



MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Einfluss einer Protein- und Bewegungsintervention auf das antioxidative
Potenzial von älteren Personen

verfasst von | submitted by

Muriel Harloff BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Master of Science (MSc)

Wien | Vienna, 2024

Studienkennzahl lt. Studienblatt |
Degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von | Supervisor:

Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Masterarbeit unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. Karl Heinz Wagner bedanken, der mir das Thema zur Verfügung gestellt hat, mir stets mit fachlichem Rat zur Seite stand und mir durch sein Feedback wertvolle Impulse für diese Arbeit gegeben hat.

Ein besonderer Dank gilt Dipl.-Ing. Laura Bragagna für die Einführung und Betreuung im Labor, die stets hilfsbereit war, wenn Fragen auftauchten und immer als Ansprechpartnerin während der Erstellung der Masterarbeit zur Verfügung stand. Für die Begleitung und die konstruktiven Anmerkungen, die zur Weiterentwicklung der Arbeit beigetragen haben.

Für die produktive Zusammenarbeit im Labor und Datenauswertung möchte ich mich ebenfalls bei Ricarda bedanken. Diese Zusammenarbeit war entscheidend für die Umsetzung der Methoden.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre stetige Unterstützung nicht nur während dieser Arbeit, sondern auch während meiner gesamten Studienzeit bedanken. Ohne ihren Rückhalt wäre vieles nicht möglich gewesen

I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS.....	2
II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	4
III. TABELLENVERZEICHNIS.....	5
V. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
1. EINLEITUNG.....	10
2.LITERATURÜBERSICHT	13
2.1 ALTERSTHEORIEN.....	13
2.2 PHYSIOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN WÄHREND DES ALTERNS	19
2.3 FREIE RADIKALE UND OXIDATIVER STRESS	20
.....	20
2.3.1 Endogen Bildung von ROS/RNS:	21
2.3.2 Exogene Quellen für ROS/RNS:.....	22
2.4 ANTI-OXIDATIVE SCHUTZSYSTEME UND ANTIOXIDANTIEN.....	23
2.4.1 Enzymatische Antioxidantien	23
2.4.2 Nicht enzymatische Antioxidantien	26
2.5 PROTEINAUFNAHME IM ALTER	27
2.6 PHYSIOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN UND MUSKELAUFBAU IM ALTER.....	29
3. METHODIK & STUDIENDESIGN.....	31
3.1 REKRUTIERUNG UND RANDOMISIERUNG	31
3.2 INTERVENTIONEN	32
3.2.1 Ernährungsintervention	33
3.2.2 Trainingsintervention.....	34
3.3 FRAP MESSMETHODE.....	38
3.3.1 FRAP – “Ferric Reducing Ability of Plasma”	38
3.3.2 FRAP - Chemikalien	38
3.3.3 FRAP - Verwendete Geräte und Einstellungen.....	39
3.3.4 FRAP – Probenvorbereitung	41
3.3.5 FRAP – Lösungsherstellung.....	43
3.3.6 FRAP – Durchführung	44
3.4 MESSMETHODE GLUTATHION-/GLUTATHION-DISULFID-FLUORESZENZ	46
3.4.1 Glutathion/Glutathion-Disulfid.....	46
3.4.2 Glutathion-/Glutathion-Disulfid-Fluoreszenz – Chemikalien	46
3.4.3 Glutathion-/Glutathion-Disulfid-Fluoreszenz – Verwendete Geräte und Einstellungen.....	47
3.4.4 Glutathion-/Glutathion-Disulfid-Fluoreszenz – Probenvorbereitung	49
3.4.5 Glutathion-/Glutathion-Disulfid-Fluoreszenz – Lösungsherstellung	51
3.4.6 Glutathion-/Glutathion-Disulfid-Fluoreszenz – Durchführung.....	52
3.5 THIOLBESTIMMUNG MESSMETHODE.....	55
3.5.1 Thiolbestimmung im Plasma.....	55
3.5.2 Thiolbestimmung – Chemikalien.....	56
3.5.3 Thiolbestimmung – Verwendete Geräte und Einstellungen.....	56
3.5.4 Thiolbestimmung – Probenvorbereitung	58
3.5.5 Thiolbestimmung – Lösungsherstellung.....	59
3.5.6 Thiolbestimmung – Durchführung.....	60
3.6 AUSWERTUNG DER MESSDATEN.....	61
3.6.1 FRAP – Auswertung.....	62
3.6.2 Glutathion-/Glutathion-Disulfid-Fluoreszenz – Auswertung.....	63
3.6.3 Thiolbestimmung – Auswertung.....	65
3.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG	66
4. ERGEBNISSE.....	67

4.1 ANALYSE DER AUSGANGSWERTE – FRAUEN	67
4.1.1 FRAP Auswertung - Frauen.....	70
4.1.2 FRAP Korrelationen - Frauen.....	72
4.1.3 Glutathion Auswertung – Frauen	75
4.1.4 GSSG Auswertung – Frauen.....	76
4.1.5 GSH-GSSG-Ratio - Frauen.....	77
4.1.6 GSH-GSSG-Ratio Korrelationen – Frauen	79
4.2 THIOLE IN DER PH-GRUPPE – MÄNNER UND FRAUEN	80
4.3 AUSWERTUNG – MÄNNER UND FRAUEN.....	82
4.3.1 FRAP Auswertung – Männer und Frauen	83
4.3.2 FRAP Korrelationen – Männer und Frauen.....	85
4.3.3 GSH-GSSG-Ratio – Männer und Frauen	87
5. DISKUSSION.....	90
5.1 FRAP – FRAUEN	91
5.2 GSH/GSSG/GSH-GSSG-RATIO – FRAUEN	93
5.3 FRAP – MÄNNER UND FRAUEN.....	94
5.4 GSH/GSSG/GSH-GSSG-RATIO – MÄNNER UND FRAUEN	96
5.5 THIOLE IN DER PH-GRUPPE – MÄNNER UND FRAUEN	96
LIMITATIONEN UND VERBESSERUNGSVORSCHLÄGE	98
SCHLUSSBETRACHTUNG.....	99
ABSTRACT	101
ZUSAMMENFASSUNG.....	103
LITERATURVERZEICHNIS	105

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hallmarks of Aging (López-Otín et al., 2013)	14
Abbildung 2: Oxidativer Stress, Ungleichgewicht zwischen ROS und Antioxidantien (Liu et al., 2023)	20
Abbildung 3: Studienverlauf nach Phasen und Interventionsgruppen (Staltner, 2019)	32
Abbildung 4: Stufen der acht-wöchigen Trainingsintervention (Baron, 2021)	35
Abbildung 5: Trainingsprotokoll, S.1: Biofaktoren, Kniebeuge, Beinbeuger, Lastzug & Schulterdrücken (Baron, 2021)	36
Abbildung 6: Trainingsprotokoll, S.2: Beinpresse, Stütz, Rudern & Brustpresse (Baron, 2021)	36
Abbildung 7: FRAP Reaktionsmechanismus (Benzie & Strain, 1996)	38
Abbildung 8: Fe ²⁺ - Standardgerade zur Berechnung der FRAP-Konzentration [μmol/l]	62
Abbildung 9: Standardgerade zur Berechnung der GSH-Konzentrationen [μmol/l].	63
Abbildung 10: Standardgerade zur Berechnung der GSSG-Konzentrationen [μmol/l]	64
Abbildung 11: Standardgerade zur Berechnung der Thiol-Konzentrationen [μmol/l].	65
Abbildung 12: Aufteilung der Studienteilnehmer:innen nach Gruppenzuteilung in %	68
Abbildung 13: Proteinaufnahme in g/kg KG/d in den Gruppen zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 bei den Frauen	69
Abbildung 14: Verlauf der FRAP-Konzentration in μmol/l in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 bei den Frauen.	70
Abbildung 15: Korrelation zwischen FRAP [μmol/l] und der BMI [kg/m ²] zum Zeitpunkt T0	72
Abbildung 16: Korrelation zwischen FRAP [μmol/l] und der Fettmasse [kg] zum Zeitpunkt T0	73
Abbildung 17: Verlauf der GSH-Konzentration [μmol/l] in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 bei den Frauen.	75
Abbildung 18: Verlauf der GSSG-Konzentration [μmol/l] in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 bei den Frauen.	76
Abbildung 19: Verlauf des GSH-GSSG-Ratios in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2.	78
Abbildung 20: Thiol-Konzentrationen [μmol/l] in der PH-Gruppe zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2.	80
Abbildung 21: Verlauf der Thiol-Konzentrationen [μmol/l] in der PH-Gruppe zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2	81
Abbildung 22: Aufteilung der Studienteilnehmer:innen nach Gruppenzuteilung in %.	82
Abbildung 23: Verlauf der FRAP-Konzentrationen [μmol/l] in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2.	84
Abbildung 24: Verlauf GSH/GSSG-Ratio in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2.	88

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Wichtigsten ROS/RNS und ihre Entstehung (Robert Koch-Institut, 2008)	20
Tabelle 2: Chemische Reaktion - Umwandlung $O_2^\bullet$ durch SOD.....	23
Tabelle 3: Chemische Reaktion - Umwandlung H_2O_2 durch CAT.....	24
Tabelle 4: Chemische Reaktion - Umwandlung H_2O_2 durch GSH & Reduktion GSSG zu GSH.....	24
Tabelle 5: Thiole im menschlichen Blutplasma (Robert Koch-Institut, 2008).....	25
Tabelle 6: Redoxreaktion antioxidativer Moleküle (Robert Koch-Institut, 2008).....	26
Tabelle 7: Empfohlene Proteinaufnahme g/kg KG/d nach Altersgruppen entsprechend den DACH-Referenzwerten (DACH, 2017).....	28
Tabelle 8: Gruppenzuteilung für die Ernährungsintervention (Baron, 2021)	32
Tabelle 9: verwendete proteinreiche Lebensmittel zum Verzehr während der Ernährungsintervention (Baron, 2021)	34
Tabelle 10: Paarweise ausgeführte Übungen der Trainingsintervention (Staltner, 2019).....	35
Tabelle 11: Funktionelle Tests zur körperlichen Leistungsüberprüfung (Staltner, 2019)	37
Tabelle 12: Verwendete Chemikalien für die FRAP-Methode (Baron, 2021).....	38
Tabelle 13: Verwendetes Labormaterial für die FRAP-Methode (Baron, 2021).....	39
Tabelle 14: Softwareeinstellung für die FRAP-Methode (Baron, 2021).....	40
Tabelle 15: Verdünnungsreihe der Fe^{2+} -Standardgeraden (Baron, 2021).....	41
Tabelle 16: Verdünnungsreihe der Troloxkontrolle (Baron, 2021)	42
Tabelle 17: Lösungsherstellung und Lagerungshinweise für die FRAP-Methode (Baron, 2021).....	43
Tabelle 18: FRAP-Pipettierschema für die 96-Well Mikrotiterplatte (Baron, 2021).....	44
Tabelle 19: FRAP-Pipettierschema, Fe^{2+} -Standardlösung & Proben (Baron, 2021).....	45
Tabelle 20: FRAP-Pipettierschema, Trolox & Proben (Baron, 2021).....	45
Tabelle 21: Verwendete Chemikalien für die GSH-/GSSG-Methode (Baron, 2021).....	46
Tabelle 22: Verwendetes Labormaterial für die GSH- und GSSG-Analyse (Baron, 2021).....	47
Tabelle 23: Softwareeinstellungen der MARS Datenanalyse Software für die GSH- und GSSG-Analyse (Baron, 2021).....	48
Tabelle 24: Verdünnungsreihe GSH & Verdünnungsreihe GSSG (Baron, 2021)	49
Tabelle 25: Lösungsherstellung und Lagerungshinweise für die GSH- und GSSG-Analyse (Baron, 2021).....	51
Tabelle 26: GSH/GSSG Pipettierschema für die 96-well Befüllung (Baron, 2021).....	53
Tabelle 27: GSH-Pipettierschema, GSH-Standardreihe 1-6, Blank, Kontrolle & Proben (Baron, 2021).....	53
Tabelle 28: GSSG-Pipettierschema, GSSG-Standardreihe 1-6, Blank, Kontrolle & Proben (Baron, 2021).....	54
Tabelle 29: Verwendete Chemikalien für die Thiolbestimmung.....	56
Tabelle 30: Verwendetes Labormaterial für die Thiolbestimmung	56
Tabelle 31: Softwareeinstellungen der MARS Datenanalyse Software für die Thiolbestimmung	57
Tabelle 32: Thiolbestimmung - Herstellung GSH-Standardreihe.....	58
Tabelle 33: Lösungsherstellung und Lagerungshinweise für die Thiolbestimmung	59
Tabelle 34: Thiolbestimmung-Pipettierschema für 96-Well Mikrotiterplatte.....	60
Tabelle 35: Thiolbestimmung-Pipettierschema, Thiol-Standardreihe 1-6, Blank, Kontrolle & Proben	61
Tabelle 36: Anzahl der Studienteilnehmer:innen zu Beginn der Studie, aufgeteilt nach Geschlecht	67
Tabelle 37: Durchschnittliche Mittelwerte ausgewählter Parameter zum Untersuchungstermin T0 bei den Frauen.....	68
Tabelle 38: Darstellung der durchschnittlichen FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.	70
Tabelle 39: FRAP im Studienverlauf.....	71
Tabelle 40: Statistische Auswertung der Assoziation zwischen FRAP zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 in der PH-Gruppe	71
Tabelle 41: Korrelationen zwischen FRAP und anthropometrischen Messungen von T0.....	72
Tabelle 42: Korrelation zwischen FRAP und der Proteinzufuhr nach Gruppen zu den Messzeitpunkten T1 und T2	73
Tabelle 43: Korrelation zwischen FRAP und Harnsäure nach Gruppen zum Messzeitpunkt T0, T1 und T2	74
Tabelle 44: Korrelation zwischen FRAP und den funktionellen Parametern in allen Gruppen zum Messzeitpunkt T0.....	74
Tabelle 45: Darstellung der durchschnittlichen GSH-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.	75

Tabelle 46: GSH im Studienverlauf	76
Tabelle 47: Darstellung der durchschnittlichen GSSG-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.	76
Tabelle 48: GSSG im Studienverlauf.....	77
Tabelle 49: Statistische Auswertung der Assoziation zwischen GSSG zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 in der PL-Gruppe	77
Tabelle 50: Darstellung der durchschnittlichen GSH-GSSG-Ratios in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.....	77
Tabelle 51: GSH-GSSG-Ratio im Studienverlauf.....	78
Tabelle 52: Korrelation zwischen des GSH-GSSG-Ratio und den funktionellen Parametern in allen Gruppen zum Messzeitpunkt T0.....	79
Tabelle 53: Korrelation zwischen des GSH-GSSG-Ratio und den funktionellen Parametern in allen Gruppen zum Messzeitpunkt T0, T1 und T2.....	79
Tabelle 54: Darstellung der durchschnittlichen Thiol-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] in der PH-Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.	80
Tabelle 55: Thiole im Studienverlauf der PH-Gruppe.....	81
Tabelle 56: Darstellung der durchschnittlichen FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.	83
Tabelle 57: Darstellung der durchschnittlichen FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] nach Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.	83
Tabelle 58: FRAP im Studienverlauf.....	84
Tabelle 59: FRAP im Studienverlauf in der PH-Gruppe.....	85
Tabelle 60: FRAP zu den Messzeitpunkten T0, T1, T2 in der PH-Gruppe.....	85
Tabelle 61: Korrelation zwischen FRAP [$\mu\text{mol/l}$] und der Proteinaufnahme zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 für Männer und Frauen.....	85
Tabelle 62: Korrelation zwischen FRAP [$\mu\text{mol/l}$] und den anthropometrischen Messungen bei allen Gruppen zum Messzeitpunkt T0 für Frauen und Männer.	86
Tabelle 63: Korrelation zwischen FRAP [$\mu\text{mol/l}$], Harnsäure [mg/dl] und Kreatinin [mg/dl] zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 für Frauen und Männer.	86
Tabelle 64: Darstellung des durchschnittlichen GSH-GSSG-Ratio in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.....	87
Tabelle 65: Darstellung des durchschnittlichen GSH-GSSG-Ratios nach Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 Mittelwert und Std.-Abweichung.....	87
Tabelle 66: GSH-GSSG-Ratios nach dem Geschlecht	88

Folgende Tabellen wurden in Zusammenarbeit mit Ricarda Baron erstellt: Tab. 8, Tab. 9, Tab. 12, Tab. 13, Tab. 14, Tab. 15, Tab. 16, Tab. 17, Tab. 18, Tab. 19, Tab. 20, Tab. 21, Tab. 22, Tab. 23, Tab. 24, Tab. 25, Tab. 26, Tab. 27, Tab. 28.

V. Abkürzungsverzeichnis

•OH	Hydroxylradikal
AMP	Adenosin-Mono-Phosphat
ANCOVA	Analysis of Covariance
ANOVA	Analysis of Variance
Aqua dest.	Aqua destillata
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BMI	Body Mass Index
°C	grad Celsius
CAT	Katalase
CYP-450-System	Cytochrom-p450-System
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenin-Dinukletid
Fe	Eisen
FeSO ₄ *7H ₂ O	Eisen-(II)-sulfat-Heptahydrat
FFM	Fettfreien Körpermasse
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
GH	Wachstumshormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
H ⁺	Wasserstoff
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IGF	Insulinähnlicher-Wachstumsfaktor
IIS	Insulin- und IGF-1-Signalweg
K	Kontrolle

Kcal	Kilocalorie
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
m^2	Quadratmeter
ml	mililiter
mm	milimeter
mM	milimol
mmol	Millimol
MPS	Muskelproteinsynthese
mTOR	mammalian target of rapamycin
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Na_2HPO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NEM	N-Ethylmaleinimid
NF- κ B	nuclear factor-kappa B
nm	nanometer
O_2	Sauerstoff
$\text{O}_2^{\bullet -}$	Superoxidanionradikal
OPA	Phthaldialdehyd
μmol	micromol
μM	micromolar
μl	microliter
P1	Phase 1
P2	Phase 2
P3	Phase 3
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PH	Protein High
PL	Protein Low

RNS	Reaktive Nitrogen Species
ROS	reactive oxygen species
rpm	umdrehungen pro Minute
SH	Sulfhydryl
SOD	Superoxiddismutase
T0	1. Untersuchungstag
T1	Zwischenuntersuchung
T2	Abschlussuntersuchung
TPTZ	2,4,6-Tri-(2-pyridyl)-s-triazin
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure

1. Einleitung

Der Prozess der Alterung ist das Resultat biochemischer Mechanismen, deren Akkumulation im Laufe des Lebens zu beobachten ist. Dabei nimmt das Reparatur- und Regenerationspotenzial von Organen und Geweben kontinuierlich ab, was zur körperlichen Seneszenz führt. Dieser Prozess, der durch genetische, epigenetische und äußere Faktoren beeinflusst wird, betrifft alle Lebewesen und ist auf verschiedenen Ebenen des Organismus nachweisbar (Khan et al., 2017).

Die Bevölkerung weltweit wird zudem immer älter, weshalb die Altersforschung einen immer größeren Stellenwert in der Forschung einnimmt. In den kommenden Jahrzehnten wird die Zahl, der über 60-Jährigen weltweit deutlich ansteigen und bis 2050 die Zwei-Milliarden-Grenze überschreiten. Dieser demographische Wandel geht mit einer Zunahme chronischer Erkrankungen einher (Rudnicka et al., 2020). Daher ist es vor allem wichtig, die Altersprozesse besser zu verstehen, Biomarker dafür zu identifizieren und präventiv die Alterungsvorgänge zu verlangsamen.

Die biologischen Merkmale des Alterns umfassen genomische Instabilität, Telomerverkürzung, epigenetische Veränderungen und die Anhäufung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die Free Radical Theory of Aging erklärt die mit dem Alterungsprozess einhergehenden Merkmale. Die Menge an freien Radikalen nimmt mit steigendem Alter zu. Die dadurch verursachte oxidative Belastung spielt eine zentrale Rolle im Alterungsprozess. Diese kann den Verlust an Muskelmasse und -kraft, bekannt als Sarkopenie, verschlimmern und die Lebensqualität älterer Menschen beeinträchtigen (Behl & Ziegler, 2016). Besonders ältere Personen sollten auf eine ausreichende Proteinzufuhr achten, da Proteine eine entscheidende Rolle beim Erhalt der Muskelmasse, Kraft und Funktionalität spielen. Eine ausreichende Proteinzufuhr kann dem Muskelabbau entgegenwirken und die Funktionalität im Alter erhalten. Die DACH-Referenzwerte empfehlen für ältere Personen eine Proteinaufnahme von 1,0 g/kg Körpergewicht pro Tag (DACH, 2017). In der Fachliteratur wird jedoch ein Bedarf von bis zu 1,5 g/kg Körpergewicht pro Tag in Erwägung gezogen (Traylor et al., 2018). Eine proteinreiche Ernährung kann dazu beitragen, die antioxidativen Abwehrmechanismen des Körpers zu unterstützen und somit oxidativen Stress zu reduzieren. Dadurch kann sie zur Gesundheit und Langlebigkeit beitragen (Behl & Ziegler, 2016). Vor dem

Hintergrund einer immer älter werdenden Weltbevölkerung ist ein gesunder Lebensstil, zu dem eine ausgewogene Ernährung und regelmäßige körperliche Aktivität gehören, von zentraler Bedeutung.

Die vorliegende Masterarbeit untersucht die Auswirkungen einer erhöhten Proteinzufuhr auf das antioxidative Potenzial älterer Personen im Alter von 65 bis 85 Jahren im Rahmen der NutriAging Studie. Zusätzlich wurde ein achtwöchiges, angeleitetes Krafttraining durchgeführt. Die Plasmaproben der Proband:innen wurden mittels den folgenden Tests analysiert und die Ergebnisse ausgewertet. Die antioxidative Gesamtkapazität wurde mit dem von Benzie und Strain (1996) entwickelten Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) Tests bestimmt. Die hier beschriebene Methode ermöglicht eine direkte Bestimmung der antioxidativen Kapazität im Blutplasma. Sie basiert auf dem Prinzip des Single-Electron-Transfers, bei dem Fe^{3+} im sauren Milieu durch die in der zu untersuchenden Probe enthaltenen Antioxidantien zu Fe^{2+} reduziert wird. Dies führt zu einer blauen Farbveränderung. Die Farbänderung ist proportional zum Gehalt an elektronenübertragenden Antioxidantien und wird photometrisch bestimmt (Benzie & Strain, 1996).

In einer weiteren Analyse wurde der Gehalt an Glutathion bestimmt. Glutathion ist eine wichtige antioxidative Substanz, die in allen Zellen des Organismus sowohl in oxidierten (GSSG) als auch in reduzierter Form (GSH) vorkommt, in biologischen Geweben jedoch hauptsächlich als GSH. 1996 veröffentlichten Hissin und Hilf eine Methode zur Bestimmung der GSH-Konzentration im menschlichen Blutplasma, die auf den Fluoreszenzreagenzien o-Phthaldialdehyd (OPA) und N-Ethylmaleinimid (NEM) basiert. Aufgrund einer hohen Empfindlichkeit von OPA gegenüber GSH werden nur geringe Probenmengen benötigt (Hissin & Hilf, 1976).

Für die quantitative Bestimmung der Gesamttthiole im Plasma wurde der Fluorometric Thiol Quantitation Kit - MAK151 der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Thiolgruppen in Aminosäuren und Cysteinresten spielen eine wichtige Rolle im antioxidativen Schutz des Körpers. Sie neutralisieren reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen und sind an der Regeneration von oxidiertem Glutathion beteiligt. Enzyme wie Glutathionperoxidase und Glutathion-Disulfid-Reduktase unterstützen diesen Prozess, indem sie reaktive Peroxide in unschädliche Verbindungen umwandeln und die antioxidative Kapazität von Glutathion wiederherstellen (Robert Koch-Institut, 2008).

Die photometrischen Messungen wurden mit dem FLUOstar Optima Mikroplatten-Reader durchgeführt.

Die Durchführung der analytischen Laborarbeiten erfolgte in enger Zusammenarbeit mit Ricarda Baron. Diese Masterarbeit konzentriert sich jedoch spezifisch auf die Ergebnisse der weiblichen Probanden, während die männlichen Probanden in der Arbeit von Baron untersucht werden. Die Zusammenarbeit ermöglichte eine geschlechterspezifische Auswertung der Proben. Die Durchführung aller Laboranalysen sowie die Erstellung der Tabellen und Abbildungen (Tabelle 8, 9, 12–28, Abbildung 4) erfolgten ebenfalls in gemeinsamer Arbeit. Darüber hinaus wurde die statistische Auswertung in enger Abstimmung mit Ricarda Baron erstellt. weshalb es zu inhaltlichen und strukturellen Überschneidungen kommen kann. Trotz der Zusammenarbeit basieren beide Arbeiten jedoch auf jeweils eigenständigen Forschungsergebnissen und individuellen Analysen.

Im Rahmen dieser Arbeit werden neben der geschlechterspezifischen Auswertung auch die Ergebnisse aller Proband:innen zusammen betrachtet, um einen umfassenden Überblick über die antioxidativen Effekte in der gesamten Studienpopulation zu bieten.

