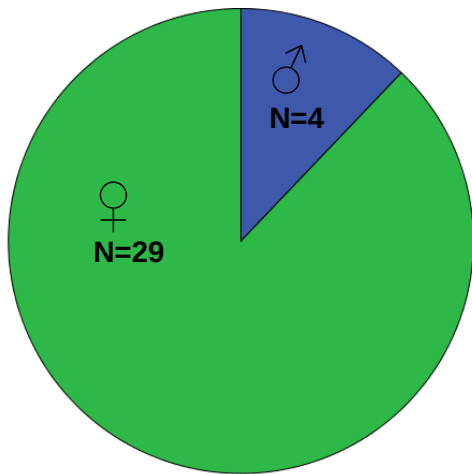


Abb. 17: Geschlechterverteilung, Gedächtnistrainingsgruppe

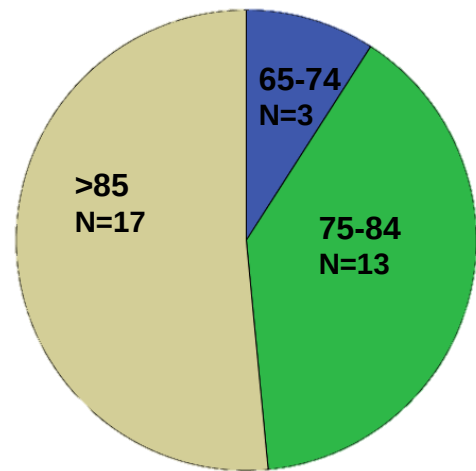


Abb. 18 : Altersverteilung, Gedächtnistrainingsgruppe

Zum Zeitpunkt T1 konnten Daten von 32, zum Zeitpunkt T2 22 und zum Zeitpunkt T3 16 Probanden in der Gedächtnistrainingsgruppe ausgewertet werden.

Vergleich der Mittelwertunterschiede von T1 zu T2

Alle Parameter nahmen nach dreimonatiger Intervention leicht ab, eine signifikante Reduktion wurde bei den NPBs erreicht ($p=0,041$).

Vergleich der Mittelwertunterschiede von T2 zu T3

Die Gesamtzellzahl, Nekrosen und NPBs nahmen leicht ab, signifikant verringerten sich die Apoptosen ($p=0,008$) und NBUDs (0,050). Die Anzahl der Zweikernzellen mit MNi sowie Gesamtmikrokerne stiegen gering an.

Vergleich der Mittelwertunterschiede von T1 zu T3

Nach sechs Monaten war insgesamt eine signifikante Reduktion bei der Gesamtzellzahl, den Apoptosen, NPBs und NBUDs zu erkennen. Nicht signifikant nahmen jedoch auch Nekrosen, Zweikernzellen mit MNi sowie Gesamtmikrokerne ab. Der NDI und NDCI änderte sich zu allen Zeitpunkten nicht in nennenswertem Ausmaß.

Vergleich der Zweikernzellen mit MNi und Gesamtmikrokerne in den Altersgruppen zwischen den Zeitpunkten T1, T2 und T3

In der Gedächtnistrainingsgruppe liegt keine große Veränderung der Mikrokernanzahl vor.

In der Altersgruppe der 75 bis 84 Jährigen sinken die BNCs mit MNi sowie die Gesamtmikrokerne von T1 zu T2, steigen jedoch wieder zum Zeitpunkt T3 in Richtung Ausgangswert an.

Die Anzahl der BNCs mit MNi sinkt signifikant ($p=0,045$) bis zum Zeitpunkt T2 in der Altersgruppe >85 Jahre. Zum Zeitpunkt T3 ist die Anzahl der BNCs mit MNi wieder leicht angestiegen. Die Anzahl der Gesamtmikrokerne veränderte sich nicht signifikant.

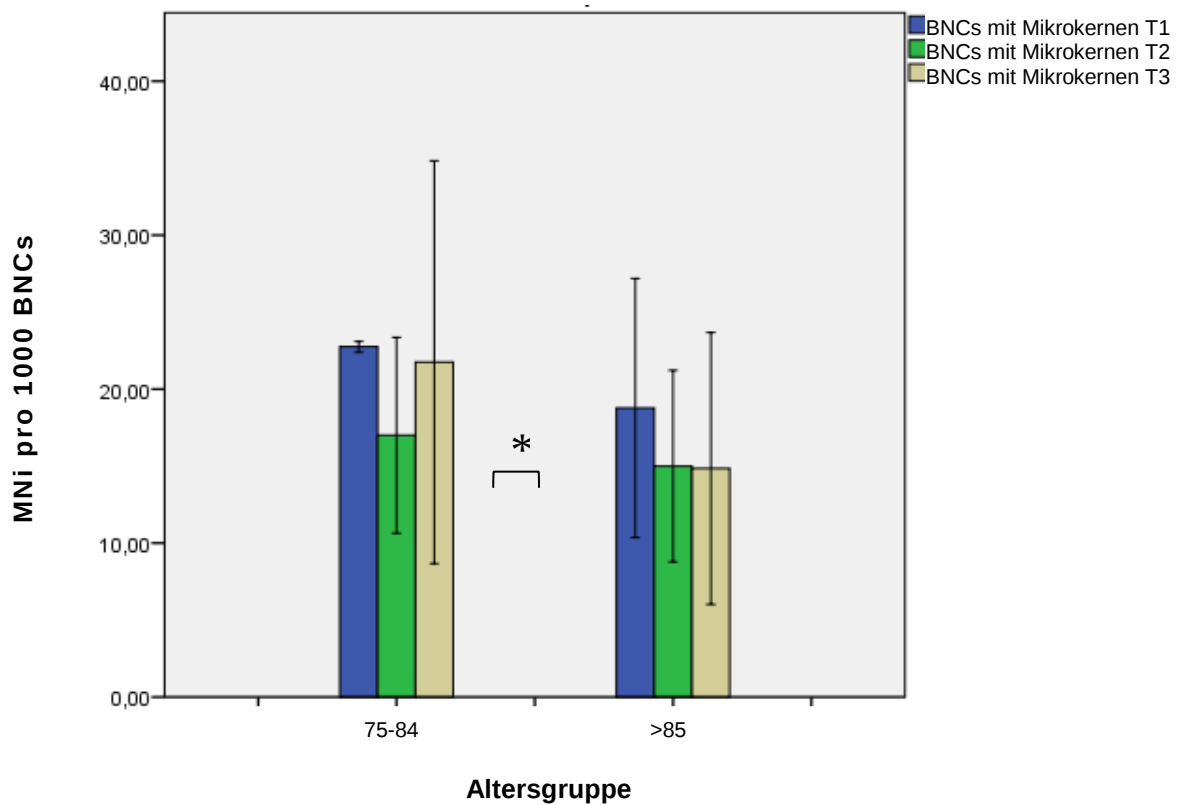


Abb. 19 : Vergleich der BNCs mit MNi in Abhängigkeit der Altersgruppen (Gedächtnistrainingsgruppe)

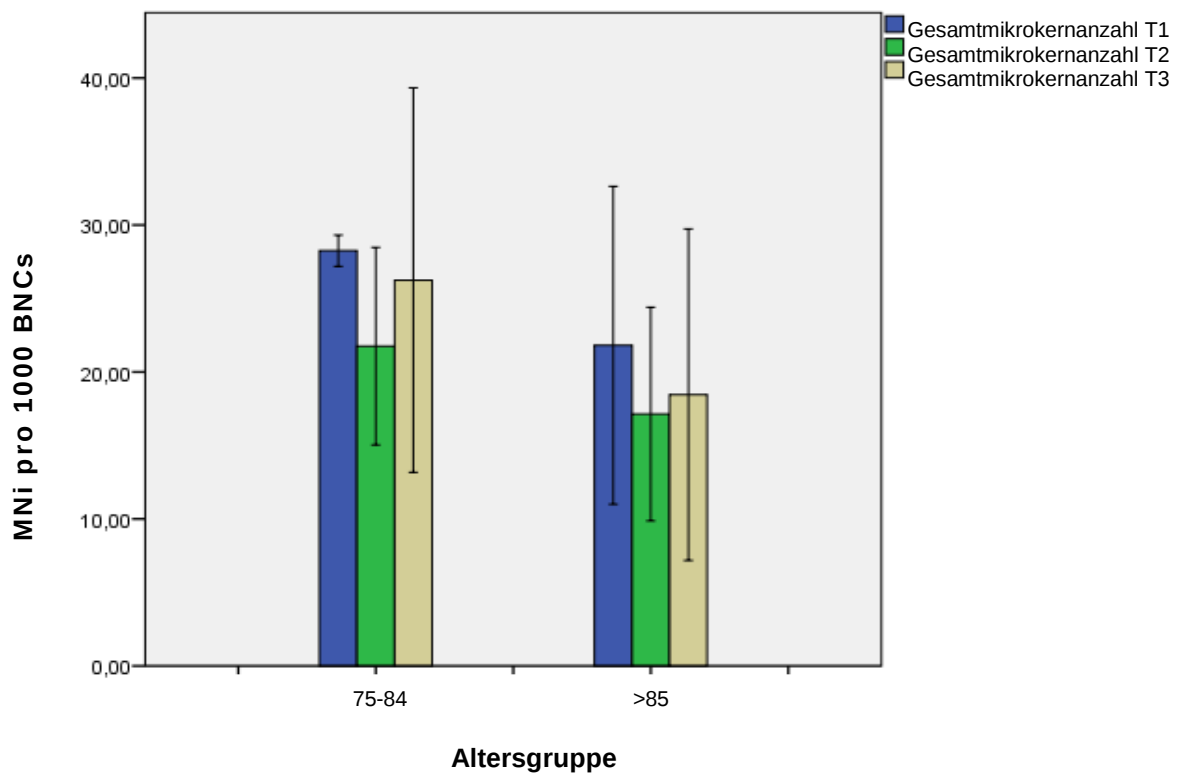


Abb. 20: Vergleich der Gesamtmikrokerne in Abhängigkeit der Altersgruppen (Gedächtnistrainingsgruppe)

4.3.3 Übersicht Mittelwerte und Signifikanzen der Parameter in Abhängigkeit von den Studiengruppen zwischen T1 und T3

		Training & Ernährung			Gedächtnistraining		
		<i>MW</i>	<i>S</i>	<i>p</i>	<i>MW</i>	<i>S</i>	<i>p</i>
Gesamtzellzahl	T1	588,66	55,71	0,056	598,90	53,71	0,006
	T3	573,89	27,85		545,75	41,41	
Apoptose	T1	0,69	0,36	0,022	0,68	0,52	0,003
	T3	0,53	0,25		0,38	0,20	
Nekrose	T1	0,65	0,35	0,064	0,57	0,40	0,691
	T3	0,51	0,27		0,51	0,29	
NDI	T1	1,99	0,06	0,162	1,99	0,07	0,777
	T3	2,00	0,04		2,00	0,03	
NDCI	T1	1,97	0,06	0,109	1,97	0,07	0,571
	T3	1,99	0,04		1,99	0,03	
BNC+ MNI	T1	22,16	13,14	0,003	21,53	9,17	0,140
	T3	13,32	5,37		17,33	9,78	
MNI total	T1	26,66	17,05	0,003	25,52	11,07	0,393
	T3	15,82	6,05		21,78	13,26	
NPBs	T1	0,88	0,89	0,011	1,25	1,05	0,005
	T3	0,25	0,43		0,39	0,50	
NBUDs	T1	3,34	2,62	0,033	4,29	4,63	0,044
	T3	2,11	1,53		1,79	1,20	

Tab. 3: Mittelwertunterschiede der Parameter des CBMN Assays in Abhängigkeit der Studiengruppe nach sechsmonatiger Intervention (von T1 zu T3); *MW* = Mittelwert, *s* = Standardabweichung ($\pm$), *p* = Signifikanz, signifikante Werte ($p \leq 0,05$) fett markiert

4.4 Vergleiche zwischen den Gruppen Training, Training & Ernährung und Gedächtnistrainingsgruppe

4.4.1 BNCs mit Mikrokernen und Gesamtmikrokernanzahl

In der Trainingsgruppe reduzierte sich die Anzahl der BNCs mit Mikrokernen sowie der Gesamtmikrokerne kontinuierlich von T1 zu T2 und zu T3. Signifikant war die Reduktion von T1 zu T3.

Eine signifikante Verringerung der beiden Parameter verzeichnete die Gruppe Training und Ernährung zwischen T2 und T3 sowie zwischen T1 und T3.

In der Kontrollgruppe reduzierten sich ebenfalls leicht die Anzahl der BNCs mit Mikrokernen sowie die der Gesamtmikrokerne, jedoch nicht signifikant.