2.Literaturübersicht

2.1 Alterstheorien

Das Altern ist ein natürlicher Prozess, der zu einem allmählichen Rückgang der Körperfunktionen führt. Dieser Prozess wird durch interne und externe Faktoren wie Genetik, Umwelt, Ernährung, Lebensstil und soziale Faktoren beeinflusst. Mit zunehmendem Alter erhöht sich das Risiko für Krankheiten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes, Krebs und neurodegenerative Erkrankungen. Diese Gesundheitsrisiken können die Lebensqualität und die Lebenserwartung erheblich beeinträchtigen. Die genauen Mechanismen des Alterns sind trotz umfangreicher Forschung immer noch nicht vollständig bekannt.

Im Jahr 2013 haben López-Otín et al. die neun *Hallmarks of Aging* beschrieben, die die Prozesse des Alterns im Organismus von Säugetieren darstellen. Charakteristisch für diese altersassoziierten Veränderungen ist, dass sie durch experimentelle Modifikationen beschleunigt oder verlangsamt werden können. Die Hallmarks of Aging lassen sich weiter in primäre, antagonistische sowie integrative Hallmarks unterteilen und stehen in einer hierarchischen Beziehung zueinander.

Die primären Hallmarks initiieren hauptsächlich unerwünschte Veränderungen wie DNA-Schäden, chromosomale Aneuploidien, Mutationen der mitochondrialen DNA, Telomerverkürzungen, epigenetische Veränderungen und den Verlust von Proteasen. Die daraus resultierenden kumulativen Schädigungen zellulärer Strukturen begünstigen oder beschleunigen die Prozesse der antagonistischen Hallmarks. Deren Mechanismen sind zwar primär für den Schutz des Organismus und die Kompensation der durch die primären Hallmarks verursachten Schäden verantwortlich, haben aber je nach Intensität auch negative Auswirkungen auf den Organismus und können zelluläre Seneszenz, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie Veränderungen der Nährstoffwahrnehmung und des Anabolismus begünstigen. Durch die Anhäufung dieser Schäden wird die Entwicklung von integrativen Hallmarks eingeleitet und die entstandenen Beeinträchtigungen können vom Organismus nicht mehr ausreichend kompensiert werden. Dies führt zu einer Erschöpfung der Stammzellen und zu Veränderungen in der Zellkommunikation, was wiederum einen direkten Einfluss auf die Gewebekomöostase hat (López-Otín et al., 2013).

Die von López-Otín et al. (2013) beschriebenen Hallmarks lassen sich in folgende Kategorien einteilen.

Abbildung 1: Hallmarks of Aging (López-Otín et al., 2013)



Genomische Instabilität

Die Stabilität der genomischen DNA wird ständig durch endogene und exogene Faktoren beeinflusst. DNA-Sequenzdefekte können durch äußere Faktoren wie UV-Strahlung, chemische, physikalische und biologische Substanzen sowie durch endogene Prozesse wie Replikationsfehler oder spontane Hydratationsreaktionen, während der Genexpression entstehen (Hoeijmakers, 2009). Zu den daraus resultierenden Schäden an der DNA gehören Punktmutationen, Translokationen, chromosomale Veränderungen und eine Verkürzung der Telomere. Der menschliche Körper verfügt über eine Vielzahl von DNA-Reparaturmechanismen, um die Integrität des Genoms zu gewährleisten und entstandene Schäden zu reparieren. Trotz dieser Schutzmechanismen kommt es im Laufe der Zeit zu einer Anhäufung genetischer Veränderungen, die den Alterungsprozess begünstigen können (López-Otín et al., 2013).

Telomer Verkürzung

Telomere sind sich wiederholende, nicht kodierende Sequenzen am Ende eukaryotischer Chromosomen mit einer Länge von etwa 200 bis 300 Basenpaaren. Mit jedem Zellzyklus verkürzen sich die Telomere, bis die Zelle schließlich in den Zustand der replikativen Seneszenz übergeht. Die Telomerlänge wird häufig als Indikator für das biologische Alter verwendet, da sie mit dem Hayflick-Potenzial korreliert, das ein Maß für die Reproduktionsfähigkeit ist (Schneider, 1979). Neben genetischen Faktoren sind auch Umweltbelastungen, freie Radikale und der Lebensstil an der Verkürzung der Telomere beteiligt (Toussaint et al., 2002).

Epigenetische Veränderungen

Epigenetische Veränderungen treten während des gesamten Lebens auf und können das Ergebnis genetischer Faktoren, des Lebensstils und der Exposition gegenüber Umweltfaktoren sein. Zu den Veränderungen epigenetischer Muster gehören DNA-Methylierungen, posttranslationale Histonmodifikationen und Chromatinmodulationen. Sie können in allen Zellen und Geweben auftreten. Die veränderten epigenetischen Muster können durch Enzymsysteme aufrechterhalten und an nachfolgende Generationen weitergegeben werden (Talens et al., 2012). Insbesondere epigenetische Veränderungen des Enzyms Sirtuin 6 beeinflussten die Langlebigkeit im Mausmodell. Generell kommt es in alternden Organismen zu natürlichen Veränderungen des Epigenoms. Es konnte festgestellt werden, dass sich der natürliche Alterungsprozess durch epigenetische Störungen zusätzlich beschleunigt (Mostoslavsky et al., 2006).

Verlust von Proteasen

Proteasen sind Enzyme, die zur korrekten Faltung, Stabilität und Funktion von Proteinen beitragen. Durch endogene sowie exogene Stressfaktoren kann es jedoch zu einer Denaturierung von Proteinen und in der Folge zu einem Funktionsverlust kommen. Hitzeschockproteine sind dafür verantwortlich, fehlgefaltete Polypeptide zurückzufalten und deren vollständigen Abbau durch Proteasen und Lysozyme zu gewährleisten. Störungen der Polypeptidrückfaltung oder des Autophagieprozesses können jedoch zu einer Anhäufung von geschädigten Komponenten mit proteotoxischer Wirkung führen. Während des normalen Alterungsprozesses können Beeinträchtigungen der Proteinhomöostase aufgrund von

Fehlfunktionen der Proteaseaktivität auftreten, die zur Akkumulation sowie Aggregation defekter Proteine beitragen und die Entwicklung von altersbedingten Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson und Katarakt begünstigen können (Powers et al., 2009).

Deregulierte Nährstoffwahrnehmung

Der Insulin- / Insulin-Growth-Factor-1-Signalweg (IIS) ist maßgeblich an der Steuerung der Nährstoffhomöostase, des Wachstums, des Alterns und der Langlebigkeit eines Organismus beteiligt. Er besteht aus dem von der Hypophyse produzierten Wachstumshormon (GH) und dem Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor (IGF-1), dessen Bildung durch GH stimuliert und reguliert wird. Der Einfluss des IIS auf die Verlängerung der Lebensspanne wurde erstmals beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* identifiziert, bei dem genetische Polymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms), Mutationen der Forkhead-BOX-Protein-Transkriptionsfaktoren, eine Herunterregulation des Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) und eine Kalorienrestriktion die Plasmakonzentration von IGF-1 verminderten. Die damit verbundene Dysfunktion des IIS wurde mit einer Verlängerung der Lebensspanne in Verbindung gebracht, da die durch mTORC-Hemmung reduzierte IIS-Aktivität zu erhöhten AMP-aktivierte Proteinkinase und Sirtuin-Konzentrationen führte, die einen gesunden Alterungsprozess unterstützen (Fontana et al., 2010). Während des regulären Alterungsprozesses kommt es jedoch auch zu einer natürlichen Abnahme der GH- und IGF-1-Konzentrationen und zu einer Reduzierung des IIS, was charakteristisch für physiologische Alterungsprozesse ist. Die dauerhafte Herunterregulation des IIS konnte mit einer verlängerten Lebensdauer in Verbindung gebracht werden (Garinis et al., 2008).

Mitochondriale Dysfunktion

Während des Alterungsprozesses führen ein erhöhter Elektronenverlust und eine verminderte Adenosintriphosphat(ATP)-Produktion zu einer mitochondrialen Dysfunktion (Green et al., 2011), wodurch vermehrt ROS gebildet werden und häufiger zelluläre Schäden auftreten. In der biomedizinischen Alternsforschung konnte gezeigt werden, dass eine gesteigerte Produktion von ROS in bestimmten Organismen, wie in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* und in Hefen, die Lebenserwartung verlängern kann (van Raamsdonk & Hekimi, 2009). Ergebnisse aus Mäusestudien von Pérez et al., in denen durch gezielte Mutationen die Überexpression antioxidativ wirksamer Enzyme induziert wurde, zeigten jedoch keine

verbesserte Schutzwirkung oder Lebensverlängerung (Pérez et al., 2009). Allerdings kann die Bildung von ROS zur Förderung der Zellproliferation und damit zur Sicherung des Überlebens des Organismus durch bestimmte physiologische Signale und Stressbedingungen gesteigert werden. Mit zunehmendem Alter wird diese Homöostase jedoch gestört, was zu einer Akkumulation altersbedingter Zellschäden durch erhöhte ROS-Werte führt (Hekimi et al., 2011).

Zelluläre Seneszenz

Zelluläre Seneszenz beschreibt einen Zustand, in dem das Wachstum und die Funktion von Zellen bereits eingeschränkt sind und es zu einer Anhäufung seneszenten Zellen kommt. Dieser dysfunktionale Zustand ist gewebespezifisch und kann durch bestimmte Enzyme wie Senesence-associated β -Galactosidase nachgewiesen werden (Dimri et al., 1995). Der Mechanismus der körpereigenen Zellalterung diente ursprünglich dazu, geschädigte oder kanzerogene Zellen durch Phagozytose des Immunsystems zu eliminieren. Mit zunehmendem Alter nimmt jedoch die Neubildung von Ersatzzellen ab, was dazu führen kann, dass seneszente Zellen aufgrund einer fortschreitenden Immunseneszenz nicht mehr in ausreichendem Maße phagozytiert werden. Erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen und Matrix-Metalloproteinkinasen in seneszenten Zellen können negative Effekte auf den Organismus haben (Rodier & Campisi, 2011).

Stammzellen Erschöpfung

Mit dem Alter treten Veränderungen auf, die eine verminderte Bildung von Stammzellen zur Folge haben, was als eines der wesentlichen Merkmale des Alterns eines Organismus angesehen wird. Stammzellen sind nahezu unbegrenzt teilungsfähige Zellen, die sich in verschiedene Gewebe und Organe differenzieren können und an deren Reparatur und Regeneration mitwirken.

Hämatopoese ist der Prozess, der die Blutstammzellbildung reguliert. Eine verminderte Hämatopoese im Alter führt zu einer verminderten Anzahl von Blutstammzellen und damit zu einer reduzierten Bildung adaptiver Immunzellen. Dies kann eine Immunseneszenz begünstigen, worunter ein altersbedingter Funktionsverlust des Immunsystems verstanden wird. Die altersbedingte Schwächung des Immunsystems kann eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen, Entzündungen, Anämie und Tumorerkrankungen zur Folge haben. Daher ist es

von Bedeutung, die Blutbildung und Immunfunktion im Alter zu unterstützen, um Gesundheit und Lebensqualität zu verbessern (Shaw et al., 2010).

Veränderung der interzellulären Kommunikation

Als *Inflammaging* werden Veränderungen der endokrinen, neuroendokrinen und neuronalen interzellulären Kommunikation bezeichnet, die zu Störungen der neurohormonalen Signalübertragung beitragen und das Risiko für Entzündungsreaktionen erhöhen. Dieser proinflammatorische Phänotyp ist charakteristisch für die normale Alterung des Organismus und trägt zur Entstehung von Adipositas, Diabetes mellitus Typ 2 und Arteriosklerose (Barzilai et al., 2012); (Tabas, 2010) bei. Neben einem dysfunktionalen Immunsystem führt Inflammaging auch zu einer Anhäufung von entzündungsfördernden Gewebeschäden und seneszenten Zellen (Salminen, 2012).

Die Mechanismen des NF- κ B-Signalwegs im Hypothalamus, der die Expression verschiedener proinflammatorischer Gene induziert und auch an der Regulation von Inflammasomen beteiligt ist, sowie der Vorgang der Produktion des Gonadotropin-Releasing-Hormons (GnRH) können durch Lebensstilfaktoren beeinflusst werden. Stress und Entzündungen beschleunigen den Alterungsprozess. Sie führen zu einer Überaktivierung des NF- κ B-Signalwegs und zu einer Hemmung der GnRH-Produktion. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass sich durch die Inhibition des NF- κ B-Signalweges und die Behandlung mit GnRH eine Alterungsverzögerung erreichen ließ (López-Otín et al., 2013).

2.2 Physiologische Veränderungen während des Alterns

Mit zunehmendem Alter kommt es zu natürlichen Veränderungen im Organismus hinsichtlich Körperzusammensetzung, Stoffwechsel und Appetit, die insbesondere bei älteren Menschen mit chronischen Erkrankungen das Risiko einer Mangelernährung erhöhen und zu funktionellen Einschränkungen führen können. Insbesondere eine ausreichende Eiweißzufuhr und regelmäßige Bewegung können helfen, diese Verluste auszugleichen und die körperliche Funktionsfähigkeit aufrechtzuerhalten (Bauer, 2011).

Etwa ab dem dreißigsten Lebensjahr nimmt die fettfreie Körpermasse kontinuierlich ab und das Gesamtkörperfett zu. Das bedeutet, dass ein über 65-jähriger Mann aufgrund dieser metabolischen Veränderungen fast doppelt so viel Körperfett hat wie ein 20-Jähriger (Goodpaster et al., 2006). Darüber hinaus kommt es zu einer Umverteilung der Fettdepots mit der Bildung von intrahepatischen, intraabdominalen und muskulären Depots. Ab dem siebzigsten Lebensjahr verliert der Mensch, auch bedingt durch eine unzureichende Energie- und Proteinzufuhr, durchschnittlich 1 % der gesamten Skelettmuskelmasse pro Jahr (Bauer et al., 2008).

Altersbedingte Appetitlosigkeit, verursacht durch Veränderungen des appetitregulierenden Hormons Ghrelin, kann in einer unzureichenden Kalorienaufnahme und damit in einer Gewichtsabnahme resultieren (Bauer et al., 2010). Die Folgen sind eine katabole Stoffwechsellage und die Notwendigkeit einer erhöhten Kalorienzufuhr zur Aufrechterhaltung des Körpergewichts. Bei Erkrankungen, die Gewichtsverluste verursachen, ist die Abnahme an Muskelmasse stärker ausgeprägt als bei jungen Erwachsenen (Kortebein et al., 2008). Daher ist es für die frühzeitige Erkennung einer Mangelernährung und für präventive Maßnahmen bedeutsam, das Gesamtkörpergewicht älterer Menschen zu bestimmen. Aus diesem Grund wurde von der European Society for Clinical Nutrition and Metabolism ein neuer Body-Mass-Index(BMI)-Grenzwert von 20 kg/m^2 für Personen ab 65 Jahren festgelegt.

Eine weitere Herausforderung stellt die Alterung der Sinnesorgane dar: Durch Veränderungen von Hormonen wie Testosteron und Wachstumshormon kann die Empfindlichkeit für Geschmack und Geruch nachlassen (Bauer et al., 2010). Dies kann zu einer verminderten Nahrungsaufnahme und damit zu einer Unterversorgung mit Nährstoffen führen. Um dies zu vermeiden, können eine ansprechende Präsentation der Speisen und die Verwendung von Gewürzen sowie Aromastoffen zur Verbesserung des Geschmacks hilfreich sein.

Zur Optimierung von Gesundheit und Lebensqualität älterer Menschen ist die Berücksichtigung von Ernährung und Bewegung im Alter relevant. Eine Verbesserung kann erreicht werden, indem geregelte Mahlzeiten mit ausreichender Kalorien- und Eiweißzufuhr sowie körperliche Aktivität in den Alltag integriert werden. Für eine individuelle Beratung über gesunde Ernährung und Bewegung im Alter kann die Konsultation ärztlichen Fachpersonals oder Diätassistent:innen hilfreich sein. Soziale Kontakte und geistige Aktivität können ebenfalls zur Verbesserung der Gesundheit und Lebensqualität im Alter beitragen.

2.3 Freie Radikale und Oxidativer Stress

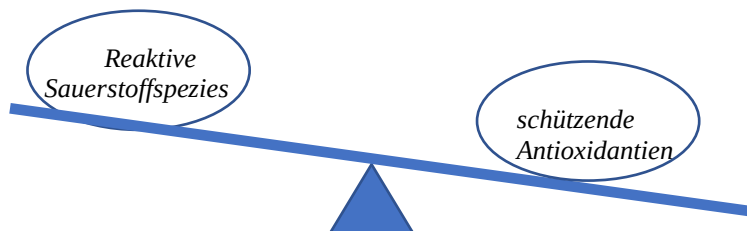


Abbildung 2: Oxidativer Stress, Ungleichgewicht zwischen ROS und Antioxidantien (Liu et al., 2023)

Oxidativer Stress entsteht durch eine Anhäufung von ROS, die auf ein Ungleichgewicht in Bezug auf die Bildung und des Abbaus von ROS durch endogene antioxidative Schutzsysteme und Antioxidantien zurückzuführen ist. Bei ROS handelt es sich um hochreaktive Moleküle oder Atome mit einem ungepaartem Elektron in der äußeren Atomhülle. Sie entstehen als Nebenprodukte sowie während verschiedener Stoffwechselprozesse im Organismus und agieren als Auslöser für oxidativen Stress, wodurch es zu irreversiblen Schäden in zellulären Struktur von Proteinen, Fetten und Nukleinsäuren kommen kann (Wu et al., 2013).

Die bedeutendsten ROS und wie sie entstehen sind in Tabelle 1 angeführt:

Tabelle 1: Wichtigsten ROS/RNS und ihre Entstehung (Robert Koch-Institut, 2008)

ROS/RNS		Entstehung	Entgiftungsreaktion
Superoxidiondaradikal	$O_2^{\bullet-}$	$O_2 + e \rightarrow O_2^{\bullet-}$	<i>Oxidoreduktasen/ Oxygenase</i>
Wasserstoffperoxid	H_2O_2	$2 O_2^{\bullet-} + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$	<i>Superoxiddismutase</i>

Hydroxyradikal	OH•	1. $O_2\bullet + Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ 2. $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH\bullet$	<i>Fenton-/Haber- Weiss-Reaktion</i>
Stickoxidradikal	NO•	Arginin + O_2 + NADPH → Citullin + NO• + NADP ⁺	<i>Stickstoffmonoxid- Synthase (eNOS)</i>
Peroxinitrit-Anion	ONOO ⁻	$O_2\bullet^- + NO\bullet \rightarrow ONOO^-$	<i>Superoxiddismutase</i>

2.3.1 Endogen Bildung von ROS/RNS:

Die endogene Produktion von ROS bezieht sich auf die natürliche Erzeugung von Sauerstoffradikalen innerhalb von Zellen und Organismen. Bei ROS handelt es sich um instabile, elektrisch geladene Moleküle, die durch den Transfer von Sauerstoffatomen an andere Moleküle entstehen und hauptsächlich im Zuge enzymatischer sowie nicht enzymatischer Stoffwechselprozesse gebildet werden.

Eine bedeutende Quelle von ROS ist die mitochondriale Atmungskette, die für den Stoffwechsel von Zellen verantwortlich ist und bei der ATP, durch die Oxidation von Sauerstoff und Nahrungsmittelverbindungen wie Glukose, produziert wird. Während dieses Prozesses wird das Superoxidanionradikal ($O_2\bullet^-$) bei der Oxidation von Nicotinamid Adenin Dinucleotid Hydrid (NADH) zu Nicotinamidadenindinukleotid (NAD^+) in Enzymkomplex I und III gebildet. $O_2\bullet^-$ wird von der Superoxid-Dismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entgiftet. Dieses H_2O_2 wird dann durch Reduktion von Eisen(III) (Fe^{3+}) durch Eisen(II) (Fe^{2+}) in der Fenton-Reaktion zum Hydroxylradikal ($\bullet OH$) reduziert.

Sauerstoffradikale werden jedoch auch durch zahlreiche andere enzymatische Stoffwechselprozesse produziert, beispielsweise durch die intrazelluläre Immunabwehr mittels NADPH-Oxidase, durch den Purin-Abbau über die Xanthin-Oxidase und durch andere oxidative Entgiftungsprozesse über das Cytochrom-p450-System (CYP-450-System). Weitere

endogene Quellen von ROS sind die peroxisomale Lipid- und Proteinoxidation (Gossiau & Rensing, 2002).

2.3.2 Exogene Quellen für ROS/RNS:

Die exogene Entstehung von ROS und deren Metaboliten bezieht sich auf die Produktion durch externe Faktoren wie Schwermetalle (Cadmium, Quecksilber, Blei, Eisen und Arsen), Umweltschadstoffe, Medikamente, chemische Lösungsmittel, Zigarettenrauch, Alkohol, UV-Strahlung oder auch einen ungesunden Lebensstil (Phaniendra et al., 2015). Die erhöhte Bildung von ROS durch exogene Quellen kann zu Zell- und Gewebeschäden sowie zur Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes und bestimmten Krebsarten beitragen. Es ist jedoch zu beachten, dass freie Radikale in ausreichender Konzentration essenzielle Funktionen im Organismus erfüllen. Sie tragen zur Aufrechterhaltung von Zellstrukturen sowie Signalwegen bei und sind an der Regulation von Zellfunktionen beteiligt. Eine gestörte Synthese von ROS/RNA, z. B. durch eine eingeschränkte Aktivität der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat(NADPH)-Oxidase, führt dagegen u. a. zu einer verminderten Immunabwehr gegenüber Krankheitserregern. Eingeschränkte Immunfunktionen finden sich auch bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen (Pizzino et al., 2017).

Daher ist es von Bedeutung, dass der Organismus über Mechanismen verfügt, um die Menge an ROS in einem gesunden Gleichgewicht zu halten und Schäden durch exogene Quellen von ROS zu minimieren. Dies kann sowohl durch enzymatische Schutzmechanismen erreicht werden, die freie Radikale abbauen, als auch dadurch, dass die Exposition gegenüber ROS erzeugenden Faktoren reduziert wird.

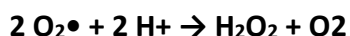
2.4 Anti-oxidative Schutzsysteme und Antioxidantien

Um die Homöostase zwischen der Bildung und dem Abbau von freien Radikalen zu sichern, hat der Organismus im Laufe der Evolution antioxidative Schutzsysteme entwickelt. Diese umfassen eine Vielzahl von Substanzen und Enzymen mit antioxidativer Wirkung, die als Redox-Partner für die Übertragung von Elektronen fungieren (Nimse & Pal, 2015). Antioxidantien können in enzymatische und nicht enzymatische unterteilt werden, die sich hinsichtlich ihrer Zellkompartimente und Wirksamkeit unterscheiden, sich jedoch in ihrer Wirkung ergänzen können (Petruk et al., 2018).

2.4.1 Enzymatische Antioxidantien

Das endogene Schutzsystem des Organismus beinhaltet enzymatische Antioxidantien, die dazu beitragen, ROS und Reaktive Nitrogen Species (RNS) in „harmlosere“ Moleküle umzuwandeln. Dazu gehören die SOD, die Enzymklasse der Katalase, Glutamylnitroreductase und das Glutathion(GSH)-System. Es existieren drei Arten von SOD, die im Mitochondrium, im Zellplasma und außerhalb der Zelle vorkommen. Diese Enzyme katalysieren Disproportionierungsreaktionen, bei denen ein Superoxidanionradikal ($O_2^{\bullet-}$) in Anwesenheit eines zweiten Radikals durch SOD oxidiert wird, wodurch H_2O_2 gebildet wird.

Tabelle 2: Chemische Reaktion - Umwandlung $O_2^{\bullet-}$ durch SOD



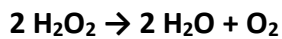
(Mccords & Fridovich, 1969)

Die Aktivität der SOD korreliert gemäß der Theorie der freien Radikale des Alterns mit dem biologischen Alter des Organismus. Es ist jedoch bekannt, dass auch bestimmte pathologische Zustände wie Krebserkrankungen die Funktion und Produktion dieser Enzyme beeinträchtigen können (Mccords & Fridovich, 1969).

Die Katalase (CAT) ist ein Enzym, das in eukaryotischen Zellen vorkommt und an der Reduktion von H_2O_2 beteiligt ist. Sie gehört zur Familie der Hydroperoxidasen und katalysiert die Umwandlung von H_2O_2 zu Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O) durch Disproportionierung (Brandt, 2014). Die CAT ist hauptsächlich in den Peroxisomen von Leberzellen und Erythrozyten lokalisiert, kommt aber auch im Zellplasma vor. Sie übernimmt eine Vielzahl von Aufgaben in eukaryotischen Zellen, wie die Detoxifikation von H_2O_2 , das während der

Lipidoxidation in den Peroxisomen entsteht. Zudem trägt sie dazu bei, Proteine mit freien Sulfhydryl(SH)-Gruppen und Hämoglobin-Moleküle vor oxidativem Stress zu schützen, indem sie ROS und RNS abbaut. Durch ihre katalysierende Aktivität unterstützt die CAT somit beim Schutz von Zellen und Geweben vor oxidativem Stress (Vlasits et al., 2010).