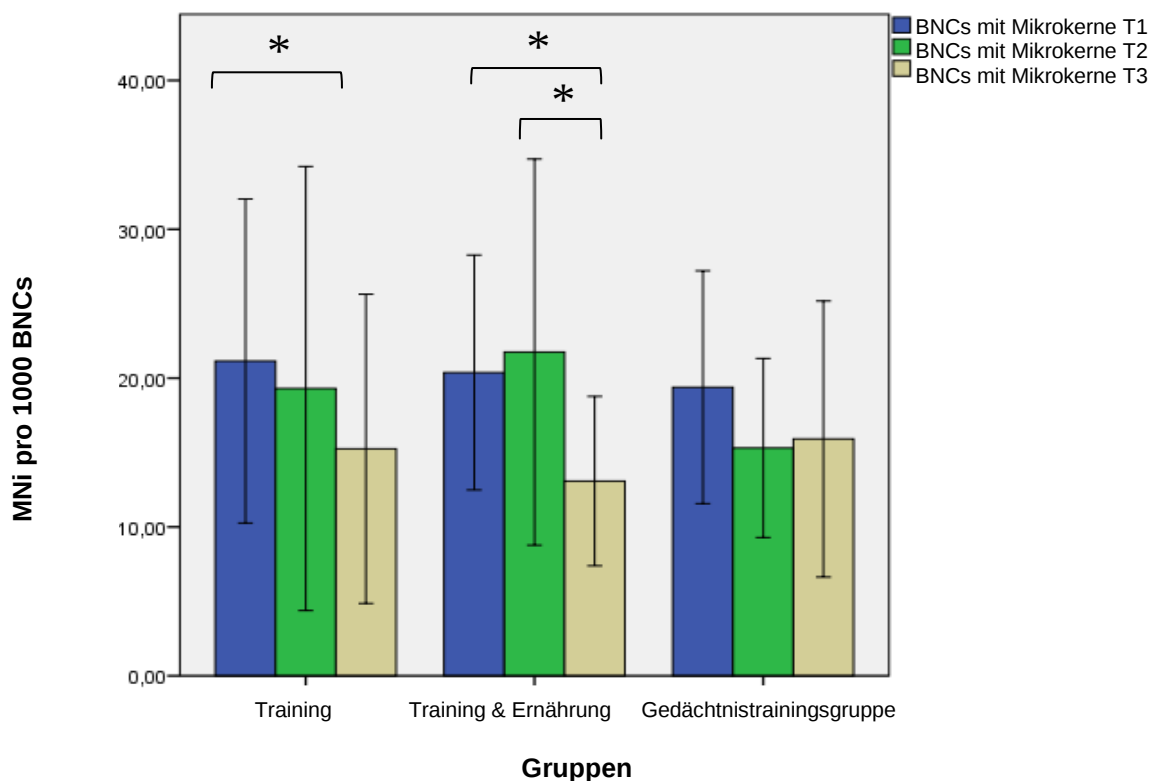


Abb. 21: Gruppenvergleich der BNCs mit Mikrokernen, $p^* \leq 0,05$

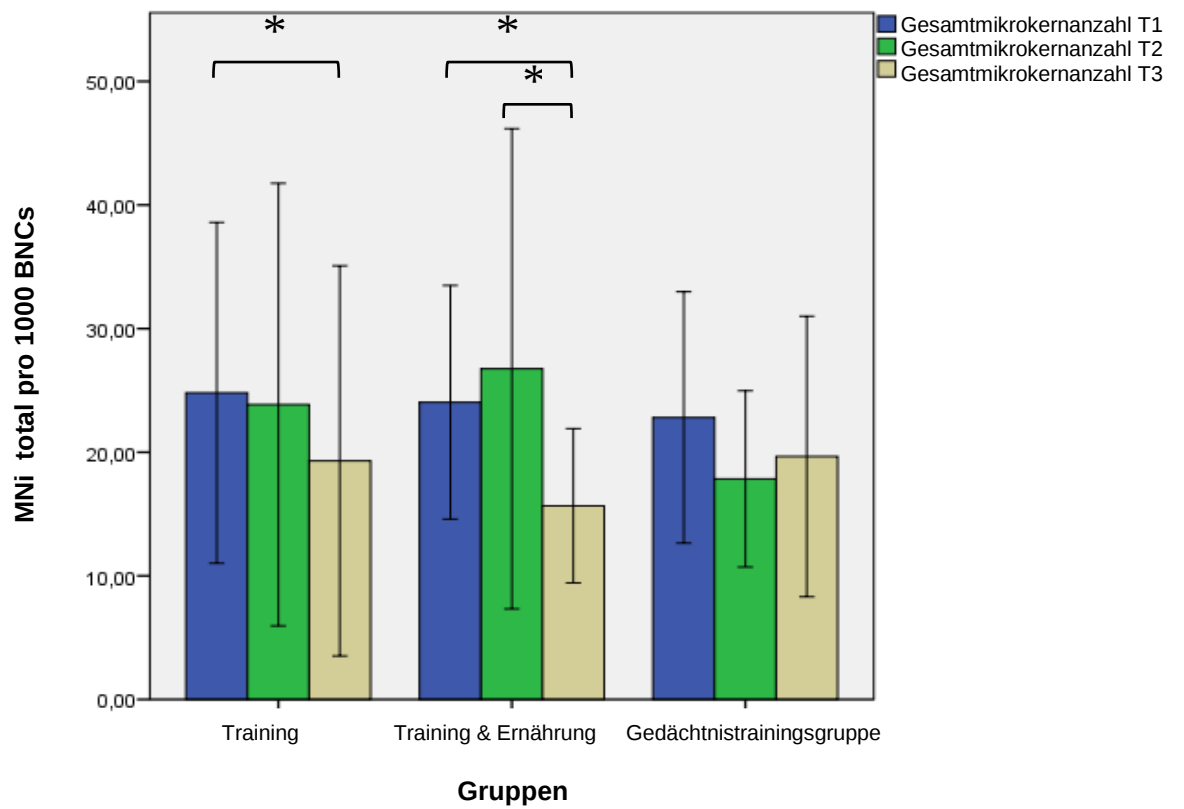


Abb. 22: Gruppenvergleich der Mikrokerngesamtzahl, $p^* \leq 0,05$

4.4.2 Apoptosen

In allen Gruppen wurde eine signifikante Reduktion der Apoptosen zwischen T1 und T3 erreicht. Die Anzahl der Apoptosen nimmt stetig ab. Eine signifikante Reduktion zwischen T1 und T2 zeigt sich in der Gruppe Training und Ernährung, sowie zwischen T2 und T3 in der Gedächtnistrainingsgruppe.

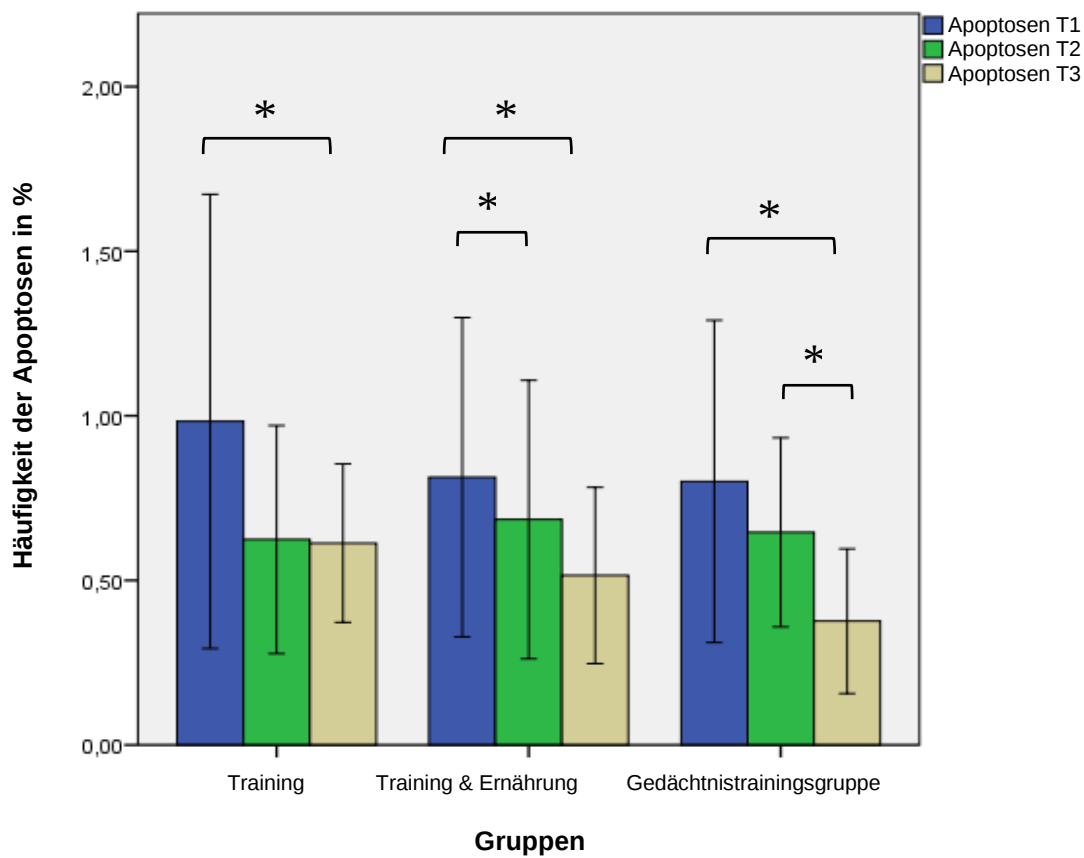


Abb. 23: Gruppenvergleich der Anzahl an Apoptosen, $p^* \leq 0,05$

4.4.3 Nekrosen

Eine signifikante Reduktion der Nekrosen erzielte lediglich die Trainingsgruppe zwischen T1 und T3.

Nach unveränderter mittlerer Anzahl zwischen T1 und T2 in der Gruppe Training und Ernährung, nimmt hier bis T3 die Anzahl der Nekrosen ab, jedoch nicht signifikant.

In der Gedächtnistrainingsgruppe ist keine bedeutende Veränderung der Nekrosenanzahl zwischen den Testzeitpunkten zu erkennen.