Tabelle 3: Chemische Reaktion - Umwandlung H_2O_2 durch CAT

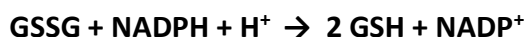


(Vlasits et al., 2010)

Bei der katalysierten Reaktion handelt es sich ebenso um eine Disproportionierungsreaktion. Dabei kann das Wasserstoffperoxidmolekül gleichzeitig als schwaches Reduktionsmittel und als starkes Oxidationsmittel agieren. Die Katalase spaltet H_2O_2 in Wasser- und Sauerstoffmoleküle (Vlasits et al., 2010).

Das GSH-System umfasst die Glutathion-Peroxidase sowie die Glutathion-Disulfid-Reduktase und ist eines der effizientesten endogenen antioxidativen Schutzsysteme. Abhängig vom Subtyp reduziert die Glutathion-Peroxidase in einem Redoxzyklus – mit Selen als Cofaktor – GSH in Anwesenheit von Peroxiden zu H_2O und Glutathion-Disulfid (GSSG).

Tabelle 4: Chemische Reaktion - Umwandlung H_2O_2 durch GSH & Reduktion GSSG zu GSH



(Seiler et al., 2008)

Bei der Glutathion-Disulfid-Reduktase handelt es sich hingegen um eine Oxidoreduktase, die in Anwesenheit eines FAD-Cofaktors GSSG wieder zu GSH reduziert (Seiler et al., 2008).

Zum endogenen antioxidativen Schutzsystem gehören außerdem Bilirubin, Harnsäure, Thiolgruppen und Albumin. Albumin und Harnsäure können freie Radikale abbauen sowie Kettenreaktionen der Radikalbildung unterbrechen und sind für insgesamt 85 % der antioxidativen Kapazität des Plasmas verantwortlich (Wu et al., 2013). Thiolgruppen sind ebenfalls ein wesentlicher Bestandteil des körpereigenen antioxidativen Systems.

Thiole sind organische Verbindungen mit mindestens einer schadstoffbindenden SH-Gruppe und integraler Bestandteil des antioxidativen Systems im menschlichen Körper. Sie kommen in Enzymen, Aminosäuren wie Cystein, Proteinen und Peptiden wie GSH vor. Im menschlichen

Plasma machen Thiole mit hohem Molekulargewicht wie das Humane Mercaptalbumin ca. 70-80% der Thiolgruppen aus, überwiegend in reduzierter Form. Im Gegensatz dazu liegen niedermolekulare Thiole hauptsächlich in oxidierten Form vor. Die verschiedenen Formen der Thiolgruppen spielen eine entscheidende Rolle in der komplexen Struktur des antioxidativen Netzwerks im Körper. Ein hoher Thiolgehalt gilt als Schutzmechanismus gegen freie Radikale, während ein niedriger Gehalt mit einem erhöhten Risiko für DNA-Schäden, Arteriosklerose und Tumorbildung in Verbindung gebracht wird. Menschen mit chronischen Erkrankungen weisen häufig niedrigere Thiolwerte auf als gesunde Menschen, wobei diese Werte auch mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren (Turell et al., 2013).

Thiolgruppen können direkt mit ROS und reaktiven RNS unter reversibler Bildung von Disulfidbrücken reagieren. Indirekt sind sie über Enzyme wie die Glutathionperoxidase (GPx) an der Entgiftung von Peroxiden und Peroxynitrit beteiligt. Oxidierte Thiolgruppen können durch Enzyme, insbesondere die Glutathion-Disulfid-Reduktase und die Thioreduktase, regeneriert werden (Robert Koch-Institut, 2008).

Tabelle 5: Thiole im menschlichen Blutplasma (Robert Koch-Institut, 2008)

Humanes Mercaptalbumin
Andere Protein-Thiole
Freies Cystein
Homocystein
Glutathion & Gamma-Glutamylcystein (Vorstufe zu Glutathion)
Cysteinglycin
Schwefelwasserstoff (in sehr geringen Konzentrationen)

2.4.2 Nicht enzymatische Antioxidantien

Nichtenzymatische Antioxidantien sind überwiegend exogene, mit der Nahrung aufgenommene Substanzen wie Mineralstoffe und Vitamine. Wichtige Vertreter exogener Antioxidantien sind Vitamin C und E, Thiole, GSH, das Chininderivat Ubichinon, Carotinoide, Übergangsmetalle und einige Spurenelemente. Im Vergleich zu Enzymen müssen antioxidative Moleküle nach ihrem Verbrauch als Redoxpartner regeneriert werden, was einen wesentlichen Unterschied in der Wirkungsweise darstellt (Robert Koch-Institut, 2008). Darüber hinaus reagieren die verschiedenen antioxidativen Moleküle mit unterschiedlichen ROS und RNA, wie in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Redoxreaktion antioxidativer Moleküle (Robert Koch-Institut, 2008)

Antioxidans	ROS/RNS - Wirkungsweise
Carotinoide	Singulett Sauerstoff
Ubichinon	In Membranen, Interaktion mit Vitamin E
Vitamin E	Lipidoxidation unter Bildung eines α -Tocopherol-Radikals
Vitamin C	Regeneration von Vitamin E
Glutathion	Regeneration von Vitamin C
Pentose-Phosphat Weg	Recycling des oxidierten Glutathion als Glutathion-Disulfid mit Wasserstoffen

Tocopherol (Vitamin E) verhindert als lipophiles Antioxidans als *Quencher* insbesondere die Oxidation von Zellmembranlipiden sowie Plasmalipoproteinen. Während der Lipidperoxidation werden vor allem Peroxyl- und Alkoxy-Radikale gebildet, die bevorzugt mit Vitamin E unter der Bildung eines α -Tocopherol-Radikals reagieren, das in weiterer Folge durch einen Elektronentransfer von Vitamin C wieder regeneriert werden kann.

Eines der stärksten Reduktionsmittel ist die Ascorbinsäure (Vitamin C). Das wasserlösliche Antioxidans ist besonders effizient bei Scavengern von freien Radikalen und reagiert direkt mit Superoxid- sowie Hydroxylradikalen. Zudem ist eine der bedeutendsten Funktionen des Moleküls die Regenerierung des α -Tocopherol-Radikals unter der Oxidation zu Dehydroascorbinsäure. In weiterer Folge kann Letztere in einem Redoxzyklus durch GSH wieder zu Ascorbinsäure reduziert werden.

Für den Erhalt der zellulären Redoxhomöostase spielen insbesondere Thiole eine bedeutende Rolle, da sie als Redoxpuffer agieren. Thiole enthalten eine SH-Gruppe und sind an der Regulation der Thiol-Disulfid-Zusammensetzung beteiligt. Zu den relevantesten Vertretern gehören auch GSH sowie Glutathiondisulfid, auf die in dieser Arbeit noch intensiver eingegangen wird.

Glutathion setzt sich aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin zusammen und spielt eine entscheidende Rolle beim antioxidativen Schutz sowie bei einer Vielzahl von biochemischen Prozessen. Es stellt ein bedeutsames Redoxsystem im Organismus dar und kommt in besonders hohen Konzentrationen in den Erythrozyten vor. Eine durch die Glutathionperoxidase (GPx) katalysierte Reaktion ermöglicht die Reduktion von Wasserstoffperoxid sowie weiteren Peroxiden durch GSH. Dabei wird GSH zu Glutathion-Disulfid (GSSG) oxidiert (Anderson, 1998). Zusätzlich fungiert GSH als Scavenger von $\text{OH}\cdot$ sowie $\text{O}_2\cdot^-$ und besitzt die Fähigkeit, Tocopherol- und Ascorbatradikale zu reduzieren (Elmadfa & Leitzmann, 2023).

2.5 Proteinaufnahme im Alter

Über die mit der Nahrung aufgenommenen Proteine werden dem Organismus lebenswichtige Moleküle wie Stickstoff und Aminosäuren zur Verfügung gestellt. Eine adäquate Proteinaufnahme gewährleistet die Muskelproteinsynthese (MPS), insbesondere über die Aminosäure Leucin, die den Signalweg der Muskelsynthese stimuliert. Durch eine zu geringe Proteinaufnahme kann diese gehemmt und der Muskelabbau gefördert werden (Duan et al., 2016).

Mit zunehmendem Alter kommt es aufgrund physiologischer Veränderungen zu einem erhöhten Bedarf an Proteinen, sodass einer altersassoziierten Muskelabnahme und der Entstehung einer Sarkopenie entgegengewirkt werden kann, da sich aufgrund einer negativen Bilanz in der Proteinaufnahme eine Abnahme der FFM und eine anabolische Resistenz manifestieren können (Richter et al., 2019). Letzteres zeichnet sich durch eine verminderte MPS bei anabolischer Stimulation aus und kann zusätzlich durch Entzündungen, eine Insulinresistenz sowie eine verminderte postprandiale Verfügbarkeit von Aminosäuren gefördert werden. In Studien ließ sich bei der postprandialen MPS ein altersbedingter Effekt

beobachten. Für die Stimulation der postprandialen MPS benötigen Senior:innen über 65 Jahre eine höhere Proteinaufnahme als junge Erwachsene (Burd et al., 2013).

Ebenso kann zusätzlich zum Alter aufgrund chronischer Erkrankungen eine erhöhte Proteinzufuhr erforderlich sein, um den erhöhten Stoffwechselbedarf und die damit einhergehenden katabolischen Effekte auszugleichen. Die Empfehlungen für die tägliche Proteinzufuhr für gesunde Menschen ab 65 Jahren wurden angepasst und ein Schätzwert von 1 g pro kg Körpergewicht etabliert, jedoch ist es aufgrund der Art und Schwere verschiedener Vorerkrankungen sowie unterschiedlicher Körperzusammensetzungen schwierig, eine allgemeine Empfehlung für die tägliche Proteinaufnahme für gesunde Menschen ab 65 Jahren auszusprechen (Richter et al., 2019).

Tabelle 7: Empfohlene Proteinaufnahme g/kg KG/d nach Altersgruppen entsprechend den DACH-Referenzwerten (DACH, 2017)

Alter	g / kg KG / Tag	g / Tag
19 bis unter 51 Jahre	0,8	57 / 58
51 bis unter 65 Jahre	0,8	55 / 47
Ab 65 Jahren	1,0	67 / 57

Auch die Verzehrmenge, die Proteinqualität und der Zeitpunkt der Aufnahme spielen eine entscheidende Rolle. Studien zur Proteinzufuhr älterer Menschen haben gezeigt, dass in einer Gemeinschaft lebende ältere Personen durchschnittlich 1 g Protein pro kg Körpergewicht am Tag zu sich nehmen. Im Vergleich dazu liegt die tägliche Aufnahme von in Pflegeheimen lebenden älteren Personen und geriatrischen Patient:innen unter 0,8 g Protein pro kg Körpergewicht (Tieland et al., 2015).

Um einer anabolen Resistenz vorzubeugen, sollte auch die Verteilung der Proteinmenge pro Mahlzeit angepasst werden. Eine Studie von Murphy et al. zeigte 2016, dass sich eine gleichmäßige Verteilung von 25 bis 30 g Protein pro Mahlzeit bzw. 0,4 g pro kg Körpergewicht pro Mahlzeit günstig auf den Erhalt der Muskelmasse auswirkt. Allerdings basiert der Schwellenwert für die maximale Stimulation der MPS in der Regel auf Untersuchungen mit isolierten Proteinen. Es ist jedoch davon auszugehen, dass der tatsächliche Schwellenwert für die MPS-Sättigung bei gemischten Mahlzeiten höher liegt. Es wird angenommen, dass eine erhöhte Proteinzufuhr den Muskelproteinabbau stärker unterdrücken kann, insbesondere

durch Insulinsekretion, selbst wenn der Punkt der MPS-Sättigung bereits erreicht ist (Murphy et al., 2016).

Eine erhöhte Proteinzufuhr könnte bei älteren Menschen über den Sättigungspunkt hinaus einen größeren Nettozuwachs an Muskelprotein begünstigen. Dies liegt daran, dass die postprandiale insulinvermittelte Regulation des Muskelproteinumsatzes mit zunehmendem Alter beeinträchtigt sein könnte. Es ist zu beachten, dass die unterdrückende Wirkung von essenziellen Aminosäuren auf den Muskelproteinabbau sogar über die Wirkung von Insulin hinausgeht. Ob eine Proteinzufuhr pro Mahlzeit von $\geq 0,4$ g pro kg Körpergewicht) langfristig zu einem besseren Erhalt der Muskelmasse bei Personen mittleren und höheren Alters führen kann, ist jedoch noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen (Smeuninx et al., 2020). Die Ergebnisse der NHANES-Studie mit Proband:innen im Alter von 50 bis 85 Jahren zeigten, dass eine Aufnahme von 30 bis 45 g Protein zu 2 Hauptmahlzeiten die Magermasse der Beine erhöhte sowie die Kniestreckkraft steigerte (Loenneke et al., 2016). Eine Strategie, um die Proteinaufnahme bei älteren Personen zu erhöhen, wäre es, Milchprodukte ins Frühstück zu integrieren, da zu dieser Mahlzeit tendenziell am wenigsten Protein aufgenommen wird (Tieland et al., 2015).

Neben der Proteinmenge und der Verteilung auf die einzelnen Mahlzeiten spielt auch die Aminosäurezusammensetzung eine entscheidende Rolle hinsichtlich der postprandialen MPS, insbesondere der Gehalt der Aminosäure Leucin. Hier eignen sich vor allem Molkeprodukte, da diese reich an Leucin sind sowie eine schnelle Verdauungs- und Absorptionskinetik aufweisen. Da pflanzliche Proteine meist eher arm an Leucin, Lysin und Methionin sind, empfiehlt sich eine Kombination aus pflanzlichen Proteinen, z. B. Getreideprodukte und Hülsenfrüchte, mit tierischen Proteinen mit komplementären Aminosäureprofilen, um die anabolen Eigenschaften einer Mahlzeit zu verbessern (Berrazaga et al., 2019; Gorissen & Witard, 2018).

2.6 Physiologische Veränderungen und Muskelaufbau im Alter

Zwischen dem 20. und dem 85. Lebensjahr verliert der Mensch ca. 30 % seiner Gesamtmuskelmasse, verbunden mit einem Rückgang der Muskelkraft um 45 % (Moore et al., 2014). Der kontinuierliche Rückgang an Gesamtmuskelmasse von 0,5 bis 1 % pro Jahr ist eine von vielen physiologischen Altersveränderungen, und körperliche Aktivität spielt eine bedeutende Rolle beim Erhalt der körperlichen und geistigen Gesundheit im Alter. Das

Auftreten von Mangelernährung, Kachexie und Sarkopenie trägt ebenfalls zu diesem Prozess bei und führt zu einer allgemeinen Verschlechterung des Gesundheitszustands.

Die Sarkopenie, der altersbedingte Muskelabbau, ist auf eine Störung der Homöostase zwischen Muskelsynthese und Muskelabbau zurückzuführen (Vezzoli et al., 2019). Eine mitochondriale Dysfunktion, die durch oxidativen Stress begünstigt wird, verstärkt diesen Prozess (Rygiel et al., 2016). Allerdings konnte in Studien gezeigt werden, dass Krafttraining das Fortschreiten der Sarkopenie abschwächen kann. Durch die Aktivierung des AKT-mTOR-Signalwegs kann die Muskelhypertrophie gesteigert werden und somit auch die Proteinsynthese. Gleichzeitig wird der Muskelabbau durch die Hemmung von Forkhead-BOX-Protein durch AKT verzögert (Sandri, 2008).

Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass die durch Krafttraining vermittelte Reduktion von Entzündungsreaktionen und oxidativem Stress auch zu einer Zunahme der Muskelmasse beitragen kann. Allerdings wurde festgestellt, dass seneszente Muskelzellen aufgrund altersbedingter Veränderungen in der Ultrastruktur und Biochemie, die die Bildung von ROS begünstigen, während des Trainings anfälliger für oxidativen Stress sind (Ristow et al., 2009). Zudem ist die Reparatur- und Regenerationsfähigkeit der Muskulatur mit zunehmendem Alter vermindert, was die Entstehung zellulärer oxidativer Schäden begünstigt. Die Konsequenz ist, dass körpereigene Antioxidantien nur in geringem Maße verfügbar sind, wodurch es zu einer Schädigung biologischer Moleküle und wichtiger Zellbestandteile kommt (Zhang et al., 2023). Hinzu kommt eine altersbedingte Mangelernährung aufgrund von Einschränkungen des Kau- und Schluckapparats sowie eines verringerten Durst- und Hungergefühls mit der Folge einer reduzierten Aufnahme von Makro- und Mikronährstoffen (Elmadfa & Leitzmann, 2023).

3. Methodik & Studiendesign

3.1 Rekrutierung und Randomisierung

Im Zeitraum von Mai bis Dezember 2018 wurde in Wien die NutriAging-Studie durchgeführt, eine randomisierte und kontrollierte Interventionsstudie. Die Rekrutierung der Proband:innen begann im Mai. Ziel war es, mindestens 120 Senior:innen im Alter zwischen 65 und 85 Jahren zu gewinnen. Weitere Rekrutierungskriterien waren der Wohnort in Wien oder der näheren Umgebung sowie eine insofern ausreichende geistige und körperliche Fitness, sodass die Personen in der Lage waren, sich selbstständig im eigenen Haushalt zu versorgen. Die Rekrutierung erfolgte zunächst über Pensionistenklubs der Stadt Wien und wurde später durch Berichte in Printmedien sowie Radio- und Fernsehsendern ergänzt.

Von 632 Interessenten konnten 183 Personen für die Teilnahme an der Eignungsprüfung eingeladen werden. Es wurden 51 Interessenten von der Studienteilnahme ausgeschlossen, da sie den Einschlusskriterien nicht entsprachen.

Die Eignungsprüfung für die Studienteilnahme beinhaltete u. a. eine ärztliche Untersuchung, bei der die kognitiven Fähigkeiten sowie die körperliche Fitness der Teilnehmer:innen überprüft wurde. Die kognitiven Fähigkeiten wurden mit dem Mini-Mental-Status-Test und die körperliche Leistungsfähigkeit mit dem Short-Physical-Performance-Battery-Test untersucht. Von der Teilnahme ausgeschlossen wurden Personen mit chronischen Vorerkrankungen (z. B. Osteoporose, kardiovaskuläre Erkrankungen oder diabetische Retinopathie), die eine Durchführung des Krafttrainings im Rahmen der Intervention nicht realisierbar erscheinen ließen, sowie solche mit regelmäßiger Medikamenteneinnahme (Antibiotika, Cortison etc.) oder bereits bestehender körperlicher Aktivität in Form von Krafttraining (> einmal/Woche) innerhalb der letzten sechs Monate vor Studienbeginn. Weitere Proband:innen schieden im Verlauf der Studie aufgrund mangelnder Motivation und individueller Gründe aus. Insgesamt wurde die Studie von 119 Personen erfolgreich abgeschlossen.

Nach Rekrutierung und Eignungsprüfung erfolgte eine Randomisierung der Teilnehmer:innen gemäß der gewünschten Proteinaufnahme in die folgenden drei Gruppen:

Tabelle 8: Gruppeneinteilung für die Ernährungsintervention (Baron, 2021)

Gruppe	Proteinzufuhr	Krafttraining
Kontrolle (K)	0,8 – 1 g/kg/KG – Ernährung unverändert	unverändert
Protein Low (PL)	1 g/kg/KG	2 x pro Woche
Protein High (PH)	2 g/kg/KG	2 x pro Woche

Die Randomisierung erfolgte über *randomizer.at* der Medizinischen Universität Graz. Die Proband:innen wurden nach Geschlecht und Alter geordnet, um eine homogene Gruppenverteilung zu gewährleisten. Die Zugehörigkeit zur Ernährungsinterventionsgruppe wurde anschließend dem Studienteam mitgeteilt, da je nach Zuordnung zusätzlich zweimal pro Woche ein angeleitetes Krafttraining absolviert werden musste.

3.2 Interventionen

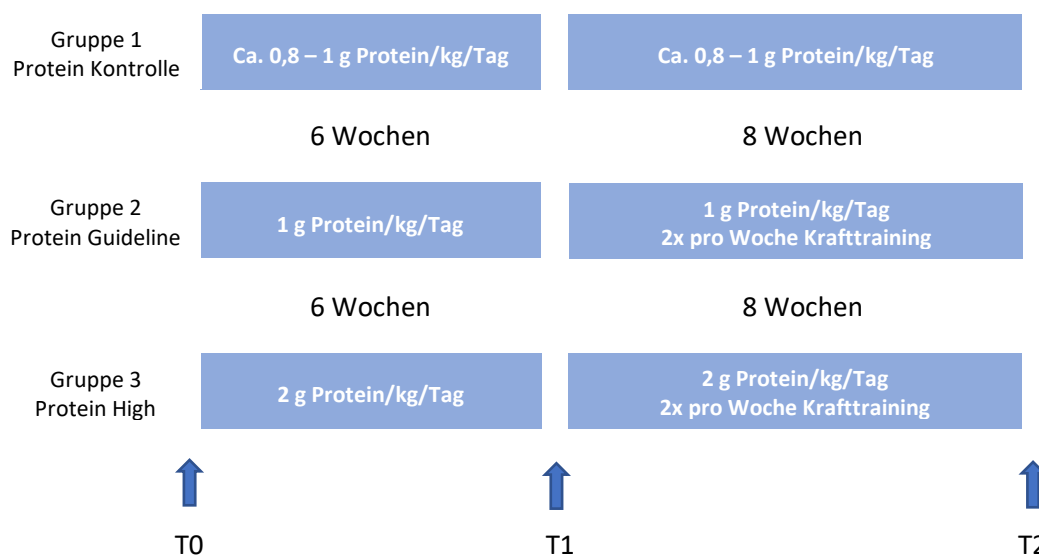


Abbildung 3: Studienverlauf nach Phasen und Interventionsgruppen (Staltner, 2019)

Die Intervention gliederte sich in drei Phasen und fand zwischen Juli und Dezember 2018 statt. Die erste Phase (P1) diente als Vorbereitungszeit, in der die Proband:innen rekrutiert und einem Eignungstest unterzogen wurden. Zudem wurden die Ernährungsgewohnheiten der Teilnehmenden 4 Wochen vor Beginn der Intervention mittels 24-h-Recall dokumentiert, um einen Referenzwert der Proteinaufnahme zu ermitteln. Im Anschluss wurden in regelmäßigen Abständen während der gesamten Laufzeit der Untersuchung Erhebungen zum Ernährungsstatus mittels 24-h-Recall durchgeführt.

Die zweite Phase (P2) umfasste sechs Wochen und begann mit dem Untersuchungstag (T0), an dem Laborparameter aus Blut-, Urin- und Stuhlproben erhoben wurden. Zusätzlich wurden anthropometrische und funktionale Parameter zur Beweglichkeit, Handkraft, Beinkraft und Gehgeschwindigkeit aufgenommen. Die gesammelten Daten wurden als Baseline für den weiteren Verlauf der Studie verwendet. Basierend auf der Proteinaufnahme (K, PL, PH) und dem Beginn der Ernährungsintervention erfolgte die Randomisierung in die Interventionsgruppen. In Woche 7 fand eine Zwischenuntersuchung (T1) statt, bei der die gleichen Parameter wie bei T0 erhoben wurden.

Die dritte Studienphase (P3) begann in der siebenten Woche und dauerte acht Wochen. Hier wurde je nach Proteingruppe (PL und PH) zusätzlich zur Ernährungsintervention eine Bewegungsintervention in Form eines regelmäßigen kontrollierten Krafttrainings durchgeführt. Beide Interventionen wurden nach 15 Wochen im Dezember 2018 beendet und es erfolgte eine abschließende Untersuchung (T2), in der die gleichen Labor- und Funktionsparameter wie zu T0 und T1 erhoben wurden.

3.2.1 Ernährungsintervention

Abhängig von der Gruppenzugehörigkeit musste während der Studiendauer eine tägliche Mindestmenge an Protein mit der Nahrung aufgenommen werden. Die Teilnehmenden der Kontrollgruppe wurden angewiesen, ihre Ernährungsgewohnheiten nicht zu ändern. Für die Proband:innen der PL-Gruppe wurde eine Proteinzufuhr entsprechend den D-A-CH-Referenzwerten für Senioren von 1 g pro kg Körpergewicht pro Tag und für die Personen aus der PH-Gruppe eine Proteinzufuhr von 2 g pro kg Körpergewicht pro Tag festgelegt. Um die gewünschte Proteinzufuhr zu erreichen, wurden den Proband:innen vom Studienteam spezielle Lebensmittel zur Verfügung gestellt, die ihnen über Logistikteams nach Hause geliefert wurden. Dabei handelte es sich um eiweißreiche Lebensmittel wie Suppen, Eiweißbrot, Eiweißshakes und Eiweißriegel – zusammen mit entsprechenden Rezepten.

Tabelle 9: verwendete proteinreiche Lebensmittel zum Verzehr während der Ernährungsintervention (Baron, 2021)

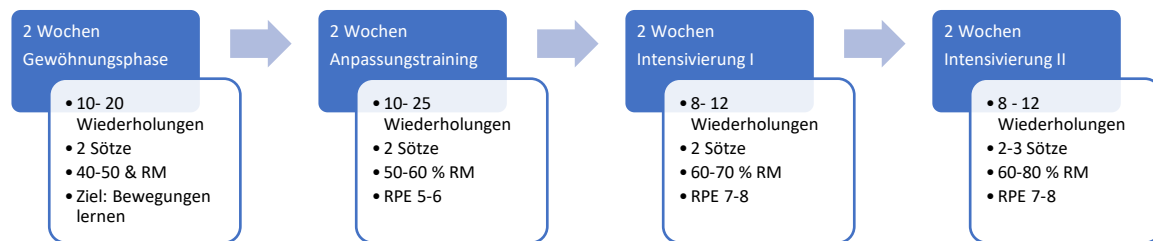
Lebensmittel Low-Protein Gruppe	Lebensmittel High Protein Gruppe
NÖM to go Drinks	NÖM Fasten Proteindrink
Gittis Riegel	Chiefs Proteindrink
Clafoutis	Chiefs Proteinpudding
	NEOH Crossbar Schokoriegel
Ölz Eiweißbrot	Ölz Eiweißbrot
GoVital Suppen	GoVital Suppen
Iglo Erbsengranulat	Iglo Erbsengranulat
Gemüse-Muffins (Eigenproduktion)	
Rezepte: Smoothies, Cupcakes	Rezepte: Muffin, Dips, Brownie, Hüttenkäsetaler, Topfenkekse

In einem zu Beginn der Ernährungsintervention ausgegebenen Ernährungstagebuch sollten die Teilnehmer:innen ihre Eiweißaufnahme anhand eines Punktesystems dokumentieren, wobei jedes zur Verfügung gestellte Produkt eine bestimmte Punktzahl erhielt. Für alle anderen Lebensmittel wurde pro 10 g Protein ein Punkt vergeben. Dies ermöglichte die Überprüfung der Eiweißzufuhr bei den Kontrollterminen. Die Proband:innen wurden zudem angehalten, ihre normalen Ernährungsgewohnheiten möglichst beizubehalten und die Proteinzufuhr nur durch die zur Verfügung gestellten Produkte und Rezepte zu erhöhen.

3.2.2 Trainingsintervention

Nach acht Wochen wurde zu Beginn von P3, zweimal wöchentlich ein Krafttraining für die Personen der PL- und der PH-Gruppe eingeführt. Um eine ausreichende Muskelregeneration zu gewährleisten, fand das Training an zwei nicht aufeinanderfolgenden Tagen unter kontrollierter Anleitung von Sportwissenschaftler:innen in ausgewählten Fitnessstudios in Wien statt. Den Teilnehmenden wurde ein Trainingstagebuch zur Verfügung gestellt und sie wurden gebeten, darin sowohl ihren Trainingsfortschritt als auch ihr allgemeines körperliches Wohlbefinden, ihre Motivation und die Schlafqualität der vergangenen Nacht zu dokumentieren.

Abbildung 4: Stufen der acht-wöchigen Trainingsintervention (Baron, 2021)



RM = repetition maximum

RPE = rate of perceived exertion 0-10

Um eine entsprechende Leistungssteigerung zu ermöglichen, war das Training in vier Trainingsabschnitte mit einer Dauer von jeweils zwei Wochen gegliedert. Die ersten beiden Trainingswochen dienten als Eingewöhnungsphase, ab der dritten Woche wurde die Trainingsintensität in der Adaptationsphase langsam gesteigert. In der dritten und vierten Trainingsphase wurden die Wiederholungen und Sätze des Krafttrainings individuell angepasst, sodass die gewünschten Trainingsziele erreicht werden konnten.

Tabelle 10: Paarweise ausgeführte Übungen der Trainingsintervention (Staltner, 2019)

Übungspaar	Übung
A1 + A2	Kniebeuge mit Kurzhantel + Beinbeuger sitzend oder stehend
B1 + B2	Lastzug zur Brust + (sitzend) Schulterdrücken mit Kurzhanteln
C1 + C2	Beinpresse + Liegestütz mit Beinheben (Hände erhöht)
D1 + D2	Rudern (sitzend) + Brustpresse

Trainingsprotokoll

Code: _____

Übung	Aufwärmen	A1 - Kniebeuge	A2 - Beinbeuger	B1 - Latzug	B2 – Schulterdrücken				
	☐ Cross Trainer ☐ Rad 5 Minuten								
Einstellungen	Steigung: Widerstand:		Sitz: Rolle Knie: Rolle Wade:	Griffbreite: Eine Hand breiter als schulterbreit!					
Datum	Biofaktoren	Satz	1 2 3	Satz	1 2 3	Satz	1 2 3	Satz	1 2 3
	Befinden Motivation Schlaf Schlafdauer: _____ Durchgeschlafen: ja ☐ nein ☐	Gewicht:		Gewicht:		Gewicht:		Gewicht:	
		WH:		WH:		WH:		WH:	
	Befinden Motivation Schlaf Schlafdauer: _____ Durchgeschlafen: ja ☐ nein ☐	Gewicht:		Gewicht:		Gewicht:		Gewicht:	
		WH:		WH:		WH:		WH:	
	Befinden Motivation Schlaf Schlafdauer: _____ Durchgeschlafen: ja ☐ nein ☐	Gewicht:		Gewicht:		Gewicht:		Gewicht:	
		WH:		WH:		WH:		WH:	
	Befinden Motivation Schlaf Schlafdauer: _____ Durchgeschlafen: ja ☐ nein ☐	Gewicht:		Gewicht:		Gewicht:		Gewicht:	
		WH:		WH:		WH:		WH:	

Abbildung 5: Trainingsprotokoll, S.1: Biofaktoren, Kniebeuge, Beinbeuger, Lastzug & Schulterdrücken (Baron, 2021)

Trainingsprotokoll

Code: _____

C1 - Beinpresse	C2 – Stütz	D1 - Rudern	D2 - Brustpresse	Trainingseinheit:
				Wie anstrengend war die Trainingseinheit? 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 nicht anstrengend anstrengend maximal anstrengend
Schlitten: Zehenposition:	Höhe:	Sitzhöhe: Brustpolster:	Sitzhöhe:	Gab es besondere Vorkommnisse? • Gesundheit? • Schmerzen? • Training: Gewicht/Wiederholungen?
Satz	1 2 3	Satz	1 2 3	
Gewicht:		Gewicht:		Borg (1-10): _____ Besondere Vorkommnisse:
WH:		WH:		
Gewicht:		Gewicht:		Borg (1-10): _____ Besondere Vorkommnisse:
WH:		WH:		
Gewicht:		Gewicht:		Borg (1-10): _____ Besondere Vorkommnisse:
WH:		WH:		
Gewicht:		Gewicht:		Borg (1-10): _____ Besondere Vorkommnisse:
WH:		WH:		

Abbildung 6: Trainingsprotokoll, S.2: Beinpresse, Stütz, Rudern & Brustpresse (Baron, 2021)

Darüber hinaus wurde die körperliche Leistungsfähigkeit der Proband:innen zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 (vgl. Kapitel 3.2) mithilfe verschiedener Übungen untersucht, die in der nachfolgenden Tabelle 11 aufgeführt sind.

Tabelle 11: Funktionelle Tests zur körperlichen Leistungsüberprüfung (Staltner, 2019)

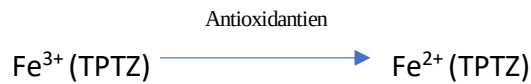
Parameter	funktionelle Test
Flexibilität des Körpers	Back Scratch Test, Chair Sit and Reach, Timed Up & Go, 30-second Arm Curl Test
Gleichgewicht	Statisches Gleichgewicht, Time Up & Go
Muskelfunktion	Chair-Stand Test, 30-Second Arm Curl Test, isometrische Handgriffkraft
Gehgeschwindigkeit	
Ausdauerleistung	6 min Gehtest

3.3 FRAP Messmethode

3.3.1 FRAP – “Ferric Reducing Ability of Plasma”

Die Messung der antioxidativen Kapazität im Blutplasma erfolgte mittels der FRAP-Methode.

Abbildung 7: FRAP Reaktionsmechanismus (Benzie & Strain, 1996)



In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchführung der Methode hinsichtlich der notwendigen Messanpassung an die Filterverfügbarkeit des FLUOstar Optima und zur besseren Handhabung in folgenden Aspekten modifiziert: Die Messdauer der Reaktion wurde von 4 min auf 6 min erhöht und es wurde eine Wellenlänge von 540 nm statt 595 nm gewählt, da das optimale Absorptionsmaximum im FLUOstar Optima nicht verfügbar war. Des Weiteren konnte eine Steigerung der Probendichte durch den Einsatz von 96-Well-Mikrotiterplatten erzielt werden.

3.3.2 FRAP - Chemikalien

Tabelle 12: Verwendete Chemikalien für die FRAP-Methode (Baron, 2021)

Reagenz	Chemische Formel	Hersteller
Natriumacetat	$\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$	Fuka Chemicals, Schweiz
Essigsäure	CH_3COOH	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tri(2-pyridyl)-s-triazin (TPTZ)	$\text{C}_{18} \text{H}_{12} \text{N}_6$	Sigma-Aldrich, Schweiz
Chlorwasserstoffsäure	HCl	Riedel-de Ha.n, Germany
Eisen-(III)-chlorid-Hexahydrat	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, Deutschland
Eisen-(II)-sulfat-Heptahydrat	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumchlorid	NaCl	Merck KGaA, Deutschland

Kaliumchlorid	KCl	VWR Chemicals, Belgien
di-Sodium-hydrogen-phosphate	Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Deutschland
Potassium-phosphate-monobasic	KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, Deutschland
6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox)	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	Eigenherstellung

3.3.3 FRAP - Verwendete Geräte und Einstellungen

Für die Messungen wurden der Microplatereader von BMG-Labtech und 96-Well-Mikrotiterplatten verwendet. Letztere wurden mit einer elektronischen Pipette befüllt und die Messungen wurden bei einem Absorptionsmaximum von 540 nm und einer Temperatureinstellung von 37 °C durchgeführt. Für die Auswertung der Ergebnisse wurde die MARS-Data-Analysis-Software (Version 2.41) verwendet.

Tabelle 13: Verwendetes Labormaterial für die FRAP-Methode (Baron, 2021)

Geräte	Hersteller
FLUO star optima	BMG Labtech, Deutschland
Mikrotiterplatten	Bibby Sterilin Ltd, U.K.
5417R Zentrifuge	Eppendorf, Deutschland
pH-Messgerät	Metrohm, Schweiz
Elektrische Pipette	Eppendorf Austria GmbH, Österreich
Pipetten 50 µl + 1 ml	Eppendorf Austria GmbH, Österreich
Laborwaage	Mettler Toledo GmbH, Österreich
Wasserbad	Müller-Scherr Laborausrüstung
Vortex	Heidolph Instruments GmbH, Deutschland
Thermometer	
Bechergläser	
Spatel	
Erlenmeyerkolben	
Messkolben	

Tabelle 14: Softwareeinstellung für die FRAP-Methode (Baron, 2021)

Softwareeinstellung	Eingabe
Basic Parameters:	
Test Name	FRAP
Microplate	Sterilin 96
General settings:	
Position delay	0,5s
Number of kinetic windows	1
Number of cycles	10
Measurement start time	1s
Number of flashes per well and cycle	20
Cycle time	36
Total measurement time	6m 08s
Excitation filter	A 540
Emission filter	Empty
Gain	1591
Temperature	37°C
Well scanning	None
Pause before cycle	0
Layout:	
Content	B = Blank C = Control S = Standard X = Samples
Replicates	Number 2 (duplicat) Horizontal
Reading direction	↓↓↓
Concentration, Shaking, Volume:	
Concentrations	Manuel eingeben bei Standards
Mode	Orbital
Shaking width	7 mm
Additional shaking	Before first cycle
Shaking time	5s

3.3.4 FRAP – Probenvorbereitung

Plasmaproben

Pro Proband*in wurde möglichst zu drei Messzeitpunkten (T0, T1, T2) Blut abgenommen. Die Proben wurden mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) versetzt, aliquotiert und bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Für die Analyse wurden sie zum Auftauen in einen Eisbehälter gegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass eine Temperatur von $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ nicht überschritten wurde. Vor der Durchführung der Analyse wurden die Proben kurz gevortext und anschließend für 3 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 3000 rpm zentrifugiert.

Standardlösung

An jedem Untersuchungstag wurde eine frische Stammlösung aus $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und Aqua destillata (Aqua dest.) hergestellt. Daraus wurde eine Fe^{3+} -Standardreihe mit bekannten Konzentrationen zwischen $100\text{ }\mu\text{mol/l}$ und $2000\text{ }\mu\text{mol/l}$ erstellt. Die Fe^{3+} -Standardreihe wurde zur Quantifizierung der antioxidativen Kapazität der jeweiligen Probe verwendet, da der Wert einer Standardlösung mit $100\text{ }\mu\text{mol/l}$ Fe^{2+} einem FRAP-Wert von $100\text{ }\mu\text{mol/l}$ entspricht.

Tabelle 15: Verdünnungsreihe der Fe^{2+} -Standardgeraden (Baron, 2021)

Standard	Konzentration	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Aqua dest.
S1	$100\text{ }\mu\text{mol/l}$	$25\text{ }\mu\text{l}$	$475\text{ }\mu\text{l}$
S2	$250\text{ }\mu\text{mol/l}$	$62,5\text{ }\mu\text{l}$	$437,5\text{ }\mu\text{l}$
S3	$500\text{ }\mu\text{mol/l}$	$125\text{ }\mu\text{l}$	$375\text{ }\mu\text{l}$
S4	$1000\text{ }\mu\text{mol/l}$	$250\text{ }\mu\text{l}$	$250\text{ }\mu\text{l}$
S5	$1250\text{ }\mu\text{mol/l}$	$312,5\text{ }\mu\text{l}$	$187,5\text{ }\mu\text{l}$
S6	$1500\text{ }\mu\text{mol/l}$	$375\text{ }\mu\text{l}$	$125\text{ }\mu\text{l}$
S7	$2000\text{ }\mu\text{mol/l}$	$500\text{ }\mu\text{l}$	

Positivkontrolle

Als Positivkontrolle diente das wasserlösliche Vitamin-E-Derivat Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) (Dionisio et al., 2018). Dieses wurde ebenfalls an jedem Analysetag frisch hergestellt und es wurde eine Trolox-Standardreihe mit einem Konzentrationsbereich von 100 $\mu\text{mol/l}$ bis 2000 $\mu\text{mol/l}$ erstellt. Die relative Aktivität von Trolox beträgt 2, was bedeutet, dass durch 1 Mol Trolox die Reduktion von 2 Mol Fe^{3+} erfolgen kann. Für die spätere Auswertung war zu beachten, dass die Werte der Trolox-Standardgeraden doppelt so hoch sind wie die der Fe^{2+} -Standardgeraden (Benzie & Strain, 1996).

Tabelle 16: Verdünnungsreihe der Troloxkontrolle (Baron, 2021)

Kontrolle	Konzentration	Trolox	PBS
C1	100 $\mu\text{mol/l}$	20 μl	480 μl
C2	250 $\mu\text{mol/l}$	50 μl	450 μl
C3	500 $\mu\text{mol/l}$	100 μl	400 μl
C4	1000 $\mu\text{mol/l}$	200 μl	300 μl
C5	1250 $\mu\text{mol/l}$	250 μl	250 μl
C6	1500 $\mu\text{mol/l}$	300 μl	200 μl
C7	2000 $\mu\text{mol/l}$	400 μl	100 μl

3.3.5 FRAP – Lösungsherstellung

Tabelle 17: Lösungsherstellung und Lagerungshinweise für die FRAP-Methode (Baron, 2021)

pH-Lösung	Einwaage	Anweisung & Lagerung
Salzsäure	50 ml HCl (37%)	In Messkolben
0,5 mol/l	950 ml Aqua dest.	erst Aqua dest., dann Säure hinzufügen bei 4°C lagern
Natronlauge	20 g NaOH	In Messkolben
0,5 mol/l	1000 ml Aqua dest.	
FRAP-Lösung		
Acetatpuffer	3,1 g $C_2H_3NaO_2$	In Messkolben
300 mmol/l	16 ml CH_3COOH	pH 3,6 einstellen
pH 3,6	1000 ml Aqua dest.	bei 4°C lagern
TPTZ	0,312 g TPTZ	In Messkolben
10 mmol/l	585 μ l HCl (25%) 100 ml Aqua dest.	bei 4°C lagern
Eisen(III)-chlorid- Hexahydrat 20 mmol/l	0,541 g $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 100 ml Aqua dest.	In Messkolben bei 4°C lagern
Standard-Lösung		
Eisen(II)-sulfat- Heptahydrat	0,0556g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 100 ml Aqua dest.	In Messkolben täglich frisch herstellen
2000 μ mol/l		bei 4°C lagern
Kontroll-Lösung		
Trolox		Positivkontrolle
2000 μ mol/l		täglich frisch herstellen bei -20°C lagern
PBS für Trolox	8,2 g NaCl 0,2 g KCl 1,2 g Na_2HPO_4 0,2 g KH_2PO_4	In Messkolben pH 7,4 – täglich mit HCl oder NaOH einstellen

3.3.6 FRAP – Durchführung

Als erstes wurden die EDTA-Blutplasma-Proben aus dem auf -80 °C gekühlten Gefrierschrank entnommen und in einer mit Eis gefüllten Wanne sortiert, um ein langsames aufzutauen zu gewährleisten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Temperatur der Proben nicht über 4 °C stieg. Anschließend wurden die Proben kurz gevortext und für 3 min bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert.

Während des Auftauens der EDTA-Plasma-Proben wurde das PBS durch tropfenweise Zugabe von Natronlauge und Salzsäure mit einer Pasteurpipette auf den pH 7,4 eingestellt. Anschließend wurden täglich eine frische Trolox-Verdünnungsreihe für die Positivkontrolle sowie eine Fe^{2+} -Standardreihe hergestellt. Die Verdünnungsreihen lagen im Konzentrationsbereich zwischen 100 und 2000 $\mu\text{mol/l}$. Im nächsten Schritt wurde das FRAP-Reagenz, bestehend aus Acetatpuffer, Tri(2-pyridyl)-s-triazin (TPTZ) und Eisen(III)-chloridhexahydrat, täglich frisch hergestellt und in Falcontubes im Wasserbad bei 37 °C gelagert. Für 2 Mikrotiterplatten wurden 25 ml Acetatpuffer, 2,5 ml TPTZ und 2,5 ml Eisen(III)-chloridhexahydrat benötigt.

Tabelle 18: FRAP-Pipettierschema für die 96-Well Mikrotiterplatte (Baron, 2021)

In 'well'-Befüllung	Standard	Kontrolle	Probe	Blank
Fe^{2+} -Standardlösung	10 μl			
Trolox		10 μl		
EDTA-Plasma			10 μl	
Aqua dest.	30 μl	30 μl	30 μl	40 μl
Frap-Reagenz	300 μl	300 μl	300 μl	300 μl

Die Mikrotiterplatten hatten 96 Wells (Vertiefungen) und ein maximales Füllvolumen von 350 μl pro Well. Mit einer elektronischen Eppendorf-Pipette wurde im Doppelansatz zunächst 10 μl Blank, 10 μl EDTA-Blutplasma oder 10 μl Fe^{2+} -Standardlösung bzw. Trolox-Lösung in die Wells pipettiert. Danach wurden 30 μl Aqua dest. und anschließend 300 μl FRAP-Lösung hinzugegeben. Mit dem FRAP-Reagenz wurde die Reaktion von TPTZ gestartet und die Platten wurden zur Messung in den FLUOstar Optima platziert. Ein Timer wurde angestellt.

Für die Messungen wurde darauf geachtet, dass alle Proben der jeweiligen Testpersonen zu den verschiedenen Messzeitpunkten auf dieselbe Platte pipettiert und nacheinander

gemessen wurden. Die Messung erfolgte bei 37 °C im Mikroplattenreader und dauerte 6 min und 8 s. Währenddessen wurde die Mikrotiterplatte zunächst 5 s geschüttelt und dann wurden in 10 Intervallen von je 36 s die Extinktionsänderungen gemessen.

Für die spätere Berechnung wurde zusätzlich in regelmäßigen Abständen ein Blank auf jede Platte pipettiert, der für die spätere Konzentrationsberechnung von den Extinktionswerten subtrahiert wurde. Während der Messung einer Platte im FLUOstar Optima wurde bereits die nächste Platte vorbereitet. Wie im folgenden Pipettierschema dargestellt, wurden abwechselnd die Fe²⁺-Standardlösung und die Trolox-Lösung auf die Platten aufgebracht.

Tabelle 19: FRAP-Pipettierschema, Fe²⁺-Standardlösung & Proben (Baron, 2021)

Platte 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Control	Control	Blank	Blank	Probe	Probe	Blank	Blank	Probe	Probe
B	Fe ²⁺ Standard 1	Fe ²⁺ Standard 1	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
C	Fe ²⁺ Standard 2	Fe ²⁺ Standard 2	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
D	Fe ²⁺ Standard 3	Fe ²⁺ Standard 3	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
E	Fe ²⁺ Standard 4	Fe ²⁺ Standard 4	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
F	Fe ²⁺ Standard 5	Fe ²⁺ Standard 5	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
G	Fe ²⁺ Standard 6	Fe ²⁺ Standard 6	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
H	Fe ²⁺ Standard 7	Fe ²⁺ Standard 7	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe

Tabelle 20: FRAP-Pipettierschema, Trolox & Proben (Baron, 2021)

Platte 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Control	Control	Blank	Blank	Probe	Probe	Blank	Blank	Probe	Probe
B	Trolox 1	Trolox 1	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
C	Trolox 2	Trolox 2	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
D	Trolox 3	Trolox 3	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
E	Trolox 4	Trolox 4	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
F	Trolox 5	Trolox 5	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
G	Trolox 6	Trolox 6	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
H	Trolox 7	Trolox 7	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe

3.4 Messmethode Glutathion-/Glutathion-Disulfid-Fluoreszenz

3.4.1 Glutathion-/Glutathion-Disulfid

Hissin und Hilf entwickelten 1976 eine Methode für die Bestimmung der GSH-Konzentration im menschlichen Blutplasma. In dieser Methode reagiert OPA mit GSH bei einem pH-Wert von 8, während ein alkalischer pH-Wert von 12 benötigt wird, damit es mit GSSG reagiert. Zur Einstellung des erforderlichen pH 8 wurde bei der Herstellung der Verdünnungsreihe EDTA hinzugefügt. Die Messung des bei der Reaktion zwischen OPA und GSH entstehenden Komplexes erfolgte fluorometrisch unter Verwendung eines Extinktionsfilters bei 350 nm sowie einer Emissionswellenlänge von 450 nm (Hissin & Hilf, 1976). Zur korrekten Quantifizierung des GSSG-Gehalts wurde die Probe 30 Minuten mit N-Ethylmaleinimid (NEM) inkubiert (Cohn & Lyle, 1966). Anschließend wurde der pH-Wert auf 12 eingestellt, um GSSG hydrolytisch zu GSH zu spalten. OPA bindet dann an die freie Thiolgruppe von GSH, und der Gehalt an GSH wird fluorometrisch bestimmt (Singh et al., 2017).

3.4.2 Glutathion-/Glutathion-Disulfid-Fluoreszenz – Chemikalien

Tabelle 21: Verwendete Chemikalien für die GSH-/GSSG-Methode (Baron, 2021)

Reagenz	Chemische Formel	Hersteller
Natriumhydroxid	NaOH	Sigma-Aldrich, Deutschland
Sodium phosphate monobasic	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich, Deutschland
Sodium phosphate dibasic	Na_2HPO_4	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	$\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$	Sigma-Aldrich, Deutschland
N-Ethylmaleinimid (NEM)	$\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_2$	Sigma-Aldrich, USA
o-Phthaldialdehyd (OPA)	$\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$	Merck KGaA, Deutschland
Methanol	CH_3OH	Merck KGaA, Deutschland

3.4.3 Glutathion-/Glutathion-Disulfid-Fluoreszenz – Verwendete Geräte und

Einstellungen

Für die Messungen wurde erneut der Microplatereader von BMG-Labtech sowie eine 96-Well-Mikrotiterplatte eingesetzt. Die nachfolgende Analyse der Messwerte erfolgte mit der Software MARS Data Analysis – Version 2.41.