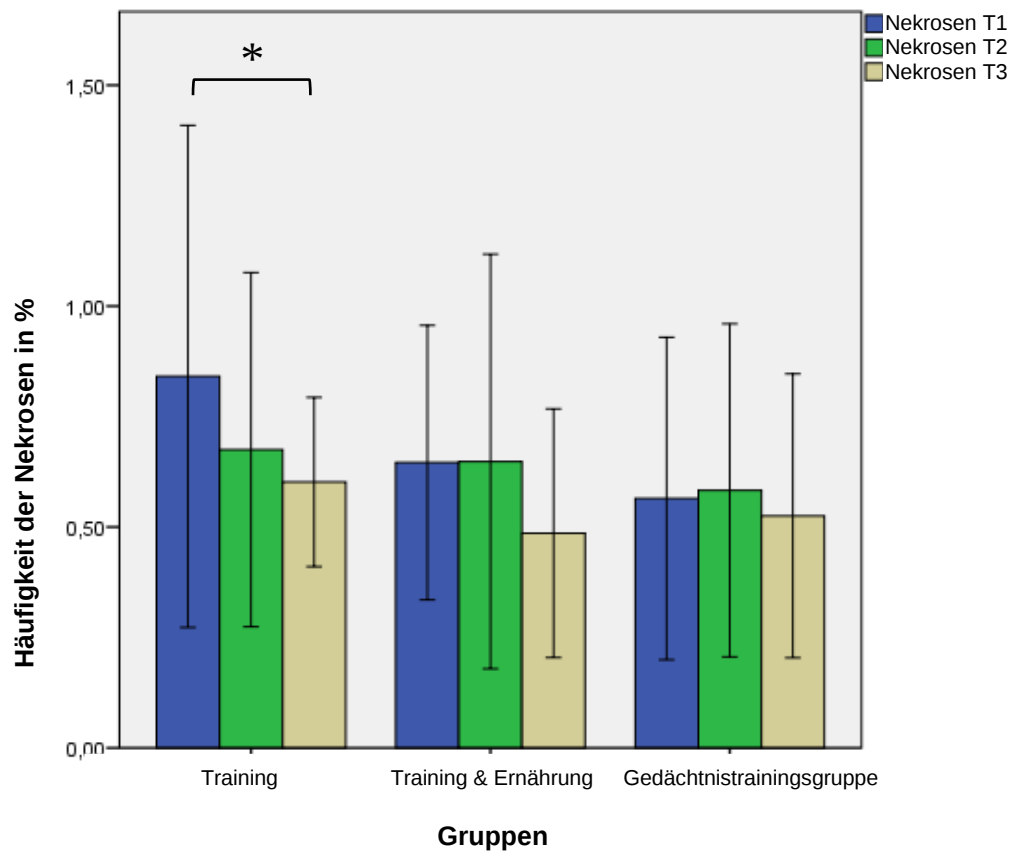


Abb. 24: Gruppenvergleich der Anzahl an Nekrosen, $p^* \leq 0,05$

4.4.4 NPBs

In allen Gruppen ist eine signifikante Reduktion an nucleoplasmic bridges von T1 zu T3 ersichtlich. Am deutlichsten ist die signifikante Abnahme der zwei Testzeitpunkte in der Gedächtnistrainingsgruppe erkennbar.

Ähnliche Bilder liefern die Gruppen Training sowie Training und Ernährung. Eine kontinuierliche Abnahme der NPBs zwischen T1, T2 und T3 ist ersichtlich. Zusätzlich ist eine Abnahme bei der Gruppe Training und Ernährung sowie der Gedächtnistrainingsgruppe auch zwischen T1 und T2 signifikant.

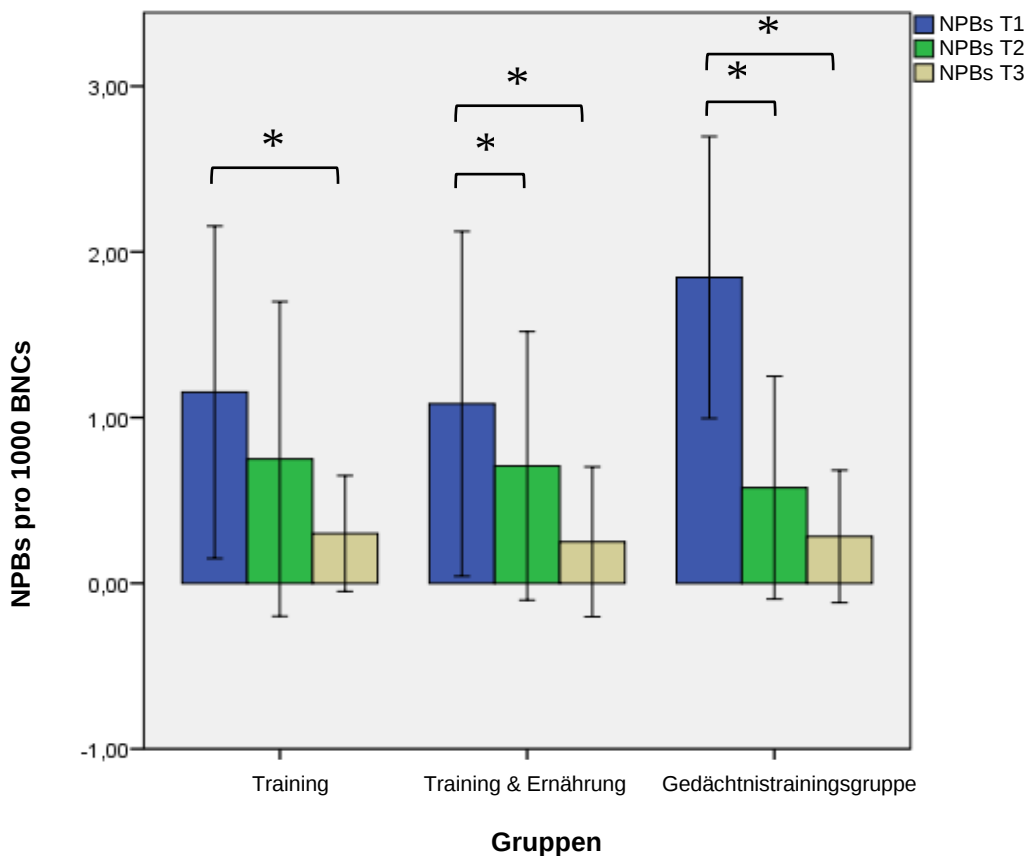


Abb. 25: Gruppenvergleich der Anzahl an NPBs, $p^* \leq 0,05$

4.4.5 NBUDs

Eine signifikante Abnahme der NBUDs ist in allen Gruppen zwischen den Testzeitpunkten T1 und T3 zu verzeichnen. Die deutlichste Reduktion zeigt sich, wie bei den NPBs, bei der Gedächtnistrainingsgruppe. Allerdings zeigt diese Gruppe auch die höchsten Ausgangswerte.

In allen Gruppen nimmt die Anzahl der NBUDs zu T2 hin zuerst leicht, dann zu T3 stärker ab.

In den Gruppen Training und Gedächtnistraining ist die Abnahme von T2 zu T3 signifikant.

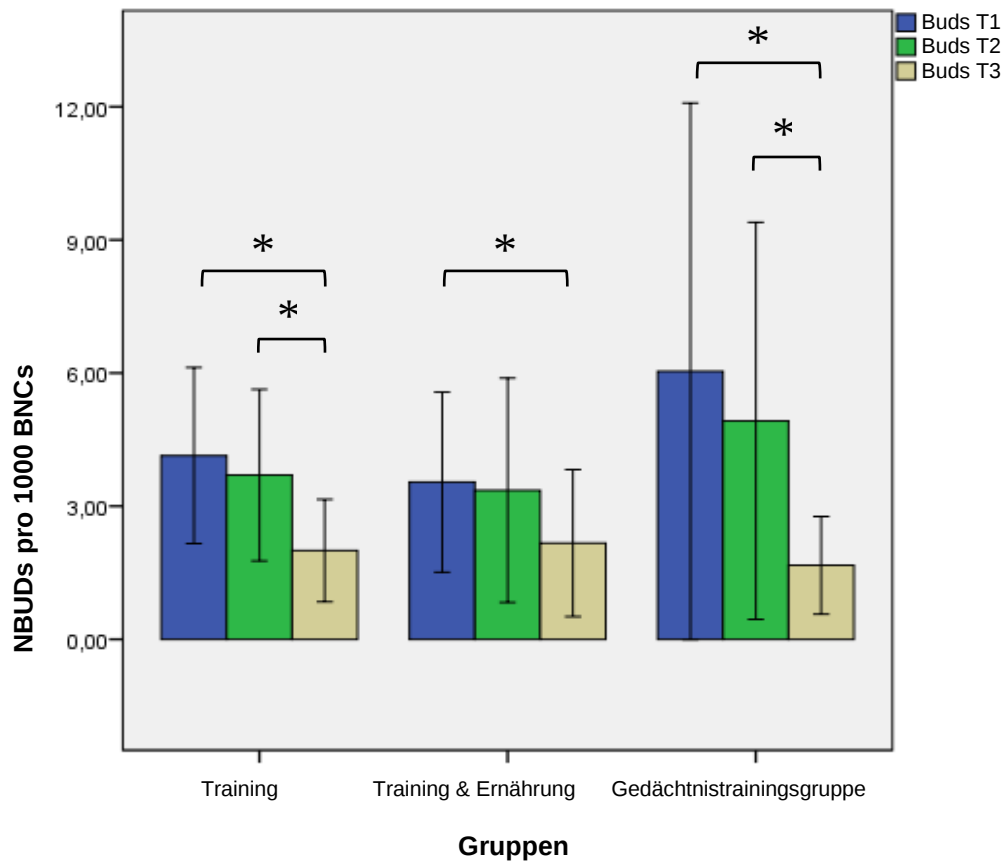


Abb. 26: Gruppenvergleich der Anzahl an NBUDs, $p^* \leq 0,05$

4.5 Vergleich der Mittelwertunterschiede zu den Zeitpunkten T1, T2 und T3 in Abhängigkeit der Altersgruppen

Die Gedächtnistrainingsgruppe wurde in dieser statistischen Auswertung nicht miteinbezogen, um die Ergebnisse der Interventionen nicht zu beeinflussen.

4.5.1 Altersgruppe 65 bis 74 Jahre

Es konnten Daten von acht Probanden zu T1, von sechs Probanden zu T2, und von vier Probanden zu T3 ausgewertet werden.

Es liegt keine signifikante Verringerung der Parameter zwischen den drei Zeitpunkten vor. Eine leichte Reduktion wurde jedoch nach sechs Monaten bei der Gesamtzellzahl, den Apoptosen und Nekrosen, eine deutliche Reduktion bei der Anzahl von Zweikernzellen mit Mni sowie gesamter Mikrokernanzahl und bei den NPBs und BUDs erreicht.

Möglicherweise war die Anzahl der Probanden in dieser Altersgruppe zu gering, um signifikante Ergebnisse zu erzielen.

4.5.2 Altersgruppe 75 bis 85 Jahre

In der zweiten Altersgruppe konnten die Daten zum Zeitpunkt T1 von 26, zum Zeitpunkt T2 von 22 und zum Zeitpunkt T3 von 14 Probanden ausgewertet werden.

Vergleich der Mittelwertunterschiede von T1 zu T2

Signifikant reduzierten sich die Apoptosen ($p=0,035$), der NDI ($p=0,014$), der NDCI ($p=0,012$) und NPBs ($p=0,012$). Eine geringe Abnahme war bei der Gesamtzellzahl, den Nekrosen, Zweikernzellen mit MNI, Gesamtmikrokernen und NBUDs zu verzeichnen.

Vergleich der Mittelwertunterschiede von T2 zu T3

Die Anzahl der Zweikernzellen mit MNi und die der Gesamtmikrokerne nahm signifikant ab (beide $p=0,028$). Gesamtzellzahl, Nekrosen, NPBs und NBUDs reduzierten, und Apoptosen erhöhten sich geringermaßen.

Vergleich der Mittelwertunterschiede von T1 zu T3

Alle Parameter, ausgeschlossen Nekrosen, reduzierten sich signifikant nach sechsmonatiger Intervention (Gesamtzellzahl: $p=0,019$; Apoptose: $p=0,033$; NDI: $p=0,046$; NDCI: $p=0,025$; BNC MNi: $p=0,001$; Gesamtmikrokerne: $p=0,001$; NPBs: $p=0,005$; NBUDs: $p=0,025$).

4.5.3 Altersgruppe >85 Jahre

Zum Zeitpunkt T1 konnten Daten von 30 Probanden, zu T2 von 22 Probanden und zu T3 13 Probanden ausgewertet werden.

Vergleich der Mittelwertunterschiede von T1 zu T2

Es nahmen signifikant die Nekrosen ($p=0,015$), die Zweikernzellen mit MNi ($p=0,014$) und die Gesamtmikrokerne ($p=0,036$) ab. Eine geringe Reduktion war bei der Gesamtzellzahl, den Apoptosen, der NPBs und NBUDs zu verzeichnen. Der NDI und NDCI veränderte sich in keinem bedeutenden Ausmaß.

Vergleich der Mittelwertunterschiede von T2 zu T3

Die Gesamtzellzahl, die Apoptosen, Zweikernzellen mit MNi, Gesamtmikrokerne, NPBs und NBUDs sanken, jedoch nicht signifikant. Die Anzahl der Nekrosen stieg leicht an.

Vergleich der Mittelwertunterschiede von T1 zu T3

Signifikant reduzierten sich die Zweikernzellen mit MNi ($p=0,009$), Gesamtmikrokerne ($p=0,023$), NPBs ($p=0,028$) und NBUDs ($p=0,045$). Die Gesamtzellzahl, Nekrosen und Apoptosen verringerten sich, jedoch nicht signifikant. Der NDI und NDCI blieb bis zuletzt unverändert.

4.5.4 Übersicht Mittelwerte und Signifikanzen der Parameter in Abhängigkeit von den Altersgruppen zwischen T1 und T3

		Altersgruppe 65-74			Altersgruppe 75-84			Altersgruppe >85		
		MW	s	p	MW	s	p	MW	s	p
Gesam- zellzahl	T1	595,32	46,19	0,465	605,18	63,25	0,019	588,47	67,53	0,064
	T3	581,84	17,32		562,74	33,61		566,29	18,84	
Apopto- se	T1	0,57	0,11	0,715	0,82	0,49	0,033	0,78	0,63	0,093
	T3	0,54	0,16		0,63	0,41		0,47	0,20	
Nekros- e	T1	0,76	0,52	0,068	0,67	0,38	0,084	0,71	0,44	0,184
	T3	0,45	0,14		0,55	0,33		0,53	0,12	
NDI	T1	2,00	0,04	0,144	1,96	0,08	0,046	1,97	0,07	0,156
	T3	2,04	0,02		2,02	0,02		1,99	0,03	
NDCI	T1	1,99	0,04	0,109	1,95	0,08	0,025	1,95	0,07	0,182
	T3	2,03	0,02		2,01	0,03		1,99	0,03	
BNC+ MNI	T1	25,25	10,95	0,285	22,86	12,41	0,001	22,81	13,53	0,009
	T3	11,87	2,66		13,07	6,25		17,19	9,71	
MNI total	T1	28,87	11,85	0,273	27,05	15,26	0,001	27,43	17,84	0,023
	T3	14,13	3,57		16,00	7,57		21,15	14,03	
NPBs	T1	0,81	0,96	0,357	1,08	0,88	0,005	1,02	1,19	0,028
	T3	0,25	0,50		0,18	0,23		0,50	0,45	
NBUDs	T1	2,75	1,83	0,66	3,58	2,35	0,025	3,55	3,13	0,045
	T3	1,50	0,71		1,89	1,59		2,48	1,35	

Tab. 4: Mittelwertunterschiede der Parameter des CBMN Assays in Abhängigkeit der Altersgruppe nach sechsmonatiger Intervention (von T1 zu T3); MW = Mittelwert, s = Standardabweichung ($\pm$), p = Signifikanz, signifikante Werte ($p \leq 0,05$) fett markiert

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Mikrokerne und Alter/Geschlecht

Zum Ausgangszeitpunkt T1 war eine höhere Mikrokernfrequenz bei den Frauen gegenüber den Männern zu beobachten. Obgleich die Anzahl der männlichen Probanden (N=12) deutlich geringer ausfiel als die der weiblichen (N=87), stimmt dieses Ergebnis mit der Literatur überein. Vor allem das X-Chromosom bei den Frauen dürfte dafür verantwortlich sein, dass dessen Verlust als Mikrokern leichter gegeben ist [Fenech und Bonassi, 2011].

Vergleiche von jungen und älteren Personen haben schon mehrmals gezeigt, dass Mikrokerne mit dem Alter zunehmen [Fenech et al., 2011]. Insbesondere bis zum 70. Lebensjahr konnte eine steigende Mikrokernrate verzeichnet werden, die in den weiteren Lebensjahren wieder leicht abzusinken beginnt [Wojda et al., 2007]. Die Ergebnisse dieser Studie stimmen damit überein – die Mikrokernfrequenz nimmt mit dem Alter leicht, aber nicht signifikant ab. Da alle Probanden über 65 Jahre alt sind, das durchschnittliche Alter zwischen 80 und 90 Jahren liegt, und keine Vergleichswerte mit jüngeren Lebensjahren vorliegen, kann man, unter Berücksichtigung der vorliegenden Literatur, davon ausgehen, dass die Mikrokernfrequenz zuvor mit dem Alter stetig zugenommen hat und in den höheren Altersklassen wieder leicht absinkt.

Über einen möglichen Zusammenhang zwischen den Parametern, die ebenfalls zur Charakterisierung von DNA-Schäden herangezogen worden sind (Apoptosen, Nekrosen, NBUDs und NPBs), und dem Alter bzw. dem Geschlecht wurde bisher noch nicht berichtet. Apoptosen und Nekrosen sind jedoch ein Merkmal für Entzündungsprozesse, die mit zunehmendem Alter häufiger auftreten. Die aktuellen Ergebnisse zum Ausgangszeitpunkt T1 zeigen keine signifikante Erhöhung von Apoptosen, Nekrosen, NBUDs oder NPBs.