Tabelle 22: Verwendetes Labormaterial für die GSH- und GSSG-Analyse (Baron, 2021)

Geräte	Hersteller
FLUO star optima	BMG Labtech, Deutschland
Mikrotiterplatten	Bibby Sterilin Ltd, U.K.
5417R Zentrifuge	Eppendorf, Deutschland
pH-Messgerät	Metrohm, Schweiz
Elektrische Pipette	Eppendorf Austria GmbH, Österreich
Pipetten 200 µl + 1 ml	Eppendorf Austria GmbH, Österreich
Laborwaage	Mettler Toledo GmbH, Österreich
Vortex	Heidolph Instruments GmbH, Deutschland
Bechergläser	
Spatel	
Messzylinder	
Messkolben	

Die Analyse erfolgte bei Raumtemperatur, d. h., es wurde keine Temperatureinstellung am FLUOstar Optima vorgenommen. Darüber hinaus wurden für die Messung die folgenden Einstellungen genutzt:

Tabelle 23: Softwareeinstellungen der MARS Datenanalyse Software für die GSH- und GSSG-Analyse (Baron, 2021)

Softwareeinstellung	Eingabe
Reader Configuration:	
Test-Setup	Fluorescence TOP
Light-wave-cable	Emission: blue Excitation: yellow
Test Name	GSH_GSSG
Microplate	BMG LABTECH 96
General settings:	
Position delay	0.2 s
Measurement start time	0.0
Number of flashes per well and cycle	10
Number of mulitchromatics	1
Excitation filter	355
Emission filter	420
Gain	800
Layout:	
Content	B = Blank C = Control S = Standard X = Samples
Replicates	Number 2 (duplicat) Horizontal
Reading direction	↓↓↓
Concentration, Shaking, Volume:	
Concentrations	0
Volume	0
Shaking	x double orbital
Shaking width	4 mm
Additional shaking	No shaking

3.4.4 Glutathion-/Glutathion-Disulfid-Fluoreszenz – Probenvorbereitung

Plasmaproben

Von jedem Probanden wurde, wenn möglich, an drei Terminen Blut abgenommen. Nach der Blutabnahme wurde das Heparinplasma 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und 10 min bei 4 °C und 2200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden 600 µl des Plasmas in ein neues 1,5-ml-Eppi überführt und 600 µl 10%-Trichloressigsäure zugegeben. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben erneut für 10 min bei 4 °C und 2200 rpm zentrifugiert. Vom Überstand wurden 250 µl in ein neues 1,5-ml-Eppi aliquotiert und 250 µl wurden in ein 1,5-ml-Back-up-Eppi gegeben. Die Proben sind bei einer Temperatur von –80 °C bis zu 2 Jahre haltbar.

Für die Analyse wurden die Proben in einer Eiswanne gelagert, um ein langsames Auftauen zu gewährleisten, dann wurden sie kurz gevortext und für 5 min bei 4 °C und 2200 rpm zentrifugiert.

Standardlösung

Es wurde eine Verdünnungsreihe von GSH und GSSG mit bekannter Konzentration hergestellt. Die Stammlösungen wurden in 100 µl mit einer Konzentration von 1 mM aliquotiert. Die Verdünnungsreihen wurden täglich neu hergestellt, wobei die Aliquote für die GSH-Standardreihe mit EDTA-Buffer und für die GSSG-Standardreihe mit NaOH verdünnt wurden. Die Konzentrationen der Verdünnungsreihen lagen zwischen 1,56 und 50 µmol/l.

Tabelle 24: Verdünnungsreihe GSH & Verdünnungsreihe GSSG (Baron, 2021)

GSH			GSSG		
	1 mM			1 mM	
100 µl 1 mM	↙ ↘	+ 900 µl EDTA	100 µl 1mM	↙ ↘	+ 900 µl NaOH
500 µl 100 µM	↙ ↘	+ 500 µl EDTA	500 µl 100 µM	↙ ↘	+ 500 µl NaOH
500 µl 50 µM	↙ ↘	+ 500 µl EDTA	500 µl 50 µM	↙ ↘	+ 500 µl NaOH
500 µl 25 µM	↙ ↘	+ 500 µl EDTA	500 µl 25 µM	↙ ↘	+ 500 µl NaOH
500 µl 12,5 µM	↙ ↘	+ 500 µl EDTA	500 µl 12,5 µM	↙ ↘	+ 500 µl NaOH
500 µl 6,25 µM	↙ ↘	+ 500 µl EDTA	500 µl 6,25 µM	↙ ↘	+ 500 µl NaOH
500 µl 3,125 µM	↙ ↘	+ 500 µl EDTA	500 µl 3,125 µM	↙ ↘	+ 500 µl NaOH
500 µl 1,56 µM	↙ ↘	+ 500 µl EDTA	500 µl 1,56 µM	↙ ↘	+ 500 µl NaOH

Positivkontrolle

Für die positive Kontrolle wurde immer dieselbe Probe mit bekannter Konzentration herangezogen. Diese wurde, wie die zu analysierenden Proben vorbereitet und auf jede zu messende Platte mitaufgetragen. Um sicherzustellen, dass die Methode funktioniert, sollte der Messwert dieser Probe immer in einem bestimmten Konzentrationsbereich liegen: für GSH zwischen 140 und 160 μM und für GSSG zwischen 80 und 100 μM .

3.4.5 Glutathion-/Glutathion-Disulfid-Fluoreszenz – Lösungsherstellung

Tabelle 25: Lösungsherstellung und Lagerungshinweise für die GSH- und GSSG-Analyse (Baron, 2021)

pH-Lösung	Einwaage	Anweisung & Lagerung
Natronlauge 0,1 M	1g NaOH 250 ml Aqua dest.	in Messkolben
Natronlauge 5 M	50 g NaOH 250 ml Aqua dest.	in Messkolben
Sodium-Phosphat-Buffer (SPB): 0,1 M		
Sodium phosphate monobasic 0,1 M	2,069 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 150 ml Aqua dest.	in Messkolben, bei RT eine Woche haltbar
Sodium phosphate Dibasic 0,1 M	4,935 g Na_2HPO_4 350 ml Aqua dest.	mit Monobasic (~120ml) auf pH-Wert 7,4 einstellen
EDTA-Buffer		
Ethylendiamintetraessig-säure (EDTA) 5mM	0.7306 g $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ 500 ml SPB	mit NaOH auf pH-Wert 8,0 einstellen Bei 4°C eine Woche haltbar
GSH/GSSG Lösung		
o-Phthaldialdehyd (OPA)	4 mg $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$ 4 ml Methanol	für 5 Platten jeden Tag frisch herstellen vortexen und auf Eis lagern
N-Ethylmaleimide (NEM) 40mM	10 mg $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_2$ 2 ml EDTA Buffer	für 5 Platten jeden Tag frisch herstellen vortexen und auf Eis lagern

3.4.6 Glutathion-/Glutathion-Disulfid-Fluoreszenz – Durchführung

Für die Durchführung wurden die Proben im ersten Schritt wieder aus dem Gefrierschrank bei -80°C entnommen und in einer Eiswanne langsam aufgetaut. Anschließend wurden sie kurz gevortext, für 5 min bei 4°C und 2200 rpm zentrifugiert und wieder auf Eis gelagert. In der Zwischenzeit wurde der pH-Wert des EDTA-Puffers kontrolliert und auf den gewünschten Wert von 8,0 eingestellt.

Zur Herstellung der Lösung für 5 Mikrotiterplatten wurden täglich 4 mg OPA und 10 mg NEM frisch eingewogen. Danach wurden dem OPA 4 ml Methanol und dem NEM 2 ml EDTA zugesetzt. Als Nächstes wurden die GSH- und GSSG-Standardreihen aus jeweils 1 mM Stocklösung mit einem Konzentrationsbereich zwischen 1,56 und 50 μM hergestellt. Während der gesamten Analyse wurden die OPA-, NEM- und Standardlösungen zusammen mit den Proben in der Eiswanne aufbewahrt. Für die weitere Vorbereitung der GSSG-Analyse wurden 70 μl aus jedem Eppi einer Probe entnommen und in ein neu vorbereitetes Eppi überführt. Im nächsten Schritt wurden die GSSG-Proben mit jeweils 30 μl NEM versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Für die GSH-Analyse waren keine weiteren Vorbereitungen erforderlich und die Proben, Kontrollen sowie Standards konnten direkt für die Messung verwendet werden. Für beide Analysemethoden wurde wieder im Doppelansatz pipettiert und es wurden eine Eppendorf-Elektronikpipette und -Multipipette verwendet.

Für die GSH-Messung wurden in jedes Well zuerst 10 μl des Blank, des Standard, der Kontrolle oder der Probe pipettiert, anschließend wurden 180 μl EDTA mittels Multipipette hinzugefügt. Danach wurden in jedes Well, gemäß der Messrichtung links startend und von oben nach unten, 10 μl OPA pipettiert.

Für die GSSG-Messung wurden jeder Probe nach 30 min Inkubationszeit (70 μl Probe mit 30 μl NEM) 150 μl NaOH hinzugefügt und die Mischung wurde kurz gevortext. Anschließend konnten die Proben nach demselben Schema wie die Proben der GSH-Analyse auf die Platten aufgetragen werden. Zuerst wurden erneut 10 μl des Blank, des Standard, der Kontrolle oder der Probe pipettiert und dann 180 μl NaOH mittels Multipipette hinzugefügt. Anschließend wurde jedes Well mit 10 μl OPA befüllt.

Tabelle 26: GSH/GSSG Pipettierschema für die 96-well Befüllung (Baron, 2021)

GSH in ,well'-Befüllung		GSSG in ,well'-Befüllung	
Blank/Standard/ Kontrolle/Probe	10 µl	Blank/Standard/ Kontrolle/Probe	10 µl
EDTA	180µl	NaOH	180 µl
OPA	10 µl	OPA	10 µl

Sobald den fertig pipettierte Platten das OPA hinzugefügt worden war, wurde ein Timer gestartet und die Platten wurden in Alufolie gewickelt und für 15 min bei Raumtemperatur auf einem Shaker (Stufe 2) inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten aus der Alufolie entnommen und in den Microplattenreader gelegt. Daraufhin konnte die Messung gestartet werden. Während die GSH-Platte auf dem Shaker inkubiert wurde, wurde mit dem Pipettieren der GSSG-Platte begonnen.

Tabelle 27: GSH-Pipettierschema, GSH-Standardreihe 1-6, Blank, Kontrolle & Proben (Baron, 2021)

Platte 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Probe	Probe	Control	Control	Probe	Probe	Control	Control	Probe	Probe
B	G S H Standard 1	G S H Standard 1	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
C	G S H Standard 2	G S H Standard 2	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
D	G S H Standard 3	G S H Standard 3	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
E	G S H Standard 4	G S H Standard 4	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
F	G S H Standard 5	G S H Standard 5	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
G	G S H Standard 6	G S H Standard 6	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
H												

Tabelle 28: GSSG-Pipettierschema, GSSG-Standardreihe 1-6., Blank, Kontrolle & Proben (Baron, 2021)

Platte 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Probe	Probe	<i>Control</i>	<i>Control</i>	Probe	Probe	<i>Control</i>	<i>Control</i>	Probe	Probe
B	GSSG Standard 1	GSSG Standard 1	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
C	GSSG Standard 2	GSSG Standard 2	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
D	GSSG Standard 3	GSSG Standard 3	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
E	GSSG Standard 4	GSSG Standard 4	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
F	GSSG Standard 5	GSSG Standard 5	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
G	GSSG Standard 6	GSSG Standard 6	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
H												

3.5 Thiolbestimmung Messmethode

3.5.1 Thiolbestimmung im Plasma

Zur Bestimmung der Gesamtthiole im Plasma wurde das *Fluorometric Thiol Quantitation Kit – MAK151* der Firma Sigma-Aldrich verwendet. Dies ist ein hochempfindlicher Assay, mit dem bereits geringe Thiolgehalte nachgewiesen werden können. Das Thiol-Detectant-Reagent bildet mit thiolhaltigen Verbindungen ein stark fluoreszierendes Addukt (Anregung: 490 nm, Emission: 520 nm), dessen Absorptions- und Emissionsspektrum pH-unabhängig und damit robust ist. Zudem können mit dem Kit bereits Konzentrationen von 1 pmol Cystein bzw. GSH in 100 µl Probenvolumen nachgewiesen werden (Sigma-Aldrich, 2018).

Da in der Gebrauchsanweisung des Kits weder die genaue Probenmenge noch die Inkubationszeit für die Analyse konkret angegeben waren, mussten diese Daten erst ermittelt werden. Schließlich wurde entschieden, 5 µl pro Probe und Well bei einer Inkubationszeit von 15 min zu pipettieren, da bei diesen Werten die Probenkonzentration im oberen Mittel der Standardgeraden lag und der Variationskoeffizient am stabilsten war. Für die Messung wurde eine Wellenlänge von 485 nm gewählt, wobei die Computereinstellungen für die GSH- und GSSG-Analyse als Vorlage dienten.

Gemessen wurde nach 15 min mit einer über die Funktion *Gain Adjustment* an die Konzentration des Standards 7 angepassten Gain-Einstellung und nach 17 min mit einem festen Gain von 1250. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die Messwerte mit einer festen Gain-Einstellung von 1250 nach 17 Minuten herangezogen. Da die Gain-Einstellungen bei Platte 3 vertauscht waren, wurde zusätzlich ein Umrechnungsfaktor von 0,93 verwendet. Des Weiteren stellte sich heraus, dass vor der Analyse der Proben eine Reinigung der Plasmaproben zur Entfernung von Proteinen notwendig gewesen wäre. Da dies jedoch nicht in der Anleitung beschrieben war, wurde für die Methode EDTA-Plasma verwendet. Außerdem konnte mit dem Kit nur der reduzierte Thiolgehalt und nicht wie erwartet der Gesamtthiolgehalt nachgewiesen werden. Aus diesem Grund sollten die Ergebnisse der Analyse mit Vorsicht interpretiert werden.

3.5.2 Thiolbestimmung – Chemikalien

Tabelle 29: Verwendete Chemikalien für die Thiolbestimmung

Reagenz	Produktnummer	Hersteller
Fluorometric Thiol Assay Kit	MAK151-1KT	Sigma-Aldrich, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	AM9937	Thermo Fisher Scientific

3.5.3 Thiolbestimmung – Verwendete Geräte und Einstellungen

Tabelle 30: Verwendetes Labormaterial für die Thiolbestimmung

Geräte	Hersteller
FLUO star optima	BMG Labtech, Deutschland
Mikrotiterplatten	Bibby Sterilin Ltd, U.K.
5417R Zentrifuge	Eppendorf, Deutschland
Mikrozentrifuge Mini Star	VWR, Österreich
Elektrische Pipette	Eppendorf Austria GmbH, Österreich
Pipetten 200 µl + 1 ml	Eppendorf Austria GmbH, Österreich
Vortex	Heidolph Instruments GmbH, Deutschland
Shaker	ELMI, Lativa
Timer	

Tabelle 31: Softwareeinstellungen der MARS Datenanalyse Software für die Thiolbestimmung

Softwareeinstellung	Eingabe
Reader Configuration:	
Test-Setup	Fluorescence TOP
Light-wave-cable	Emission: blue Excitation: yellow
Test Name	Thiol Quantitation
Microplate	BMG LABTECH 96
General settings:	
Position delay	0.2 s
Measurement start time	0.0
Number of flashes per well and cycle	10
Number of mulitchromatics	1
Excitation filter	485
Emission filter	520
Gain	Gain adjustment
Layout:	
Content	B = Blank S = Standard C = Control X = Samples
Replicates	Number 3 Horizontal
Reading direction	↓↓↓
Concentration, Shaking, Volume:	
Concentrations	0
Volume	0
Shaking	x double orbital
Shaking width	7 mm
Additional shaking	Before plate reading
Shaking time	5 s

3.5.4 Thiolbestimmung – Probenvorbereitung

Plasmaproben

Für die Analyse zur Bestimmung der Gesamtthiole im Plasma wurden nur die Proben der Proband:innen aus der PH-Gruppe herangezogen. Sie wurden auf die gleiche Weise wie die Proben für die GSH- und GSSG-Messung vorbereitet und für die Durchführung mit Alufolie bedeckt in einer Eiswanne gelagert, um ein langsames Auftauen zu gewährleisten. Vor Beginn der Analyse wurden die Proben zunächst kurz gevortext und anschließend für 3 min bei 4 °C und 3000 rpm zentrifugiert.

Standardlösung

Zur Herstellung der GSH-Verdünnungsreihe wurden 30 µl der 1-mM-Stammlösung mit 970 µl Assay-Puffer verdünnt. Die gewünschte Konzentration wurde durch eine weitere dreifache Verdünnung erzielt. Die Standards konnten nach der Herstellung für einen Zeitraum von bis zu vier Stunden verwendet werden. Für die weitere Auswertung der Ergebnisse wurde Standard 1 (0,014 mM) jedoch aufgrund von Konzentrationsschwankungen ausgeschlossen.

Tabelle 32: Thiolbestimmung - Herstellung GSH-Standardreihe

	GSH	
	1 mM	
30 µl 1 mM	↪	+ 970 µl Assay Puffer
	↩	
250 µl 10 µM	↪	+ 500 µl Assay Puffer
	↩	
250 µl 3,3 µM	↪	+ 500 µl Assay Puffer
	↩	
250 µl 1,1 µM	↪	+ 500 µl Assay Puffer
	↩	
250 µl 0,37 µM	↪	+ 500 µl Assay Puffer
	↩	
250 µl 0,12 µM	↪	+ 500 µl Assay Puffer
	↩	
250 µl 0,04 µM	↪	+ 500 µl Assay Puffer
	↩	
	0,014 µM	

Positivkontrolle

Für die Positivkontrolle wurde stets dieselbe Probe mit einer bekannten Konzentration eingesetzt. Diese Probe wurde entsprechend den zu analysierenden Proben vorbereitet und auf jede zu messende Platte aufgetragen. Um die Wirksamkeit der Methode sicherzustellen, musste der Messwert der Positivkontrolle im Bereich von 140 bis 160 μM für GSH und von 80 bis 100 μM für GSSG liegen.

3.5.5 Thiolbestimmung – Lösungsherstellung

Tabelle 33: Lösungsherstellung und Lagerungshinweise für die Thiolbestimmung

Lösung	Einwaage	Anweisung & Lagerung
Thiol Detection Reagent	100 ml DMSO-Lösung 100x Thiol Detection Reagent Stammlösung	DMSO zur aufgetauten Thiol Stammlösung hinzufügen; In Alufolie als Lichtschutz dann jeweils 50 μl in 5 ml Mikroreaktionsgefäße aliquotieren bei -20°C lagern
GSH-Standard Stammlösung 1 mM	200 μl nukleasefreies H_2O GSH-Standard	Je 30 μl n 6 Mikroreaktionsgefäße (1,5ml) Bei -20°C lagern
Master Reaction Mix (MRM)	50 μl Thiol Detection Reagent 5 ml Assay Puffer	Vorsichtig vermischen Innerhalb von 2h zu benutzen Menge für Messung einer 96- Well Mikrotiterplatte

3.5.6 Thiolbestimmung – Durchführung

Zur Durchführung wurden, wie bei den beiden anderen Methoden, im ersten Schritt die Proben der Teilnehmer:innen der Gruppe PH aus dem Tiefkühler mit einer Temperatur von -80°C entnommen und in einer mit Alufolie abgedeckten Eiswanne langsam aufgetaut. Anschließend wurden sie kurz gevortext und für 3 min bei 4°C sowie 3000 rpm zentrifugiert und wieder auf Eis gelagert. Währenddessen wurde das bei -20°C gelagerte Thiol-Assay-Kit aus dem Gefrierschrank genommen und im Dunkeln bei Raumtemperatur aufgetaut. Für die Herstellung der Lösung wurden alle benötigten Reagenzien im Dunkeln bei Raumtemperatur entfrosten oder in Aluminiumfolie eingewickelt. Aus der 1-mM-GSH-Stammlösung wurden dann die GSH-Standardreihen hergestellt. Die Analyse erfolgte im Dreifachansatz mit einer elektronischen Eppendorf-Pipette und einer Multipipette.

In jedes Well wurden zunächst 50 μl Blank/Standard oder 5 μl Probe pipettiert, die Wells der Plasmaproben wurden zusätzlich mit 45 μl Assay-Puffer gefüllt. Anschließend wurden in jedes Well 50 μl Master-Reaction-Mix gegeben, angefangen von links und von oben nach unten entsprechend der Messrichtung.

Tabelle 34: Thiolbestimmung-Pipettierschema für 96-Well Mikrotiterplatte

In 'well'-Befüllung	Standard	Probe	Blank
Standards	50 μl		
EDTA-Plasma		5 μl	
Assay Puffer		45 μl	50 μl
MRM	50 μl	50 μl	50 μl

Nach Zugabe des Master-Reaction-Mix wurde ein Timer von 15 min gestartet. Die Platte wurde in Alufolie eingewickelt und für 1 min auf dem Shaker (Stufe 2) geschüttelt. Dann wurde sie für die restliche Zeit in den Microblade-Reader zur Inkubation gelegt. Nach Ablauf des Timers wurde die Messung gestartet.

Tabelle 35: Thiolbestimmung-Pipettierschema, Thiol-Standardreihe 1-6, Blank, Kontrolle & Proben

Platte 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Blank	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
B	THIOL Standard 1	THIOL Standard 1	THIOL Standard 1	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
C	THIOL Standard 2	THIOL Standard 2	THIOL Standard 2	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
D	THIOL Standard 3	THIOL Standard 3	THIOL Standard 3	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
E	THIOL Standard 4	THIOL Standard 4	THIOL Standard 4	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
F	THIOL Standard 5	THIOL Standard 5	THIOL Standard 5	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
G	THIOL Standard 6	THIOL Standard 6	THIOL Standard 6	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
H	Control	Control	Control	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe

3.6 Auswertung der Messdaten

Die Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ wurde unter Berücksichtigung der Extinktionswerte und einer Excel-Standardgerade berechnet. Im ersten Schritt wurden die Messdaten kopiert und in eine Excel-Datei übertragen. Für jeden Ansatz wurden die Mittelwerte der Extinktionswerte gebildet. In der Folge wurde der Mittelwert des Blanks von den Mittelwerten der Standardlösungen subtrahiert. Die Standardgerade wurde in Excel berechnet (Steigung, Achsenabschnitt), basierend auf den bereinigten Extinktionswerten und den Soll-Konzentrationen der Standardlösungen. Die Konzentrationen wurden mit folgender Gleichung berechnet:

$$y = k \cdot x + d$$

y = Extinktion (MW) abzüglich Blank (MW)

x = Konzentration in $\mu\text{mol/l}$

Des Weiteren wurde der Variationskoeffizient für sämtliche Lösungen berechnet, um die Präzision der Messungen zu überprüfen und etwaige Ungenauigkeiten zu identifizieren. Im Rahmen der Datenauswertung wurden jene Werte, welche eine zu hohe Ungenauigkeit aufwiesen, vom weiteren Analyseprozess ausgeschlossen.

3.6.1 FRAP – Auswertung

Mittels Subtraktion des Extinktionswert der Blanks vom Extinktionswert der Fe^{2+} -Lösung konnte eine Standardgerade erstellt werden die für die Berechnung des antioxidativen Potenzials in $\mu\text{mol/l}$ herangezogen wurde.

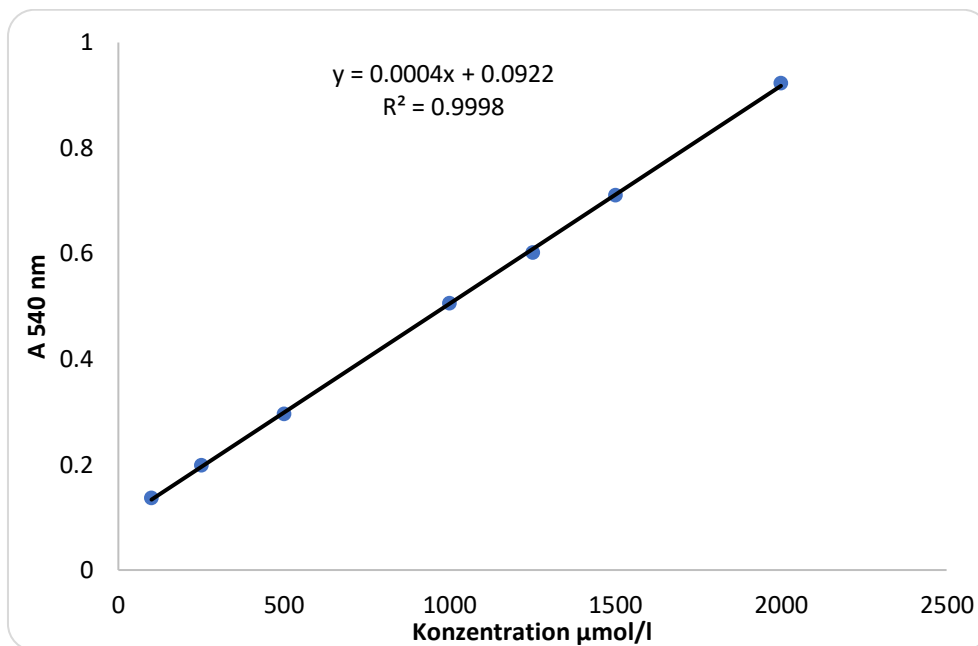
Berechnung der Fe^{2+} -Standardgerade:

$$y = k \cdot x + d$$

y = Absorption (gemessen bei) 540 nm

x = Konzentration in $\mu\text{mol/l}$

Abbildung 8: Fe^{2+} - Standardgerade zur Berechnung der FRAP-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$]



3.6.2 Glutathion-/Glutathion-Disulfid-Fluoreszenz – Auswertung

Die aus den Standardkurven ermittelten Extinktionswerte ermöglichten die Berechnung des oxidierten GSSG und des reduzierten GSH in $\mu\text{mol/l}$. Die Konzentrationen der Standardlösungen lagen im Bereich von $1,56 \mu\text{M}$ bis $50 \mu\text{M}$. Die Extinktionswerte der Blanks wurden von den ermittelten Werten subtrahiert und anschließend konnten die Messwerte der GSH- und GSSG-Proben in die Gleichung eingesetzt werden.