Gruppe Training und Ernährung

Alle Parameter, ausschließlich der Nekrosen konnten in der Gruppe Training und Ernährung eine signifikante Reduktion nach sechsmonatiger Intervention verzeichnen.

Die Anzahl der Zweikernzellen mit Mikrokernen verringerte sich durchschnittlich zwischen T1 und T3 um 39,9%, die der gesamte Mikrokernfrequenz um 40,7%.

In allen drei Altersgruppen sanken die BNCs mit MNi sowie die Gesamtmikrokerne bis zum Zeitpunkt T3. Die Gruppe der >85 Jährigen hatte zum Ausgangszeitpunkt die höchste Mikrokernfrequenz und erzielte bis zum Zeitpunkt T3 die stärkste Abnahme im Vergleich zu den anderen Altersgruppen.

Apoptosen nahmen im Mittel um 23,2%, Nekrosen um 21,5% (nicht signifikant) ab.

NPBs verringerten sich im Durchschnitt um 71,6%, NBUDs um 36,8%.

Im Vergleich zur Gruppe Training nahm hier die durchschnittliche Anzahl an BNCs mit MNi sowie Gesamtmikrokerne deutlich mehr ab, nämlich um 5,9% bzw. 10,6%. Auch die NPBs zeigen eine höhere Reduktion, um ~4% mehr als in der Trainingsgruppe. Die Anzahl der Nekrosen variiert in beiden Gruppen um nur 0,2%.

Das eingenommene Nahrungsergänzungsmittel FortiFit enthält eine Bandbreite aller wichtigen Nährstoffe, die besonders im Alter eine wichtige Rolle in der Gesundheitserhaltung und Leistungsfähigkeit spielen. Allen voran ist ein hoher Proteinanteil mit einem hohen Gehalt an essentiellen Aminosäuren und insbesondere Leucin (2,8g/Portion) vorhanden. Dies sind wichtige Komponenten im Proteinmetabolismus, die nachweislich die Muskelkraft und –funktion im Alter fördern und Sarkopenie vorbeugen bzw. entgegenwirken können [Hohenstein et al., 2011]. Die Kombination von körperlichem Training

und einer adäquaten Proteinzufuhr ist die optimale Unterstützung in diesem Kontext [Morley et al., 2011].

Abgesehen von den Vorteilen einer proteingestützten Ernährung im Alter, spielen verschiedene Mikronährstoffe und Antioxidantien eine ebenso wichtige Rolle, insbesondere im DNA-Metabolismus. Die Mikrokernhäufigkeit wurde bereits in mehreren Studien vor allem durch die Kombination mehrerer Mikronährstoffe reduziert. Hier spielen die Antioxidantien sowie Folat und Vitamin B12 eine große Rolle, die chromosomale Schäden nachweislich verringern können, jedoch in Abhängigkeit von des Ausgangsstatus im Plasma [Thomas et al., 2011]. Die optimale Kombination dieser Nährstoffe in FortiFit gemeinsam mit körperlichem Training könnte zu der höheren Reduktion der Mikrokernfrequenz und NPBs gegenüber der Gruppe Training geführt haben.

Gedächtnistrainingsgruppe

Signifikant reduzierten sich zwischen T1 und T3 die Apoptosen (-44,1%), NPBs (-68,8%) und die NBUDs (-58,3%). BNCs mit MNi sowie Gesamtmikrokerne nahmen im Durchschnitt um 19,5% bzw. 14,7% ab. Nekrosen sanken um 10,5%.

In der Altersgruppe der 75-84 Jährigen nahm die Anzahl der BNCs mit MNi sowie die Gesamtmikrokernzahl von T1 zu T2 ab, erhöhte sich jedoch zum Zeitpunkt T3 in die Nähe der Ausgangswerte T1. In der Alterskategorie der >85 Jährigen reduzierten sich ebenfalls die Mikrokerne zu T2 hin, und blieben bis T3 etwa konstant.

Die signifikante Reduktion der Parameter ist vor allem bei den Apoptosen, NPBs und NBUDs sehr deutlich und im Vergleich zu den zwei Interventionsgruppen stärker ausgeprägt. Die kognitiven Trainingseinheiten, die auch in Gemeinschaft absolviert wurden, könnten zu einem aktiveren Lebensstil und gesteigertem Wohlbefinden geführt haben. Womöglich konnte dadurch auch eine erhöhte Motivation zu einem gesünderen Lebensstil mit mehr

Bewegung und/oder bewusstere Ernährung hervorgerufen worden sein. Über den Lebensstil der Probanden liegen für diese Arbeit jedoch noch keine genauen Daten vor.

Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit der Altersgruppen

Die Art der Interventionsgruppen wurde hier nicht berücksichtigt, die Gedächtnistrainingsgruppe wurde aus der Auswertung herausgenommen.

In der ersten Altersgruppe der 65 bis 74 Jährigen konnten starke Reduktionen verzeichnet werden, die jedoch vermutlich aufgrund der zu geringen Probandenanzahl (N=8 zu T1, N=4 zu T3) nicht signifikant waren.

Auffällig hoch ist die Verringerung der Anzahl der BNCs mit MNi um durchschnittlich 52,9% zwischen T1 und T3. Die gesamte Mikrokernfrequenz sank im Mittel um 51,1%.

Apoptosen nahmen lediglich um nur 5% ab, Nekrosen hingegen um 40%, NPBs um 69,1% und NBUDs um 45,5%.

In der Altersgruppe der 75-84 Jährigen nahmen signifikant die BNCs mit MNi um 42,3% und die Gesamtmikrokerne um 40,8% bis zum Zeitpunkt T3 ab. Weiters signifikant verringerten sich Apoptosen (-23,2%), NPBs (-83,3%) und NBUDs (47,2%). Nekrosen sanken um 17,9%.

Signifikante Reduktionen nach sechs Monaten Intervention konnte auch die Altersgruppe der >85 Jährigen verzeichnen. Dazu zählen die BNCs mit MNi (-24,6%), Gesamtmikrokerne (-22,9%), NPBs (-50,9%) und NBUDs (-30,1%). Apoptosen und Nekrosen sanken um 39,7 bzw. 25,4%.

Mit Abstand die größte Verringerung der Anzahl an Mikrokernen wurde in der ersten Altersgruppe erzielt. Leider sind hier die Ergebnisse nicht signifikant.

Die mittlere Altersgruppe erreichte gegenüber der dritten Alterskategorie der >85 Jährigen eine fast doppelt so hohe Reduktion der Anzahl der BNCs mit MNi, der Gesamtmikrokerne sowie deutlich höhere Reduktionen bei NPBs und NBUDs.

Möglicherweise könnten mäßig präzise durchgeführte Kraftübungen aufgrund Unsicherheit, verminderter Konzentration oder anderer möglicher Altersschwächen, die mit der Zeit auftreten können, für weniger ausgeprägte Erfolge in dieser Alterskategorie verantwortlich sein.

Dennoch lassen sich bei den Ergebnissen zwischen den Alterskategorien keine großen Unterschiede feststellen, eine Abnahme der wichtigen Parameter Mikrokerne, Apoptosen, Nekrosen, nucleoplasmic bridges sowie NBUDs konnte in jeder Gruppe, nach sechsmonatigen Interventionen, erzielt werden.

6. SCHLUSSBETRACHTUNG

In dieser Studie wurde erstmalig untersucht, inwiefern regelmäßiges Krafttraining allein und in Kombination mit einer optimierten Nahrungsergänzung Einfluss auf das Auftreten sämtlicher Biomarker für DNA-Schäden bei älteren SeniorInnen haben. Dabei wurden vor allem die Ausgangswerte T1 mit den Testwerten T3, die nach sechs Monaten Intervention untersucht wurden, verglichen.

Der CBMN Assay ist eine weltweit angewandte und etablierte Methode, mit der chromosomale Veränderungen nachgewiesen werden können. Es wurden die Anzahl der Zweikernzellen mit MNi, die Gesamtmikrokernzahl, Apoptosen, Nekrosen, NPBs und BUDs als Biomarker für die Beurteilung chromosomaler Schäden verwendet.