Berechnung der GSH/GSSG-Standardgerade:

$$y = k \cdot x + d$$

y = Extinktion 350 nm und Emission 450 nm

x = Konzentration in $\mu\text{mol/l}$

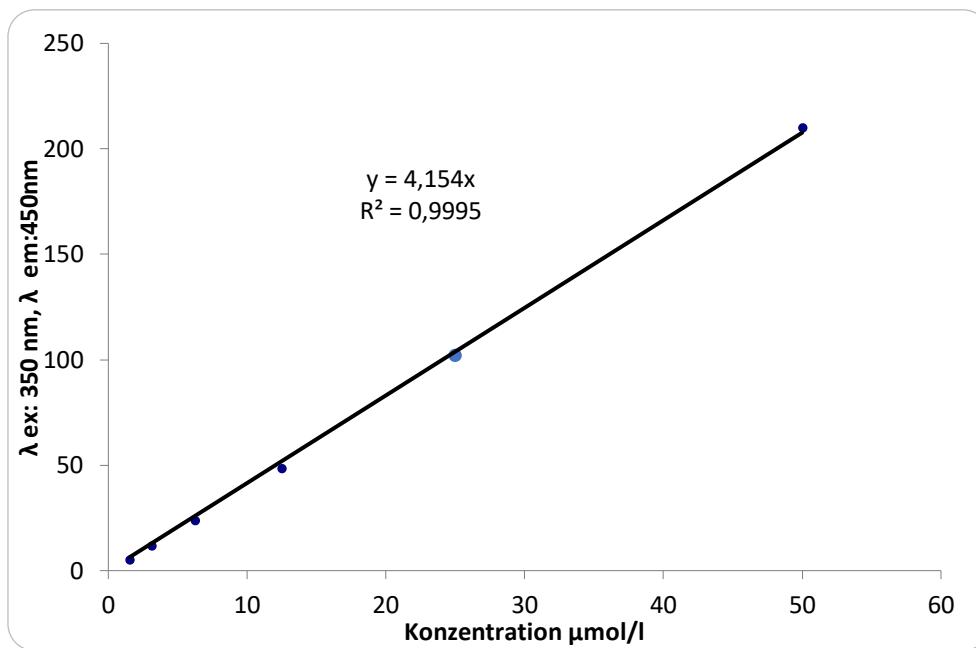


Abbildung 9: Standardgerade zur Berechnung der GSH-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$].

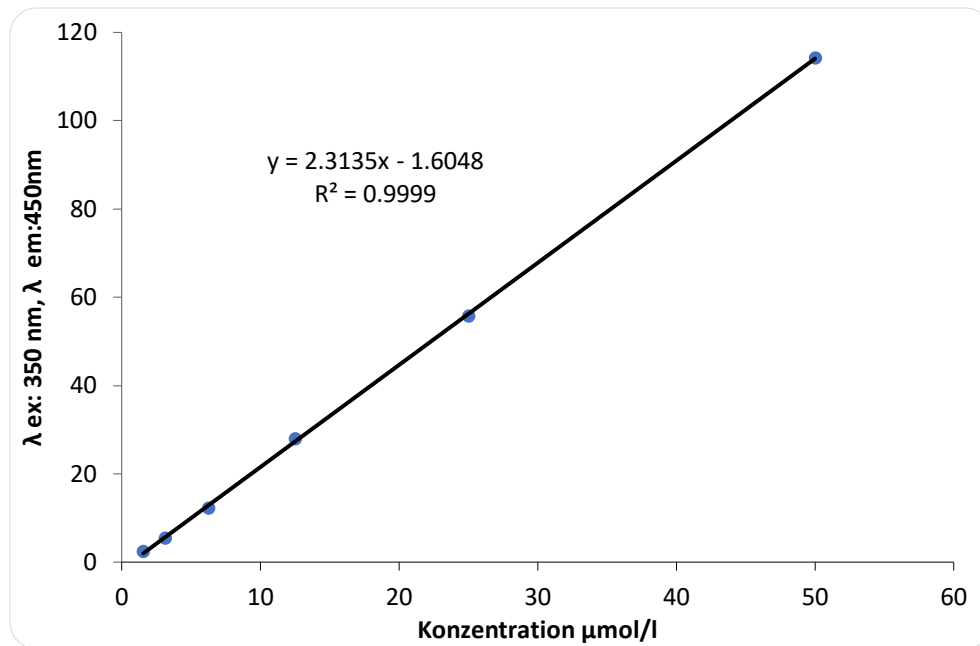


Abbildung 10: Standardgerade zur Berechnung der GSSG-Konzentrationen [µmol/l].

3.6.3 Thiolbestimmung – Auswertung

Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden die Messwerte mit einer festen Gain-Einstellung von 1250 nach 17 Minuten verwendet. Aufgrund vertauschter Gain-Einstellungen bei Platte 3 wurde ein Umrechnungsfaktor von 0,93 verwendet. Die Thiolkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ wurde aus den ermittelten Extinktionswerten basierend auf der Standardkurve (siehe Abb. 11) berechnet. Die Konzentration der Standardlösungen lag im Bereich von 0,04 bis 10 μM . Nach Subtraktion des Blanks von den gemessenen Extinktionswerten konnte die berechnete Thiolkonzentration in die entsprechende Formel eingesetzt werden.

Berechnung der GSH/GSSG-Standardgerade:

$$y = k \cdot x + d$$

y = Extinktion 485 nm und Emission 520 nm

x = Konzentration in $\mu\text{mol/l}$

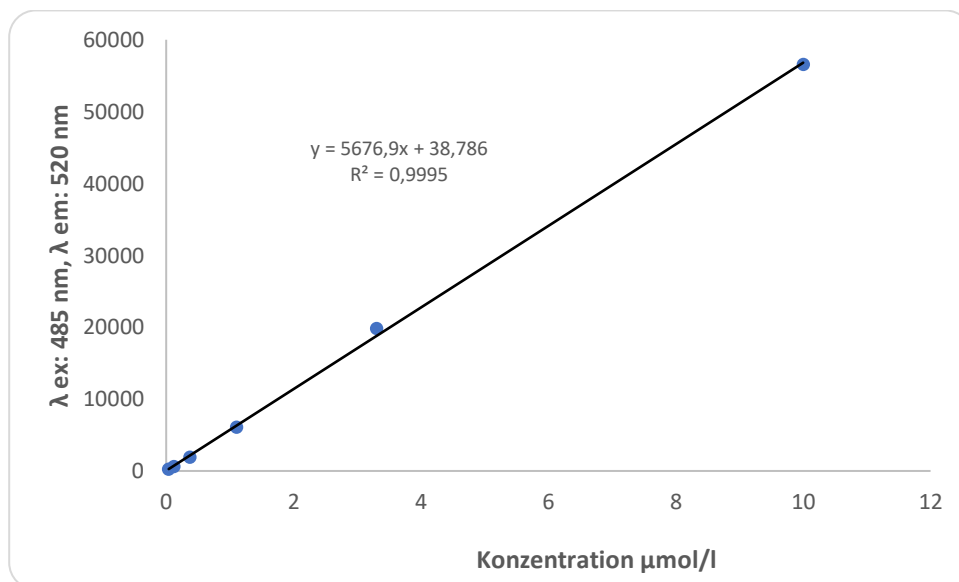


Abbildung 11: Standardgerade zur Berechnung der Thiol-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$].

3.7 Statistische Auswertung

Die Analyse der Messdaten für diese Studie wurde mit SPSS 27 für Mac durchgeführt. Die Darstellung der Aufteilung der Proband:Innen erfolgte unter Berücksichtigung von Geschlecht und Intervention mithilfe deskriptiver Statistik. Es gab drei Messzeitpunkte (T1, T2 und T3). Ausreißer wurden mithilfe von Boxplot-Diagrammen eliminiert. Für einen Vergleich aller zu untersuchenden Gruppen zu Beginn der Studie wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) für jede abhängige Variable bei T1 durchgeführt. Die Normalverteilung innerhalb des Datensatzes wurde mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests und durch Histogramme visualisiert. Trotz der Tatsache, dass keiner der Datensätze normalverteilt war, war die Anwendung von ANOVA-Modellen möglich, da diese robust gegenüber der Nichteinhaltung dieser Annahme sind (Field, 2017).

Zur Untersuchung der Effekte innerhalb der Gruppen wurden eine gemischte ANOVA und eine gemischte ANCOVA (Analysis of Covariance) auf der Grundlage der Daten der wiederholten Messungen durchgeführt. Um festzustellen, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Interventionsgruppen gab, wurde ein Bonferroni-korrigierter Post-hoc-Test durchgeführt. Im Rahmen der Analyse wurden sämtliche erforderlichen Tests durchgeführt und akzeptiert ($p > 0,05$). Dazu zählte der Box-Test, der zur Evaluierung der Korrektheit der Kovarianzmatrizen diente, sowie der Mauchly-Test zur Beurteilung der Sphärizität der Daten. Darüber hinaus fand der Levene-Test Verwendung, um die Homogenität der Varianzen zu evaluieren. Im Rahmen der durchgeführten Analyse wurden Sekundärdaten aus früheren Untersuchungen der NutriAging-Protein-Studie herangezogen, um bivariate Korrelationen zu untersuchen. Im Falle parametrischer Variablen wurde die sogenannte Pearson-Korrelation verwendet, während für nichtparametrische Variablen die Spearman-Korrelation zum Einsatz kam. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt definiert: $p < 0,05$ entspricht einer signifikanten, $p < 0,01$ einer höchst signifikanten und $p < 0,001$ einer hoch signifikanten Ergebnisgröße.

Die analytischen Laborarbeiten wurden gemeinsam mit Ricarda Baron durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wird der Fokus auf die Ergebnisse für FRAP, GSH, GSSG sowie das GSH-GSSG-Verhältnis bei den weiblichen Probandinnen gelegt, während die männlichen Probanden in der Arbeit von Baron behandelt wurden. Im Anschluss an die Darstellung der Ergebnisse erfolgt eine Gegenüberstellung der Daten für beide Geschlechter. Des Weiteren wurde für beide Geschlechter eine Analyse der Gesamthioler der High-Protein-Interventionsgruppe durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Analyse der Ausgangswerte – Frauen

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die Studienteilnehmer:innen nach Geschlecht unterteilt. Von den insgesamt 140 Teilnehmer:innen zum Untersuchungszeitpunkt T0 konnten nur die Daten von 117 Probanden ausgewertet werden, bei denen Daten zu allen drei Untersuchungszeitpunkten erhoben werden konnten. Diese wurden wie in Tab. 36 dargestellt, in drei Gruppen eingeteilt:

Tabelle 36: Anzahl der Studienteilnehmer:innen zu Beginn der Studie, aufgeteilt nach Geschlecht

Interventionsgruppe	Weiblich	Männlich	Gesamt
Kontrolle	25	18	43
Protein Low	19	16	35
Protein High	20	19	39
Gesamt	64	53	117

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Analyse der FRAP-, GSH- und GSSG-Werte sowie des GSH-GSSG-Ratio jedoch nur die Daten der Proband:innen ausgewertet, die die Studie vollständig abgeschlossen hatten und somit zu allen drei Untersuchungszeitpunkten anwesend waren. Somit konnten die Daten von 64 Frauen einbezogen werden. Für die Auswertung der Gesamtthiolbestimmung wurden hingegen nur die Daten der Proband:innen der PH-Gruppe herangezogen und es wurde nicht nach Geschlecht differenziert. Wie aus dem Kreisdiagramm (Abb. 12) hervorgeht, war die prozentuale Verteilung nach Interventionsgruppen annähernd homogen.

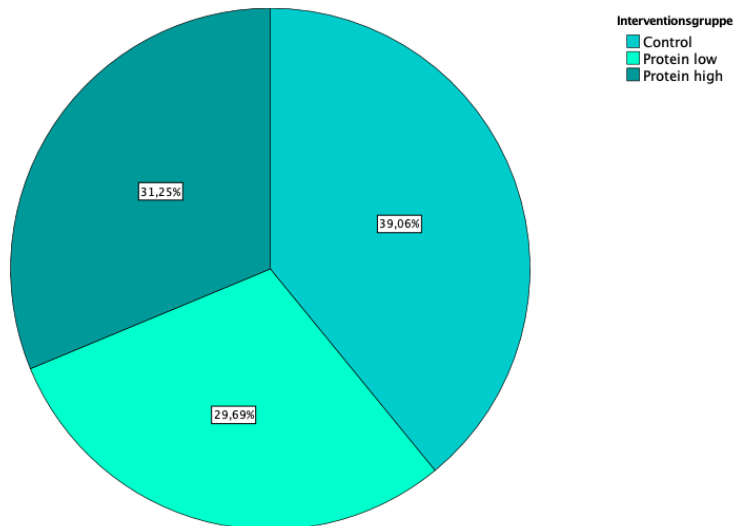


Abbildung 12: Aufteilung der Studienteilnehmer:innen nach Gruppenzuteilung in %

Tabelle 37: Durchschnittliche Mittelwerte ausgewählter Parameter zum Untersuchungstermin T0 bei den Frauen

Parameter	K-Gruppe	PL-Gruppe	PH-Gruppe	p-Wert
FRAP [$\mu\text{mol/l}$]	1194 $\pm$ 212	1130 $\pm$ 164	1104 $\pm$ 156	0,086
GSH [$\mu\text{mol/l}$]	15,42 $\pm$ 3,71	17,44 $\pm$ 3,71	15,98 $\pm$ 3,00	0,106
GSSG [$\mu\text{mol/l}$]	8,08 $\pm$ 1,51	8,24 $\pm$ 1,54	8,25 $\pm$ 1,31	0,073
GSH-GSSG-Ratio	1,91 $\pm$ 0,31	2,13 $\pm$ 0,32	1,96 $\pm$ 0,34	0,066
BMI [kg/m^2]	26,37 $\pm$ 4,30	25,41 $\pm$ 3,90	25,62 $\pm$ 4,60	0,098
Muskelmasse [kg]	22,12 $\pm$ 3,07	22,34 $\pm$ 3,82	21,80 $\pm$ 2,91	0,074
Körperfett [kg]	21,07 $\pm$ 7,02	19,93 $\pm$ 8,27	19,29 $\pm$ 7,78	0,087
Protein [g/kg BW/d]	0,78 $\pm$ 0,36	0,78 $\pm$ 0,27	0,68 $\pm$ 0,26	0,011*
Energieaufnahme [kcal/d]	1775 $\pm$ 840	1590 $\pm$ 488	1388 $\pm$ 342	0,146

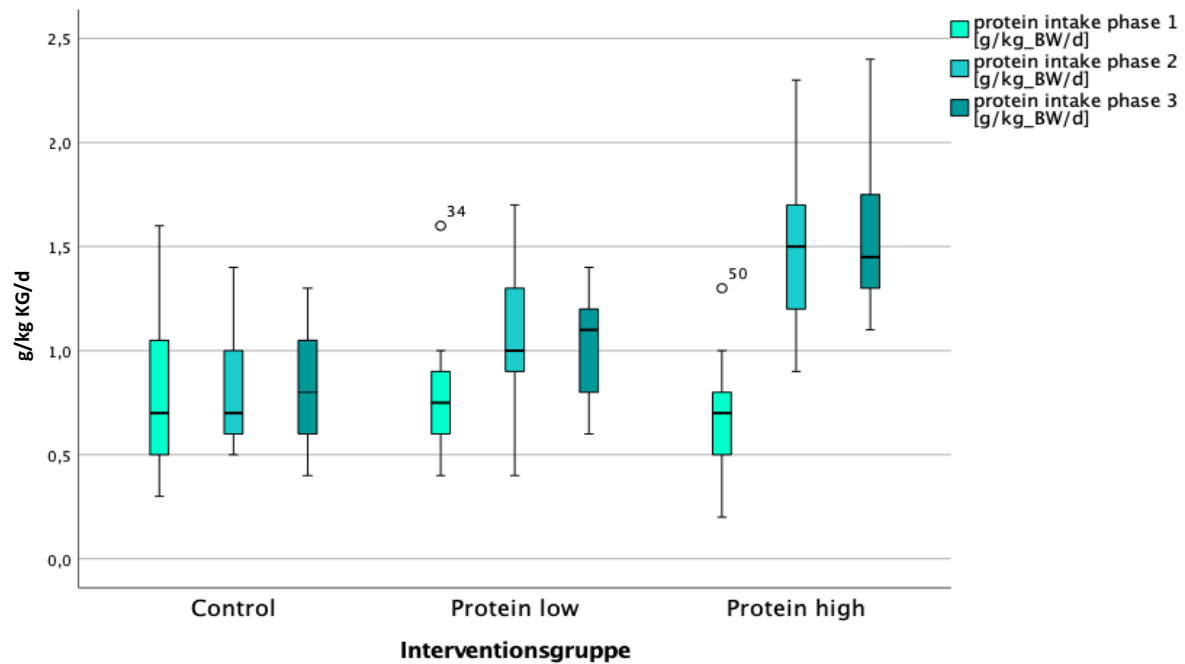


Abbildung 13: Proteinaufnahme in g/kg KG/d in den Gruppen zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 bei den Frauen

Für die Variable Interventionsgruppe war der Unterschied innerhalb der Gruppen signifikant. Entsprechend der Zielsetzung der Studie war dieser Haupteffekt abhängig von der Zeit ($p = 0,001$).

4.1.1 FRAP Auswertung - Frauen

Tabelle 38: Darstellung der durchschnittlichen FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.

Interventionsgruppe	FRAP 1 [$\mu\text{mol/l}$]	FRAP 2 [$\mu\text{mol/l}$]	FRAP 3 [$\mu\text{mol/l}$]
Kontrolle	1193,70 $\pm$ 212,13	1145,83 $\pm$ 186,68	1140,26 $\pm$ 181,16
Protein Low	1130,19 $\pm$ 163,69	1082,89 $\pm$ 129,80	1106,48 $\pm$ 119,53
Protein High	1104,42 $\pm$ 155,63	994,99 $\pm$ 145,55	958,48 $\pm$ 168,25

In Tabelle 38 lässt sich insbesondere in der PH-Gruppe ein deutlicher Abfall der FRAP-Konzentration zu den Zeitpunkten T1 sowie T2 beobachten. Dahingegen kam es in der K- und PL-Gruppe nur zu einer leichten Reduktion zwischen den Messzeitpunkten T0 und T1.

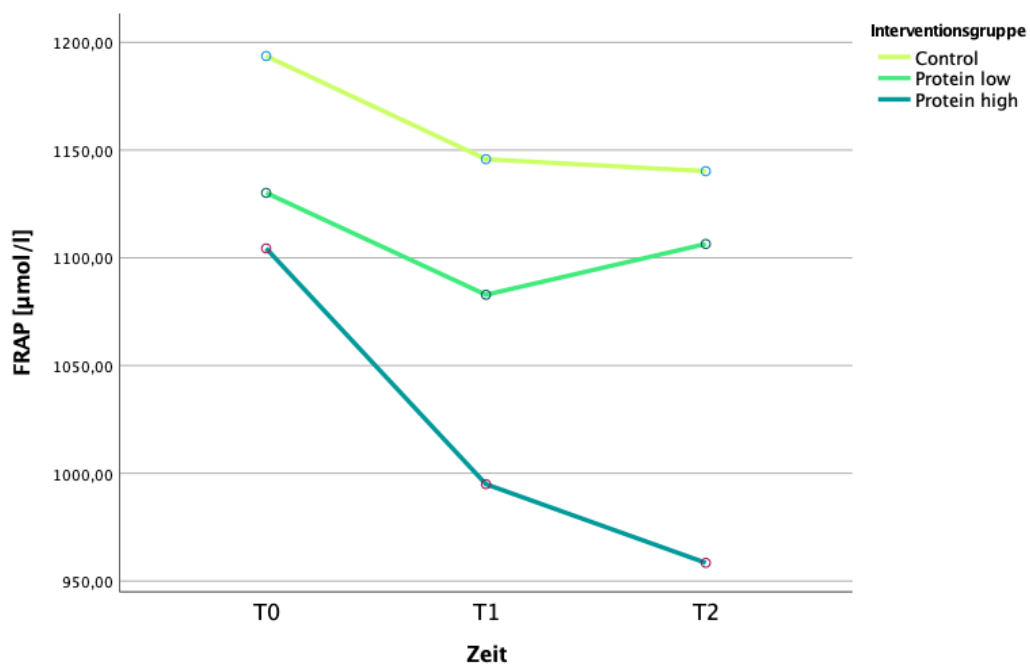


Abbildung 14: Verlauf der FRAP-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 bei den Frauen.

Abbildung 14 veranschaulicht die zuvor diskutierte Abnahme der FRAP-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] in allen Gruppen. Insbesondere in der PH-Gruppe zwischen dem Untersuchungszeitpunkt T0 und T1 ließ sich eine Reduktion der FRAP-Konzentration von ca. 9 % beobachten.

Tabelle 39: FRAP im Studienverlauf

Testverfahren	Variabel	p-Wert
Innersubjekteffekt	Zeit	0,001*
	Zeit * Interventionsgruppe	0,104
Zwischensubjekteffekt	Interventionsgruppe	0,008*

* Die Mittelwertdifferenz ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant.

Der statistische Test (mixed ANCOVA) wies jedoch auf keinen signifikanten Interaktionseffekt ($p = 0,104$) zwischen den beiden Haupteffekten Zeit und Interventionsgruppe hin. Der zeitliche Verlauf der Studie sowie die Intervention einer erhöhten Proteinzufuhr und das begleitende Krafttraining hatten demnach keinen signifikanten Einfluss auf die antioxidative Gesamtkapazität der Teilnehmer:innen. Betrachtet man die mittleren FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] der K- sowie der PL-Gruppe, blieben diese über den Verlauf der Studie konstant und es lässt sich in beiden Gruppen nur ein geringer, nicht signifikanter Unterschied feststellen. Lediglich in der PH-Gruppe kam es zu einer signifikanten Differenz der FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] zu den verschiedenen Messzeitpunkten. Der paarweise Vergleich nach Bonferroni verdeutlichte einen signifikanten Unterschied zwischen T0 und T1 ($p = 0,002$) sowie T0 und T2 ($p = 0,002$). Daraus lässt sich schließen, dass die erhöhte Proteinzufuhr von 2 g pro kg Körpergewicht am Tag zu einer Reduktion der FRAP-Konzentration führte. Das ab dem Messzeitpunkt T1 zusätzlich eingeführte Krafttraining hatte keinen signifikanten Effekt auf die FRAP-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$].

Tabelle 40: Statistische Auswertung der Assoziation zwischen FRAP zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 in der PH-Gruppe

Interventionsgruppe	Messzeitpunkt (1)	Messzeitpunkt (2)	p-Wert
PH	T0	T1	0,002*
	T0	T2	0,002*
	T1	T2	0,774

* Die Mittelwertdifferenz ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant.

4.1.2 FRAP Korrelationen - Frauen

In einer weiteren Analyse wurden die möglichen Beziehungen zwischen den FRAP-Konzentrationen und weiteren Parametern, die bereits im Datensatz erfasst worden waren, untersucht. Um mögliche Zusammenhänge mittels bivariater Korrelation zu berechnen, wurde die mittlere FRAP-Konzentration aller Gruppen zum Messzeitpunkt T0 (1142,77 $\mu\text{mol/l}$) herangezogen und in weiterer Folge die durchschnittliche FRAP-Konzentration je Interventionsgruppe und Messzeitpunkt.

Tabelle 41: Korrelationen zwischen FRAP und anthropometrischen Messungen von T0

Parameter	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
BMI [kg/m^2]	0,355**	0,004
FFM [kg]	0,232	0,068
Muskelmasse [kg]	0,197	0,122
Fettmasse [kg]	0,346**	0,006

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Zum Messzeitpunkt T0 ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der FRAP-Konzentration und den Parametern BMI [kg/m^2] ($r = 0,355$, $p = 0,004$) und Fettmasse [kg] ($r = 0,346$; $p = 0,006$) nachweisen (Tab. 34). Dies ist grafisch in den Abbildungen 15 und 16 dargestellt.

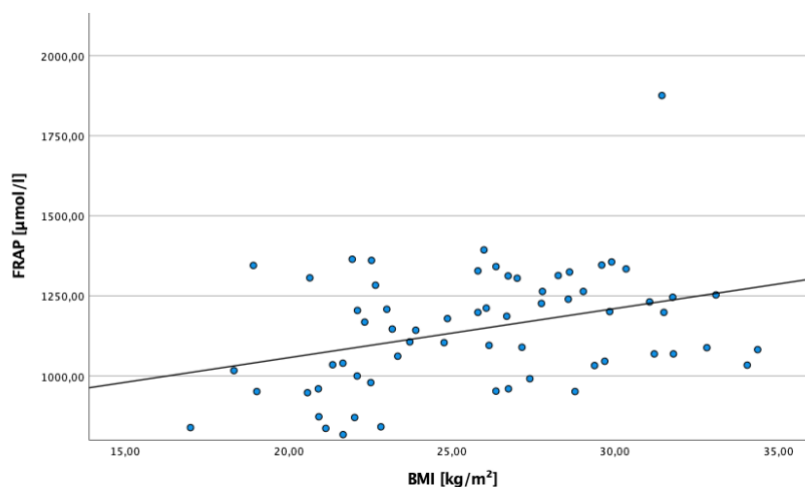


Abbildung 15: Korrelation zwischen FRAP [$\mu\text{mol/l}$] und der BMI [kg/m^2] zum Zeitpunkt T0

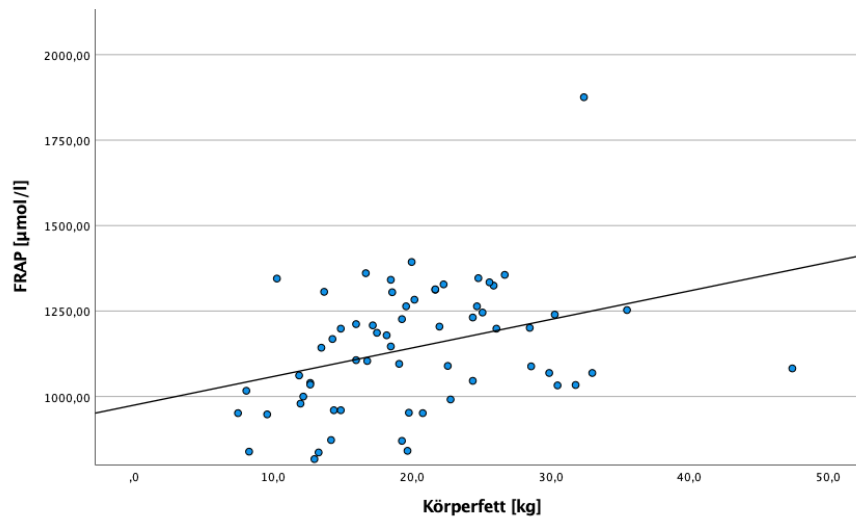


Abbildung 16: Korrelation zwischen FRAP [$\mu\text{mol/l}$] und dem Fettmasse [kg] zum Zeitpunkt T0

FRAP und Proteinzufuhr zu den Messzeitpunkten T1 und T2

Tabelle 42: Korrelation zwischen FRAP und der Proteinzufuhr nach Gruppen zu den Messzeitpunkten T1 und T2

Parameter	Gruppe	Messzeitpunkt	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Proteinzufuhr [g/kg BW/d]	K	T1	-0,428*	0,037
		T2	-0,321	0,117
	PL	T1	0,105	0,670
		T2	0,151	0,536
	PH	T1	-0,395	0,085
		T2	-0,136	0,566

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

In Tabelle 42 wird ersichtlich, dass lediglich in der K-Gruppe zum Messzeitpunkt T1 eine leichte negative Korrelation zwischen den Parametern FRAP [$\mu\text{mol/l}$] und Proteinzufuhr [g/kg KG/d] besteht. Das bedeutet, es konnte ein leicht signifikanter Zusammenhang zwischen den FRAP-Konzentrationen und der Proteinzufuhr in der K-Gruppe zum Messzeitpunkt T1 (T1: $r = -0,428$) ermittelt werden.

FRAP Korrelationen – Frauen und antioxidativ wirksame Substanzen

Tabelle 43: Korrelation zwischen FRAP und Harnsäure nach Gruppen zum Messzeitpunkt T0, T1 und T2

Parameter	Gruppe	Messzeitpunkt	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Harnsäure	K	T0	0,880**	0,001
		T1	0,892**	0,001
		T2	0,846**	0,001
	PL	T0	0,725**	0,001
		T1	0,860**	0,001
		T2	0,367	0,123
	PH	T0	0,899**	0,001
		T1	0,936**	0,001
		T2	0,704**	0,001

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Tabelle 43 zeigt einen stark positiv signifikanten Zusammenhang zwischen FRAP und den Harnsäurekonzentrationen [mg/dl] in fast allen Gruppen ($p < 0,05$) zu allen 3 Messzeitpunkten. Einzig in der PL-Gruppe zum Messzeitpunkt T2 bestand keine signifikante Korrelation ($r = 0,367$; $p = 0,123$).

Tabelle 44: Korrelation zwischen FRAP und den funktionellen Parametern in allen Gruppen zum Messzeitpunkt T0

Parameter	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Handgrip-strength-dominant [kg]	0,012	0,925
Handgrip-strength-non-dominant [kg]	-0,208	0,107
30-s Chair stand [s]	0,016	0,903
Time up and go [s]	0,190	0,134
6-min walk [m]	-0,358**	0,004

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

In der vorliegenden Untersuchung wurde geprüft, ob zwischen den zu Studienbeginn bei Untersuchungstermin T0 erfassten funktionellen Parametern und den FRAP-Werten von T0 eine Korrelation besteht. Wie in Tab. 44 dargestellt, zeigte sich zwischen FRAP und den Ergebnissen des 6-min-Walk-Tests ein signifikanter negativer Zusammenhang ($r = -0,358$; $p = 0,004$).

Des Weiteren wurde eine Untersuchung der bivariaten Korrelationen der funktionellen Parameter in den Gruppen K, PL und PH durchgeführt. Hierbei ergab sich in der PH-Gruppe

ein leicht signifikanter negativer Zusammenhang ($r = -0,495$; $p = 0,027$). Für die Messzeitpunkte T1 und T2 konnten keine signifikanten Korrelationen festgestellt werden.

4.1.3 Glutathion Auswertung – Frauen

Tabelle 45: Darstellung der durchschnittlichen GSH-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.

Interventionsgruppe	GSH 1 [$\mu\text{mol/l}$]	GSH 2 [$\mu\text{mol/l}$]	GSH 3 [$\mu\text{mol/l}$]
Kontrolle	15,42 $\pm$ 3,71	15,15 $\pm$ 2,84	15,92 $\pm$ 2,96
Protein Low	17,44 $\pm$ 3,71	15,77 $\pm$ 3,25	16,70 $\pm$ 3,20
Protein High	15,98 $\pm$ 3,00	15,83 $\pm$ 2,01	15,45 $\pm$ 2,27

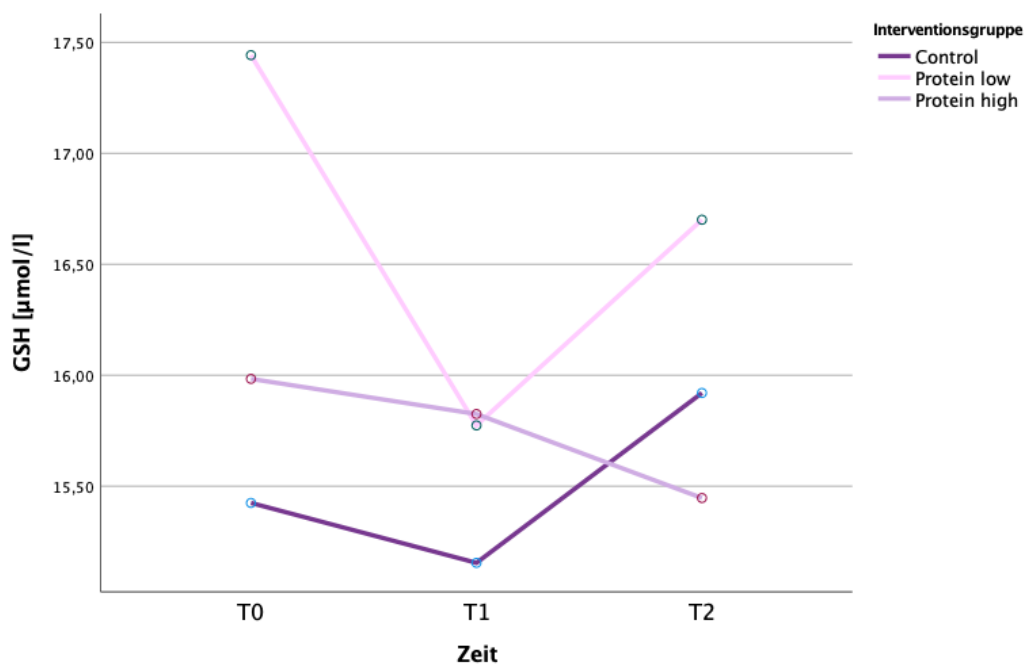


Abbildung 17: Verlauf der GSH-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 bei den Frauen.

Im Laufe der Studie veränderten sich die GSH-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] in allen drei Gruppen. Zwischen T0 und T1 konnte eine Verringerung der GSH-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] in allen Gruppen gezeigt werden, in der PH-Gruppe waren die die GSH-Werte [$\mu\text{mol/l}$] zum Zeitpunkt T2 niedriger als zu T1, wie in Abb. 17 grafisch dargestellt ist. Im Gegensatz dazu kam es in der K- sowie in der PL-Gruppe zu einem Anstieg der GSH-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] zwischen T1 und T2.

Tabelle 46: GSH im Studienverlauf

Testverfahren	Variabel	p-Wert
Innersubjekteffekt	Zeit	0,073
	Zeit * Interventionsgruppe	0,064
Zwischensubjekteffekt	Interventionsgruppe	0,377

* Die Mittelwertdifferenz ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant.

Die statistische Auswertung (mixed ANCOVA) ergab keinen signifikanten Interaktionseffekt zwischen den beiden Haupteffekten und es konnte auch kein statistisch signifikanter zeitlicher oder auf die Zuteilung der verschiedenen Interventionsgruppen zurückzuführender Effekt ermittelt werden.

4.1.4 GSSG Auswertung – Frauen

Tabelle 47: Darstellung der durchschnittlichen GSSG-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.

Interventionsgruppe	GSSG 1 [$\mu\text{mol/l}$]	GSSG 2 [$\mu\text{mol/l}$]	GSSG 3 [$\mu\text{mol/l}$]
Kontrolle	8,08 $\pm$ 1,51	7,85 $\pm$ 1,71	8,53 $\pm$ 1,34
Protein Low	8,24 $\pm$ 1,54	7,59 $\pm$ 1,64	8,34 $\pm$ 1,38
Protein High	8,25 $\pm$ 1,31	8,15 $\pm$ 1,15	8,11 $\pm$ 0,85

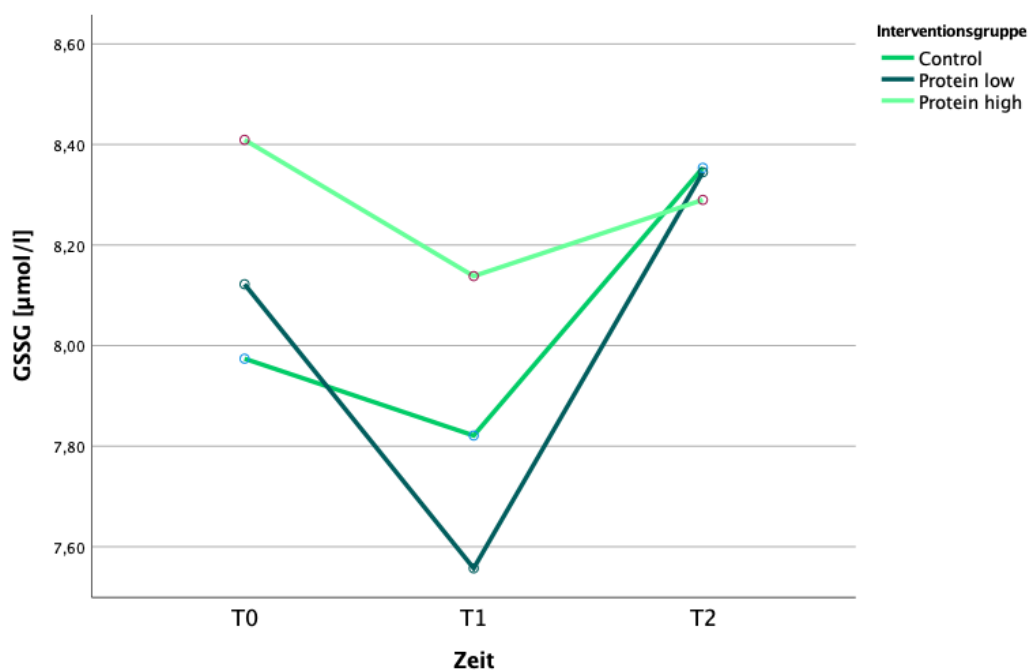


Abbildung 18: Verlauf der GSSG-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 bei den Frauen.

Die statistische Auswertung (mixed ANCOVA) ergab keinen signifikanten Interaktionseffekt ($p = 0,303$) zwischen den beiden Haupteffekten sowie der Ernährungs- und Krafttrainingsintervention. Lediglich zwischen den Messzeitpunkten ließ sich ein statistisch signifikanter Effekt ($p = 0,031$) beobachten. In der nach Proteinzufuhr getrennten statistischen Auswertung zeigte sich, dass dieser Effekt lediglich auf eine Veränderung der GSSG-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] in der PL-Gruppe zwischen den Messzeitpunkten T1 und T2 ($p = 0,041$) zurückzuführen ist (siehe Tab. 49).

Tabelle 48: GSSG im Studienverlauf

Testverfahren	Variabel	p-Wert
Innersubjekteffekt	Zeit	0,031*
	Zeit * Interventionsgruppe	0,303
Zwischensubjekteffekt	Interventionsgruppe	0,947

*Die Mittelwertdifferenz ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant.

Tabelle 49: Statistische Auswertung der Assoziation zwischen GSSG zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 in der PL-Gruppe

Interventionsgruppe	Messzeitpunkt (1)	Messzeitpunkt (2)	p-Wert
PL	T0	T1	0,065
	T0	T2	1,000
	T1	T2	0,041*

*Die Mittelwertdifferenz ist in Stufe 0,05 signifikant.

4.1.5 GSH-GSSG-Ratio - Frauen

Tabelle 50: Darstellung der durchschnittlichen GSH-GSSG-Ratios in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.

Interventionsgruppe	GSH-GSSG-Ratio T0	GSH-GSSG-Ratio T1	GSH-GSSG-Ratio T2
Kontrolle	1,91 $\pm$ 0,31	1,99 $\pm$ 0,33	1,90 $\pm$ 0,39
Protein Low	2,13 $\pm$ 0,32	2,13 $\pm$ 0,46	2,04 $\pm$ 0,36
Protein High	1,96 $\pm$ 0,34	1,96 $\pm$ 0,28	1,91 $\pm$ 0,29

Wie in Tab. 50 abgebildet, ließen sich keine deutlichen Veränderungen des GSH-GSSG-Ratio innerhalb der Gruppen im Verlauf der Studie beobachten. Lediglich in der PL-Gruppe konnte zu allen drei Messzeitpunkten ein höherer Wert als in der K- und der Ph-Gruppe festgestellt werden (siehe Abb. 19). Die mittleren Werte des GSH-GSSG-Verhältnisses lagen in der K- und

der PH-Gruppe zwischen $1,91 \pm 0,29$ und $1,99 \pm 0,33$ und in der PL-Gruppe zwischen $2,04 \pm 0,36$ und $2,13 \pm 0,46$.

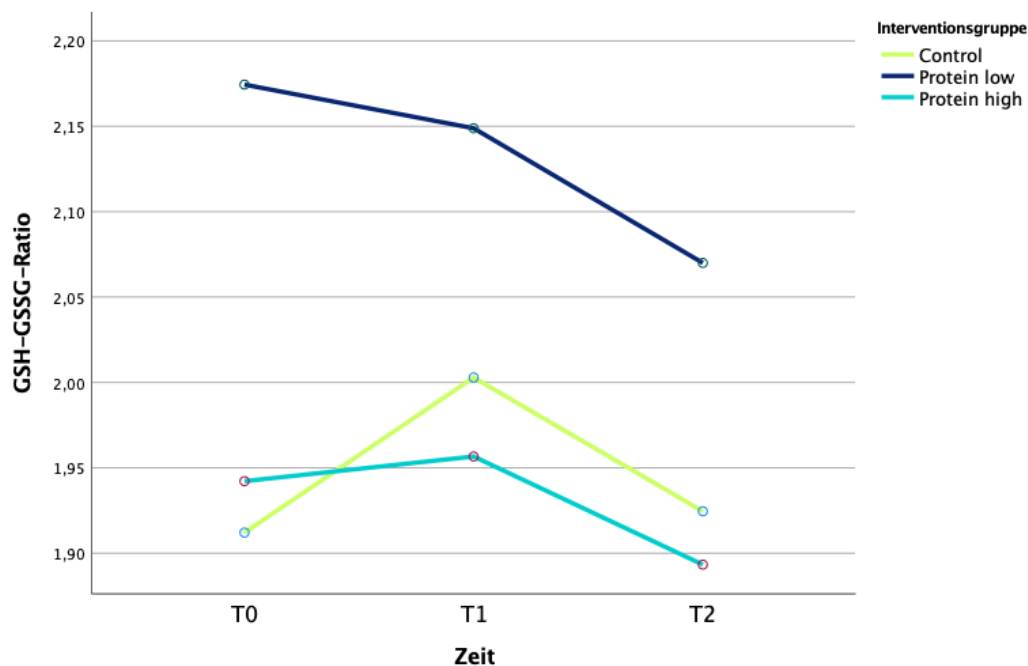


Abbildung 19: Verlauf des GSH-GSSG-Ratios in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2.

Anhand der statistischen Auswertung (mixed ANCOVA) konnte kein signifikanter Interaktionseffekt ($p = 0,303$) zwischen den beiden Haupteffekten sowie der Ernährungs- und Krafttrainingsintervention ermittelt werden. Lediglich zwischen den Messzeitpunkten ließ sich ein statistisch signifikanter Effekt ($p = 0,031$) beobachten. In der getrennten statistischen Auswertung zeigte sich jedoch, dass dieser lediglich auf eine Veränderung der GSSG-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] in der PL-Gruppe zwischen den Messzeitpunkten T1 und T2 ($p = 0,041$) zurückging (siehe Tab. 49).

Tabelle 51: GSH-GSSG-Ratio im Studienverlauf

Testverfahren	Variabel	p-Wert
Innersubjekteffekt	Zeit	0,233
	Zeit * Interventionsgruppe	0,895
Zwischensubjekteffekt	Interventionsgruppe	0,142

4.1.6 GSH-GSSG-Ratio Korrelationen – Frauen

Tabelle 52: Korrelation zwischen des GSH-GSSG-Ratio und den funktionellen Parametern in allen Gruppen zum Messzeitpunkt T0.

Parameter	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Handgrip-strength-dominant [kg]	0,305*	0,014
Handgrip-strength-non-dominant [kg]	0,147	0,258
30-s Chair stand [s]	-0,108	0,398
Time up and go [s]	0,001	0,999
6-min walk [m]	0,014	0,931

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Tabelle 52 zeigt eine positive Korrelation zwischen dem Handgrip-Strength-Dominant-Test ($r = 0,305$; $p = 0,014$) und dem GSH-GSSG-Verhältnis zum Zeitpunkt T0. Die bivariaten Korrelationen wurden darüber hinaus innerhalb der K-, PL- und PH-Gruppe untersucht (Tab. 53). Die Analysen zeigten eine Korrelation ($r = 0,535$; $p = 0,018$) in der PL-Gruppe. Zu den Messzeitpunkten T1 und T2 konnten keine signifikanten Ergebnisse beobachtet werden.

Tabelle 53: Korrelation zwischen des GSH-GSSG-Ratio und den funktionellen Parametern in allen Gruppen zum Messzeitpunkt T0, T1 und T2

Parameter	Gruppe	Messzeitpunkt	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Handgrip strength dominant [kg]	K	T0	0,313	0,128
		T1	0,286	0,166
		T2	0,383	0,064
	PL	T0	0,535*	0,018
		T1	-0,089	0,718
		T2	0,017	0,946
	PH	T0	0,086	0,719
		T1	-0,038	0,874
		T2	0,266	0,257

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

4.2 Thiole in der PH-Gruppe – Männer und Frauen

Tabelle 54: Darstellung der durchschnittlichen Thiol-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] in der PH-Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.

Interventionsgruppe	Thiol 1 [$\mu\text{mol/l}$]	Thiol 2 [$\mu\text{mol/l}$]	Thiol 3 [$\mu\text{mol/l}$]
Frauen	$10,52 \pm 2,14$	$9,95 \pm 1,19$	$10,10 \pm 2,00$
Männer	$10,89 \pm 1,30$	$10,13 \pm 1,52$	$10,57 \pm 1,78$
Gesamt	$10,71 \pm 1,76$	$10,04 \pm 1,35$	$10,34 \pm 1,88$

Es konnte kein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied der Konzentration der reduzierten Thiole in den Proben der PH-Gruppe zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 festgestellt werden, wie in Abb. 20 grafisch dargestellt.

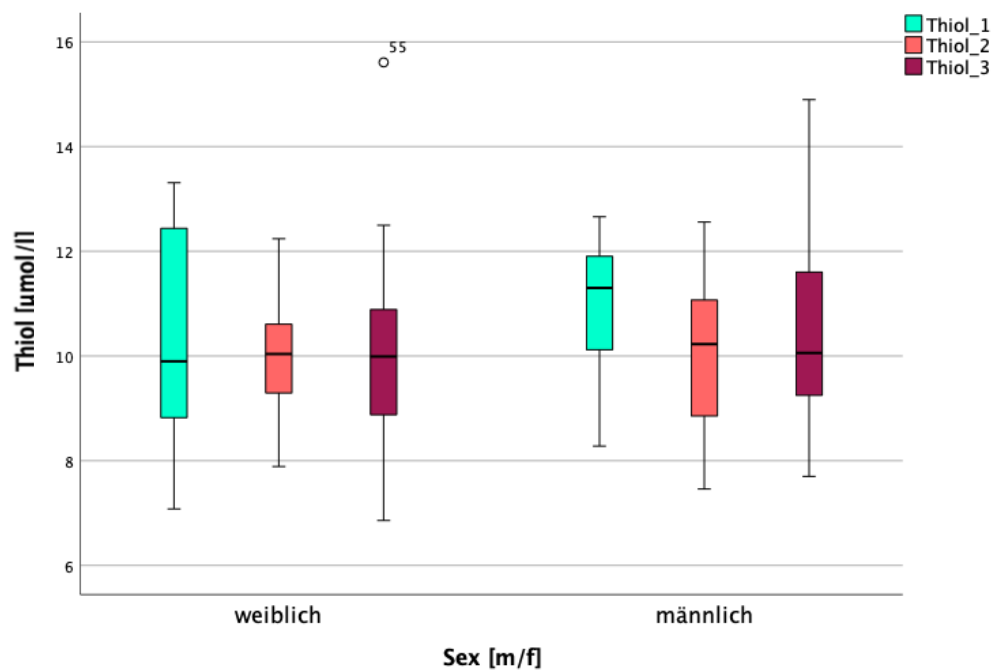


Abbildung 20: Thiol-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] in der PH-Gruppe zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2.

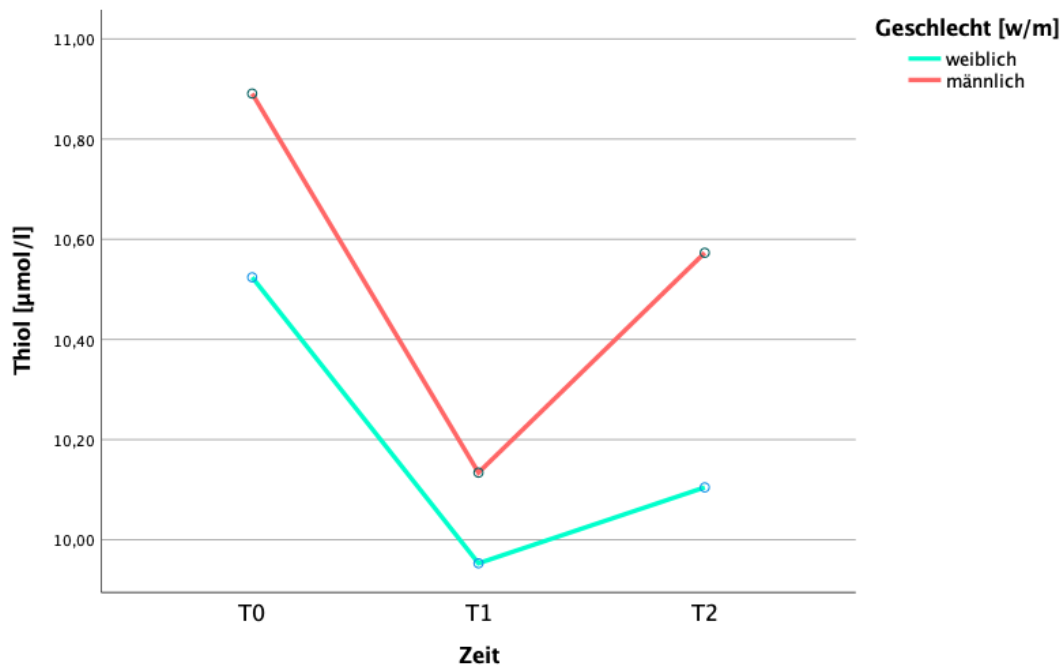


Abbildung 21: Verlauf der Thiol-Konzentrationen [µmol/l] in der PH-Gruppe zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2

Nur im zeitlichen Verlauf wurde eine Abnahme der Konzentration der reduzierten Thiole zwischen T0 und T1 beobachtet, die mit dem Beginn der Ernährungsintervention und der erhöhten Proteinzufuhr von 2 g pro kg Körpergewicht am Tag einherging. Mit Beginn der Bewegungsintervention zu T1 war ein Wiederaanstieg der reduzierten Thiolkonzentration zu beobachten.