Es konnten wesentliche Veränderungen der verschiedenen Parameter in beiden Interventionsgruppen sowie in der Gedächtnistrainingsgruppe (Kontrollgruppe) beobachtet werden. Signifikant reduzierten sich insbesondere die Anzahl der Zweikernzellen mit MNi sowie die Gesamtmikrokernfrequenz in der Gruppe Training und Ernährung und sehr deutlich ab einem Alter von >75. SeniorInnen zwischen 65 und 74 Jahren waren in der Probandenzahl deutlich verringert, zudem nicht mehr in der Gruppe Training zum Zeitpunkt T3 vorhanden.

Die beobachteten Korrelationen von Alter und Geschlecht mit der Mikrokernfrequenz stimmen mit bisherigen Studienergebnissen überein. Ab dem 70. Lebensjahr etwa scheint die Mikrokernfrequenz leicht abzusinken und Frauen wiesen im Vergleich zu Männern eine erhöhte Mikrokernrate auf.

Interessanterweise konnten auch Veränderungen in der Gedächtnistrainingsgruppe beobachtet werden, wobei die Mikrokernfrequenz deutlich weniger stark und nicht signifikant zurück ging, jedoch andere Parameter wie Apoptosen, NPBs und BUDs signifikant reduziert wurden. Hier dürfte die verbesserte Gedächtnisfunktion sowie erhöhtes Wohlbefinden zu einer Leistungssteigerung und einem veränderten Gesundheitszustand geführt haben.

Der weitere Verlauf der Studie wird zeigen, wie regelmäßiges Krafttraining längerfristig auf die Rate diverser chromosomaler Schäden wirkt.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Älterwerden ist durch verschiedene Veränderungen des Organismus gekennzeichnet, insbesondere durch verlangsamte Stoffwechselmechanismen und Erkrankungen, wie z.B. Sarkopenie. Dabei ist gerade der Erhalt der Muskelmasse, -kraft, und -funktion für die Lebensqualität von großer Bedeutung. Die Kombination aus regelmäßigem körperlichem Training und einer adäquaten Protein- und Mikronährstoffversorgung stellt die beste Prävention bzw. Behandlung von Sarkopenie dar. Außerdem ist das Altern mit einer erhöhten Mikrokernfrequenz assoziiert, die ein wichtiger Marker für chromosomale Schäden sowie für ein erhöhtes Krebsrisiko ist.

In dieser Arbeit wurden der Einfluss von Krafttraining in Kombination mit der Einnahme eines protein- und nährstoffreichen Supplements (FortiFit) auf verschiedene genotoxische Biomarker im Zeitraum von sechs Monaten bei SeniorInnen >65 Jahre (n=99) untersucht. Die Studienteilnehmer wurden randomisiert in 3 Gruppen unterteilt: Gruppe Training, Training und Ernährung und Gedächtnistrainingsgruppe (Kontrollgruppe).

Mit dem CBMN Assay, der als verlässlichste Methode zur Erfassung von chromosomalen Schäden gilt, wurde dafür die Anzahl der Zweikernzellen mit Mikrokernen, Gesamtmikrokernfrequenz, Apoptosen, Nekrosen, nucleoplasmic bridges und NBUDs bewertet. Dabei wurden die Ausgangswerte (T1) mit den Werten nach sechsmonatiger Intervention (T3) verglichen.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kombination von Krafttraining und eine dem Alter angepasste Nahrungsergänzung die Mikrokernrate und die Anzahl anderer zytotoxischer Biomarker im Alter >65 Jahren insgesamt deutlich reduzieren kann.

Derzeit existieren keine anderen Studien, die diesen Zusammenhang näher untersucht haben. Im Interesse der Erhaltung der Lebensqualität von der älteren und immer älter werdenden Bevölkerung bedarf es daher noch weitaus mehr Forschungsarbeit auf diesem Gebiet.

8. SUMMARY

The process of ageing is characterized by several changes in the organism, especially due to reduced metabolic mechanisms and diseases such as Sarcopenia. Therefore, the preservation of muscle mass, power, and function is of great importance to maintain life quality. The combination of regular physical exercise and an appropriate intake of protein and micronutrients is the most efficient way to prevent or treat sarcopenia.

Furthermore, ageing is associated with an increased micronuclei frequency, which is an important marker for chromosomal damage as well as for an increased cancer risk.

In this thesis, the effects resistance training combined with the intake of a protein- and nutrient-rich supplement (FortiFit) on various genotoxic biomarkers were studied within an intervention period of six months in institutionalized seniors >65 years (n=99). The subjects were randomly divided into 3 groups: group training, group training and nutrition and a cognitive training group (control group).

Using the CBMN Assay, which is considered being the most reliable method to determine chromosomal damage, the number of binuclear cells with micronuclei, total micronucleus frequency, apoptosis, necrosis, nucleoplasmic bridges and NBUDs were detected. The baseline values (T1) were compared with the outcomes after six months of intervention (T3).

The results show that the combination of resistance training and an age-adjusted dietary supplement can considerably reduce the MNi-frequency and the number of other cytotoxic biomarkers at an age >65 years.

Currently there are no other studies available that have examined these correlations in more detail. Therefore, to preserve the quality of life in the elderly, much more research is needed.

9. LITERATURVERZEICHNIS

ANDREASSI M G, BARALE R, IOZZO P, PICANO E. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. REVIEW. *Mutagenesis* 2011; Vol. 26 No. 1: 77-83.

BOLOGNESI C, LANDO C, FORNI A, LANDINI E, SCARPATO R, MIGLIORE L, BONASSI S. Chromosomal damage and ageing: effect of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age Ageing* 1999; 28: 393–397

BONASSI S, ZNAOR A, CEPPI M, LANDO C, CHANG W P, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDERS M, ZEIGER E, BAN S, BARALE R, BIGATTI M P, BOLOGNESI C, CEBULSKA-WASILEWSKA A, FABIANOVA E, FUCIC A, HAGMAR L, JOKSIC G, MARTELLI A, MIGLIORE L, MIRKOVA E, SCARFI M R, ZIJNO A, NORPPA H, FENECH M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007; Vol. 28 No. 3: 625-631.

BONASSI S, EL-ZEIN R, BOLOGNESI C, FENECH M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. REVIEW. *Mutagenesis* 2011; Vol. 26 No. 1: 93-100.

CAMPBELL W W, LEIDY H J. Dietary protein and resistance training effects on muscle and body composition in older persons. REVIEW. *Journal of the American College of Nutrition* 2007; Vol. 26 No. 6: 696–703.

CROTT W J, FENECH M. Effect of vitamin C supplementation on chromosome damage, apoptosis and necrosis ex vivo. *Carcinogenesis* 1999; Vol. 20 No. 6: 1035-1041.

CRUZ-JENTOFT A J, BAEYENS J P, BAUER J M, BOIRIE Y, CEDERHOLM T, LANDI F, MARTIN F C, MICHEL J P, ROLLAND Y, SCHNEIDER S M,

TOPINKOVA E, VANDEWOUE M, ZAMBONI M. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the european working group on sarcopenia in older people. Age and Ageing 2010; No. 39: 412-423.

DILLON E L, SHEFFIELD-MOORE M, PADDON-JONES D, GILKISON C, SANFORD A P, CASPERSON S L, JIANG J, CHINKES D L, URBAN R J. Amino acid supplementation increases lean body mass, basal muscle protein synthesis and insulin-like growth factor-I expression in older women. Journal of clinical endocrinology and metabolism 2009; Vol. 94 No. 5: 1630–1637.

EL-ZEIN R A, FENECH M, LOPEZ M S, SPITZ M R, ETZEL C J. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases among smokers. Cancer Epidemiology Biomarkers Preview 2008; 17: 1111-1119.

ELMADFA I et al. Österreichischer Ernährungsbericht 2012. 1. Auflage, Wien, 2012.

EL-ZEIN R A, VRAL A, ETZEL C J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. REVIEW. Mutagenesis 2011; Vol. 26 No. 1: 101–106.

EVANS W J. Protein nutrition, exercise and ageing. REVIEW. Journal of the American college of nutrition 2004; Vol. 23 No. 6: 601-609.

FENECH M, DREOSTI I, AITKEN C. Vitamin-E supplements and their effect on vitamin-E status in blood and genetic damage rate in peripheral blood lymphocytes. Carcinogenesis 1997; 18: 359–364.

FENECH M, DREOSTI I and RINALDI J. Folate, vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. Carcinogenesis 1997; 18: 1329–1336.

FENECH M, AITKEN C and RINALDI J. Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1163–1171.

FENECH M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* 2000; 455: 81–95.

FENECH M. The role of folic acid and vitamin b12 in genomic stability of human cells. *Mutation research* 2001; 475: 57-67.

FENECH M, BAGHURST P, LUDERER W, TURNER J, RECORD S, CEPPI M, BONASSI S. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, b-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability—results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis* 2005; Vol. 26 No. 5: 991-999.

FENECH M. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay. *Nature protocols* 2007; Vol. 2 No. 5: 1084-1104.

FENECH M, BONASSI S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. REVIEW. *Mutagenesis* 2011; Vol. 26 No. 1: 43–49.

FENECH M. Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. REVIEW. *Mutation research* 2012; 733: 21-33.

FERGUSON L R, FENECH M. Vitamin and minerals that influence genome integrity, and exposure/intake levels associated with DNA damage prevention. *Mutation research* 2012; 733: 1-3.

GREMEAUX V, GAYDA M, LEPERSE R, SOSNER P, JUNEAU M, NIGAMA A. Exercise and longevity. REVIEW. Maturitas 2012; 73: 312-317.

HAMMAR M, ÖSTGREN C J. Healthy aging and age-adjusted nutrition and physical fitness. Best practice and research clinical obstetrics and gynaecology 2013; 1-12.

HOHENSTEIN K, LECHLEITNER M, ROTH E, SIEBER C, THALHAMMER E. Altersassoziiierter Muskelverlust: Diagnose und Therapie bei Sarkopenie. Expert/-innen-Statement 2011; 1-8.

HOLLAND N, BOLOGNESI C, KIRSCH-VOLDERS M, BONASSI S, ZEIGER E, KNASMÜLLER S, FENECH M. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. REVIEW. Mutation Research 2008; 659: 93–108.

HUANG P, HUANG B, WENG H, NAKAYAMA K, MORIMOTO K. Effects of lifestyle on micronuclei frequency in human lymphocytes in Japanese hard-metal workers. Preventive Medicine 2009; 48: 383–388.

IARMARCOVAI G, BONASSI S, BOTTA A, BAAN R A, ORSIÈRE T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. REVIEW. Mutation Research 2008; 658: 215–233.

IRVING B A, ROBINSON M M, SREEKUMARAN NAIR K. Age effect on myocellular remodeling: Response to exercise and nutrition in humans. REVIEW. Ageing Research Reviews 2012; 11: 374–389.

KARUMASINGHE N, RYAN J, TUCKEY J, MASTERS J., JAMIESON M,

CLARKE L C, MARSHALL J R, FERGUSON L R. DNA stability and serum selenium levels in a high-risk group for prostate cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev.* 2004; 13: 391–397.

KATSANOS C S, KOBAYASHI H, SHEFFIELD-MOORE M, AARSLAND A, WOLFE R. A high proportion of leucine is required for optimal stimulation of the rate of muscle protein synthesis by essential amino acids in the elderly. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* 2006; 291: 381–387.

LAL A, AMES B N. Association of chromosome damage detected as micronuclei with hematological diseases and micronutrient status. REVIEW. *Mutagenesis* 2011; Vol. 26 No. 1: 57–62.

MORLEY J E, ARGILES J M, EVANS W J, BHASIN S, CELLA D, DEUTZ N E P, DOEHNER W, FEARON K C H, FERRUCCI L, HELLERSTEIN M K, KALANTAR-ZADEH K, LOCHS H, MACDONALD N, MULLIGAN K, MUSCARITOLI M, PONIKOWSKI P, POSTHAUER M E, FANELLI F R, SCHAMBELAN M, SCHOLS A M W J, SCHUSTER M W, ANKER S D. Nutritional recommendations for the management of sarcopenia. *Journal of American Medical Directors Association* 2010; 11: 391–396.

PADDON-JONES D, SHEFFIELD-MOORE M, ZHANG X-J, VOLPI E, WOLF S E, AARSLAND A, FERRANDO A A, WOLFE R R. Amino acid ingestion improves muscle protein synthesis in the young and elderly. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 2004; 286: 321-328.

PRAA D, RECH FRANKE S I, PEGAS HENRIQUE J A, FENECH M. Iron and genome stability: An update. REVIEW. *Mutation research* 2012; 733: 92-99.

REINHOLD S, NEUBAUER O, BULMER A.C, KNASMÜLLER S, WAGNER K.-H. Endurance exercise and DNA stability: Is there a link to duration and intensity? Mutation Research 2009; 682 (1): 28–38.

SCHIFFL C, ZIERES C, ZANKL H. Exhaustive physical exercise increases frequency of micronuclei. Mutation research 1997; 389: 243-246.

SHARIF R, THOMAS P, ZALEWSKI P, FENECH M. The role of zinc in genomic stability. REVIEW. Mutation research 2012; 733: 111-121.

SILBERNAGL S, LANG F. In: Taschenatlas Pathophysiologie. Thieme Verlag, 3. Auflage. Stuttgart, 2009; S.14.

SMOLKOVA B, DUSINSKA M, RASLOVA K, BARANCOKOVA M, KAZIMIROVA A, HORSKA A, SPUSTOVA V, COLLINS A. Folate levels determine effect of antioxidant supplementation on micronuclei in subjects with cardiovascular risk. Mutagenesis 2004; Vol. 19 No. 6: 469—476.

STOPPER H, TREUTLEIN A T, BAHNER U, SCHUPP N, SCHMID U, BRINK A, PERNA A, HEIDLAND A. Reduction of the genomic damage level in haemodialysis patients by folic acid and vitamin B12 supplementation. Nephrol. Dial. Transplant. 2008; 23: 3272–3279.

THOMAS P, WU J, DHILLON V, FENECH M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. REVIEW. Mutagenesis 2011; Vol. 26 No. 1: 69–76.

TITENKO-HOLLAND N, JACOB R, SHANG N, BALARAMAN A, SMITH M. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. Mutation Research 1998; 417: 101–114.

UMEGAKI K, IKEGAMI S, INOUE K, ICHIKAWA T, KOBAYASHI S,

SOENO N, TOMABECHI K. Beta-carotene prevents x-ray induction of micronuclei in human lymphocytes. *American Journal of clinical nutrition* 1994; 59: 409–412.

WOJDA A, ZIETKIEWICZ E, WITT M. Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects. *Mutagenesis* 2007; 22 (3): 195–200.



LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Birgit Koller, Bakk.
Geboren: 15.12.1987 in Wien
Staatsbürgerschaft: Österreich
Telefon: 0660 54 55 960
E-Mail: birgit-koller@gmx.at
Adresse: Konrad-Thurnhergasse 7/3/4
1110 Wien

Schulbildung:

1994 – 1998 Volksschule
1998 – 2006 AHS – neusprachliches Gymnasium Wien
(23. Juni 2006 Matura)
Okt. 2006 bis Juni 2007 Studium der Pflegewissenschaften an der Universität
Wien (abgebrochen)
Okt. 2007 bis Nov.2011 Bachelorstudium der Ernährungswissenschaften an
der Universität Wien
Seit November 2011 Masterstudium der Ernährungswissenschaften,
Zweig „Public Health“
Seit 2007 Geringfügig beschäftigt bei Drogerie Peter
Mayerhofer

Ferialpraxis: Juli 2005: Unfallverhütungsdienst der AUVA
Juli 2007: UKH Meidling als Stationshelferin
Juli 2008: UKH Lorenz-Böhler als Küchenhilfe
August 2009: UKH Lorenz-Böhler als Küchenhilfe
August 2010: Biohelp als Telefonberatung und
Verkauf

Soziale Kompetenzen: Zuverlässig, selbstständig, teamfähig,
verantwortungsbewusst

Besondere Kenntnisse: Fremdsprachen: Englisch, Französisch
(Grundkenntnisse)
EDV-Kenntnisse: Office Word, PowerPoint, Excel,
SPSS

Wien, am 27.08.2013

Eidesstattliche 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, 27.8.2013