Tabelle 55: Thiole im Studienverlauf der PH-Gruppe

Testverfahren	Variabel	p-Wert
Innersubjekteffekt	Zeit	0,086
	Zeit*Geschlecht	0,885
Zwischensubjekteffekt	Geschlecht	0,437

Die statistische Analyse (mixed ANCOVA) ergab keine signifikanten Interaktionseffekte zwischen den beiden Haupteffekten und auch keine signifikanten Effekte für Zeit oder Geschlecht. Da im Rahmen der Analyse der reduzierten Thiole keine statistisch signifikanten Resultate in der Stichprobe der PH-Gruppe ermittelt wurden, wurde auf eine weitere Darstellung verzichtet.

4.3 Auswertung – Männer und Frauen

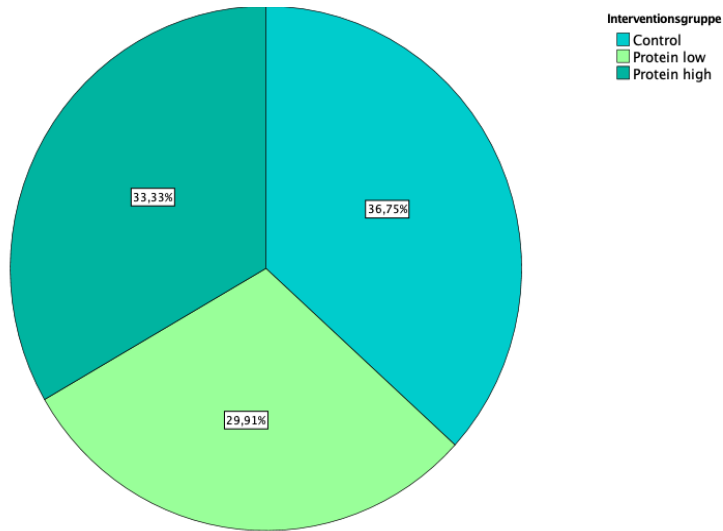


Abbildung 22: Aufteilung der Studienteilnehmer:innen nach Gruppenzugehörigkeit in %.

Für eine umfassende Analyse wurden die geschlechtsgetrennten Ergebnisse der Frauen sowie die Daten aller 117 Proband:innen gemeinsam betrachtet. Dabei wurden die FRAP-, GSH- und GSSG-Werte sowie das Verhältnis von reduziertem Glutathion (GSH) zu oxidiertem Glutathion (GSSG) bei den männlichen und weiblichen Teilnehmern, die die Studie vollständig abgeschlossen haben, analysiert. Die Verteilung der 117 Studienteilnehmer nach ihrer Gruppenzugehörigkeit ist in Abbildung 22 in Prozent dargestellt.

4.3.1 FRAP Auswertung – Männer und Frauen

Tabelle 56: Darstellung der durchschnittlichen FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.

Interventionsgruppe	FRAP 1 [$\mu\text{mol/l}$]	FRAP 2 [$\mu\text{mol/l}$]	FRAP 3 [$\mu\text{mol/l}$]
Frauen	1147 $\pm$ 183	1080 $\pm$ 169	1073 $\pm$ 177
Männer	1217 $\pm$ 171	1191 $\pm$ 158	1152 $\pm$ 158
Gesamt	1179 $\pm$ 181	1130 $\pm$ 172	1109 $\pm$ 173

Betrachtet man die FRAP-Werte zu den Zeitpunkten T0, T1 und T2 getrennt nach Geschlecht, zeigt sich, dass die Männer generell höhere FRAP-Konzentrationen aufwiesen als die Frauen (siehe Tab. 56). Dieser geschlechtsspezifische Unterschied wird auch bei der Differenzierung nach Interventionsgruppen (siehe Tab. 57) ersichtlich. Insbesondere in der PH-Gruppe lagen zu allen drei Messzeitpunkten geschlechtsspezifische Unterschiede in der FRAP-Konzentration vor.

Tabelle 57: Darstellung der durchschnittlichen FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] nach Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.

Interventionsgruppe	Geschlecht	FRAP 1 [$\mu\text{mol/l}$]	FRAP 2 [$\mu\text{mol/l}$]	FRAP 3 [$\mu\text{mol/l}$]
Kontrolle	Frauen	1194 $\pm$ 212	1146 $\pm$ 187	1140 $\pm$ 181
	Männer	1187 $\pm$ 148	1219 $\pm$ 151	1180 $\pm$ 152
	<i>Gesamt</i>	1191 $\pm$ 186	1176 $\pm$ 174	1157 $\pm$ 169
Protein Low	Frauen	1130 $\pm$ 164	1083 $\pm$ 130	1106 $\pm$ 120
	Männer	1204 $\pm$ 179	1207 $\pm$ 173	1176 $\pm$ 188
	<i>Gesamt</i>	1164 $\pm$ 172	1140 $\pm$ 162	1138 $\pm$ 156
Protein High	Frauen	1104 $\pm$ 156	995 $\pm$ 146	958 $\pm$ 168
	Männer	1257 $\pm$ 185	1150 $\pm$ 151	1104 $\pm$ 131
	<i>Gesamt</i>	1179 $\pm$ 185	1071 $\pm$ 166	1029 $\pm$ 167

Im Verlauf der Studie kam es insbesondere in der PH-Gruppe zu einem Abfall der FRAP-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] von ca. 10 % zwischen T0 und T1, wie in Abbildung 23 dargestellt ist. Zusätzlich konnte in der PH-Gruppe ein geschlechtsspezifischer Unterschied beobachtet werden und die FRAP-Werte der Männer waren zum Messzeitpunkt T0 ungefähr 12 %, zum

Messzeitpunkt T1 etwa 14 % und zum Messzeitpunkt T2 ca. 13 % höher als die der Frauen innerhalb der PH-Gruppe.

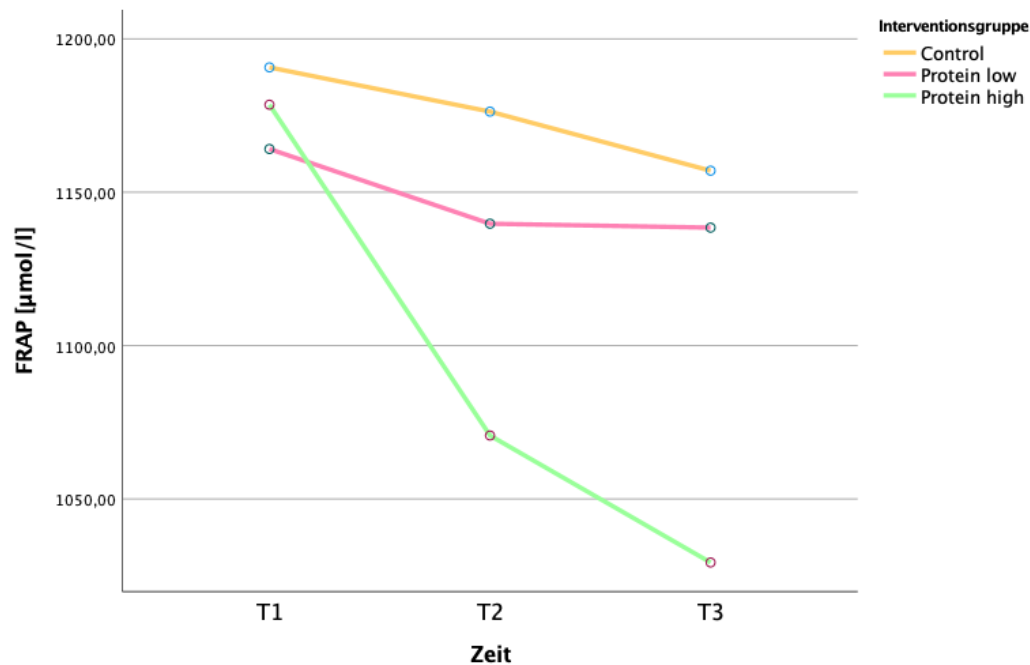


Abbildung 23: Verlauf der FRAP-Konzentrationen [µmol/l] in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2.

Tabelle 58: FRAP im Studienverlauf

Testverfahren	Variabel	p-Wert
Innersubjekteffekt	Zeit	0,001*
	Zeit * Interventionsgruppe	0,001*
	Zeit*Geschlecht	0,240
	Zeit*Interventionsgruppe*Geschlecht	0,746
Zwischensubjekteffekt	Interventionsgruppe	0,033*
	Geschlecht	0,001*
	Interventionsgruppe*Geschlecht	0,194

* Die Mittelwertdifferenz ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant.

Die statistische Auswertung (mixed ANOVA) zeigte lediglich einen signifikanten Interaktionseffekt aufgrund des zeitlichen Verlauf der Studie ($p = 0,001$) und zwischen den beiden Haupteffekten Zeit*Interventionsgruppe ($p = 0,001$), jedoch nicht zwischen den

Haupteffekten Zeit*Geschlecht oder Zeit*Interventionsgruppe*Geschlecht. Es gab einen schwach statistisch signifikanten Intersubjekteffekt zwischen den Interventionsgruppen ($p = 0,033$) und einen signifikanten Effekt durch das Geschlecht ($p = 0,001$).

Zum Zeitpunkt T0 gab es keinen signifikanten Unterschied der FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] zwischen den Gruppen. Zum Zeitpunkt T1 gab es einen signifikanten Unterschied der FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] zwischen der K- und der PH-Gruppe. Zum Zeitpunkt T2 konnte ein signifikanter Unterschied in den FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] zwischen der K- und der PH-Gruppe sowie zwischen der PL- und der PH-Gruppe beobachtet werden ($p = 0,011$).

Tabelle 59: FRAP im Studienverlauf in der PH-Gruppe

Testverfahren	Variabel	p-Wert
Innersubjekteffekt	Zeit	0,001*
	Zeit * Geschlecht	0,966

* Die Mittelwertdifferenz ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant.

Tabelle 60: FRAP zu den Messzeitpunkten T0, T1, T2 in der PH-Gruppe

Interventionsgruppe	Messzeitpunkt (1)	Messzeitpunkt (2)	p-Wert
PH	T0	T1	0,001*
		T2	0,001*
	T1	T2	0,297

* Die Mittelwertdifferenz ist auf dem Niveau von 0,05 signifikant.

In den Interventionsgruppen zeigten sich geschlechtsspezifische Unterschiede in der Gruppe PL ($p = 0,041$) und in der Gruppe PH ($p = 0,001$) mit einer signifikanten Reduktion der FRAP-Werte bei den Frauen.

4.3.2 FRAP Korrelationen – Männer und Frauen

Tabelle 61: Korrelation zwischen FRAP [$\mu\text{mol/l}$] und der Proteinaufnahme zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 für Männer und Frauen.

Parameter	Messzeitpunkt	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Proteinaufnahme [g/kg KG/d]	T0	-0,055	0,557
	T1	-0,238*	0,010
	T2	-0,270**	0,003

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant.

Bei der Datenaufteilung nach Gruppen wurden keine Korrelationen festgestellt. Lediglich die Geschlechteraufteilung zeigte eine signifikante negative Korrelation bei den Frauen zu den Messzeitpunkten T1 ($r = -0,452$, $p = 0,001$) und T2 ($r = -0,423$, $p = 0,001$).

Tabelle 62: Korrelation zwischen FRAP [$\mu\text{mol/l}$] und den anthropometrischen Messungen bei allen Gruppen zum Messzeitpunkt T0 für Frauen und Männer.

Parameter	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
BMI [kg/m^2]	0,386**	0,001*
FFM [kg]	0,386**	0,001*
Muskelmasse [kg]	0,330**	0,001*
Fettmasse [kg]	0,273**	0,004*

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

Zwischen der FRAP-Konzentration und verschiedenen Parametern zum Messzeitpunkt T0 konnte eine signifikante Korrelation festgestellt werden: BMI [kg/m^2] ($r = 0,386$, $p = 0,001$), FFM [kg] ($r = 0,386$, $p = 0,001$), Muskelmasse [kg] ($r = 0,330$, $p = 0,001$) und Fettmasse [kg] ($r = 0,346$; $p = 0,006$).

Tabelle 63: Korrelation zwischen FRAP [$\mu\text{mol/l}$], Harnsäure [mg/dl] und Kreatinin [mg/dl] zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2 für Frauen und Männer.

Parameter	Messzeitpunkt	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Harnsäure [mg/dl]	T0	0,859**	0,001
	T1	0,915**	0,001
	T2	0,761**	0,001
Kreatinin [mg/dl]	T0	0,511**	0,001
	T1	0,450**	0,001
	T2	0,279**	0,002

** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

In Tab. 63 ist ein deutlich positiver und signifikanter Zusammenhang zwischen FRAP und der Harnsäurekonzentration (mg/dl) sowie der Kreatinin Konzentration (mg/dl) in fast allen Gruppen ($p < 0,05$) zu allen 3 Messzeitpunkten dargestellt. Lediglich für die Kreatinin Konzentration ($r = 0,367$; $p = 0,123$) bestand bei den Männern zum Messzeitpunkt T2 kein signifikanter Zusammenhang.

4.3.3 GSH-GSSG-Ratio – Männer und Frauen

Tabelle 64: Darstellung des durchschnittlichen GSH-GSSG-Ratio in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.

Interventionsgruppe	GSH-GSSG-Ratio 1	GSH-GSSG-Ratio 2	GSH-GSSG-Ratio 3
Frauen	1,99 ± 0,33	2,02 ± 0,39	1,95 ± 0,35
Männer	1,99 ± 0,36	1,92 ± 0,28	1,92 ± 0,31
Gesamt	1,99 ± 0,34	1,97 ± 0,35	1,93 ± 0,33

Der GSH-GSSG-Ratio der Frauen war gegenüber dem der Männer zu den Messzeitpunkten T1 und T2 etwas höher (siehe Tab. 64). Nach Interventionsgruppe unterteilt zeigte sich jedoch lediglich in der PL-Gruppe ein geschlechtsspezifischer Unterschied des GSH-GSSG-Verhältnisses (siehe Tab. 65).

Tabelle 65: Darstellung des durchschnittlichen GSH-GSSG-Ratios nach Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2. Mittelwert und Std.-Abweichung.

Interventionsgruppe	Geschlecht	GSH-GSSG-Ratio 1	GSH-GSSG-Ratio 2	GSH-GSSG-Ratio 3
Kontrolle	Frauen	1,91 ± 0,30	1,99 ± 0,40	1,90 ± 0,39
	Männer	2,02 ± 0,38	1,93 ± 0,31	1,90 ± 0,29
	<i>Gesamt</i>	1,96 ± 0,34	1,96 ± 0,36	1,90 ± 0,35
Protein Low	Frauen	2,13 ± 0,32	2,13 ± 0,46	2,04 ± 0,36
	Männer	1,99 ± 0,27	1,89 ± 0,22	1,86 ± 0,29
	<i>Gesamt</i>	2,07 ± 0,30	2,02 ± 0,39	1,96 ± 0,34
Protein High	Frauen	1,96 ± 0,34	1,96 ± 0,28	1,92 ± 0,29
	Männer	1,96 ± 0,42	1,94 ± 0,29	1,98 ± 0,34
	<i>Gesamt</i>	1,96 ± 0,38	1,95 ± 0,29	1,95 ± 0,31

Wie in Tab. 65 zu sehen ist, gab es keinen geschlechtsspezifischen Unterschied in den Gruppen oder zwischen den Gruppen zu den drei Messterminen (T0, T1, T2).

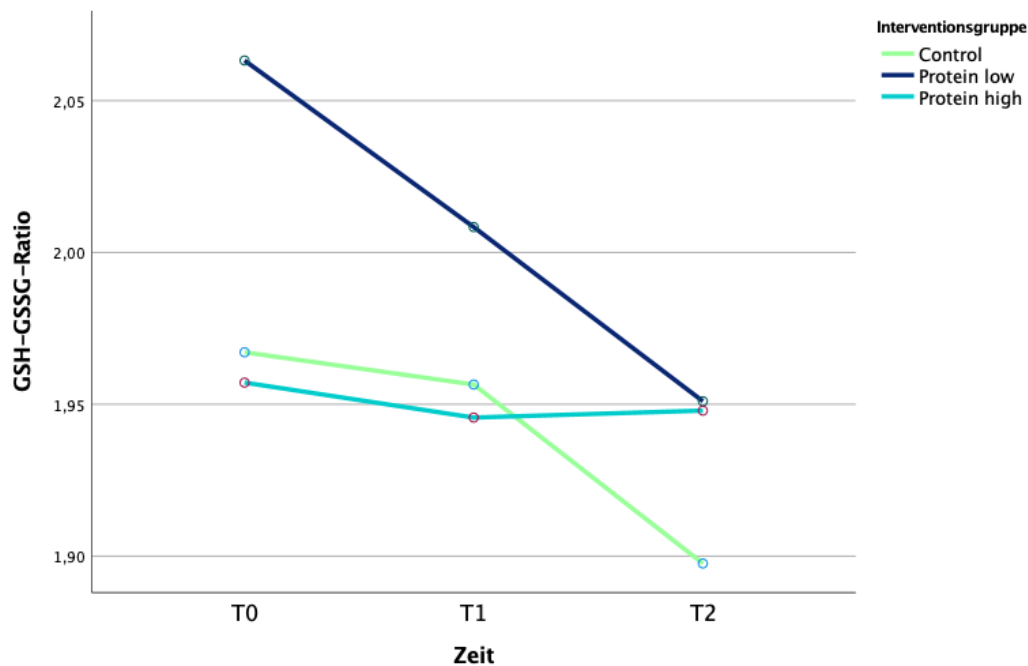


Abbildung 24: Verlauf GSH/GSSG-Ratio in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T0, T1 und T2.

Aus dem Diagramm geht hervor, dass die PL-Gruppe zu allen drei Messzeitpunkten das höchste GSH-GSSG-Verhältnis aufwies. In der PH- und der K-Gruppe war der Verlauf des GSH-GSSG-Ratio zwischen T0 und T1 ähnlich, lediglich zu T2 kam es in der K-Gruppe zu einer Abnahme des GSH-GSSG-Ratio, in der PH-Gruppe zu einer leichten Zunahme.

Tabelle 66: GSH-GSSG-Ratios nach dem Geschlecht

Testverfahren	Variabel	p-Wert
Innersubjekteffekt	Zeit	0,114
	Zeit * Interventionsgruppe	0,717
	Zeit*Geschlecht	0,265
	Zeit*Interventionsgruppe*Geschlecht	0,806
Zwischensubjekteffekt	Interventionsgruppe	0,552
	Geschlecht	0,327
	Interventionsgruppe*Geschlecht	0,224

Es konnte kein statistisch signifikanter Interaktionseffekt (mixed ANCOVA) zwischen Zeit, Geschlecht und Interventionsgruppen nachgewiesen werden. Ebenso wurden bei der Analyse der einzelnen Haupteffekte keine signifikanten Ergebnisse festgestellt. Auf weitere Analysen der einzelnen Parameter sowie von GSH und GSSG wurde daher verzichtet.

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die Auswirkungen einer erhöhten Proteinzufuhr über die Nahrung und einer Bewegungsintervention in Form von Krafttraining auf das antioxidative Potenzial älterer Personen zu untersuchen. Mittels photometrischer Bestimmung wurden die antioxidativen Parameter FRAP, GSH und GSSG sowie die Gesamtthiole in $\mu\text{mol/l}$ und der GSH-GSSG-Ratio bestimmt.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse von Studien der letzten Jahre, bei denen eine erhöhte Proteinzufuhr und/oder Krafttraining in Bezug auf das antioxidative Potenzial untersucht wurden, zeigen sich Divergenzen. In einer 2019 von Nabuco et al. (2019) durchgeführten Untersuchung wurden ältere Frauen zusätzlich zu einer 12-wöchigen Proteinsupplementation mit Molkenprotein angewiesen, ein angeleitetes Krafttraining zu absolvieren. Es ließ sich jedoch keine signifikante Verbesserung des antioxidativen Potenzials durch die erhöhte Proteinzufuhr, sondern lediglich durch das Krafttraining beobachten. Jedoch fand die Supplementation mit dem Molkenprotein nur an den Tagen des Krafttrainings (3-mal pro Woche) statt und es wurden 35 g Protein vor und 35 g nach dem Training aufgenommen (Nabuco et al., 2019).

Diese Ergebnisse lassen sich mit denen einer Studie aus dem Jahr 2015 stützen, in der ebenfalls die Veränderungen antioxidativer Biomarker im Plasma älterer Frauen nach einem zwölfwöchigen Krafttraining untersucht wurden. Über den Studienzeitraum wurde zwei- bis dreimal pro Woche ein angeleitetes Krafttraining durchgeführt. Interessanterweise ließ sich unabhängig von der Trainingsfrequenz eine signifikante Verbesserung des antioxidativen Potenzials durch eine Erhöhung der antioxidativen Biomarker beobachten (Padilha et al., 2015).

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch lediglich ein signifikanter Effekt auf das antioxidative Potenzial der Proband:innen mit einer erhöhten Proteinzufuhr ermittelt werden. Das Krafttraining zeigte hingegen keinen signifikanten Effekt auf die FRAP-Konzentration der Frauen.

5.1 FRAP – Frauen

Im Verlauf der Intervention ließ sich die stärkste Veränderung der antioxidativen Gesamtkapazität in der PH-Gruppe beobachten. Die erhöhte Proteinzufuhr von 2 g pro kg Körpergewicht pro Tag führte zu einer signifikanten Abnahme der FRAP-Konzentration zwischen den Messzeitpunkten T0 und T1. Eine erhöhte Aufnahme der Aminosäure Arginin, die eine Vorstufe des Radikals NO ist, kann in einer verstärkten Bildung von Peroxynitrit und damit in einer gesteigerten Synthese von Nitrosin resultieren. Diese Erhöhung der Stickstoffmonoxid-Level ließ sich in einer Studie beobachten, in deren Rahmen Diabetiker eine erhöhte Proteinzufuhr bekamen (Pivovarova-Ramich et al., 2020).

Des Weiteren könnte die erhöhte Proteinaufnahme die nahrungsinduzierte Thermogenese verstärken, was auch die Abnahme der FRAP-Werte erklären würde. Denn Protein hat einen spezifischen dynamischen Effekt von 18 bis 25 % und hält doppelt so lange an wie die anderen Makronährstoffe. Ein beträchtlicher Teil der aufgenommenen Energie wird in Form von Wärme freigesetzt. Für die Bildung von Peptidbindungen während der Proteinbiosynthese, des Harnstoffmetabolismus und der Gluconeogenese wird ein erhöhter Bedarf an ATP benötigt (Elmadfa & Leitzmann, 2023). Eine erhöhte Aufnahme von Nahrungsprotein steigerte außerdem bei Ratten die Bildung von ROS sowie RNS und verminderte gleichzeitig die antioxidative Kapazität der Tiere (Kołodziej et al., 2017).

Dagegen hatte die Einführung der Trainingsintervention zum Zeitpunkt T1 im Vergleich zu den oben genannten Studien einen geringen Effekt auf die FRAP-Konzentration der Proband:innen. Während körperliche Aktivität die Bildung von ROS über die Aktivierung der Elektronentransportkette, die Laktatbildung und die Freisetzung von Katecholaminen sowie Entzündungsfaktoren erhöhen kann, kann gleichzeitig anaerobes Training die Produktion der Enzyme Xanthinoxidase und NADPH-Oxidase steigern und somit die Bildung von oxidativem Stress über eine Stärkung des körpereigenen antioxidativen Systems modulieren (Padilha et al., 2015).

Allerdings zeigen Ergebnisse einer Studie aus dem Jahr 2013, dass bereits eine geringe körperliche Aktivität (90 min pro Woche) in Kombination mit einer Vitamin-E-Supplementierung bei postmenopausalen Frauen zu signifikant niedrigeren Serumkonzentrationen reaktiver Sauerstoff Metabolite und zu höheren

Serumkonzentrationen des biologischen antioxidativen Potenzials führen kann (Takahashi et al., 2013).

Ein zwölfwöchiges Widerstandstraining führte zu einer signifikanten Reduktion der Proteinoxidation. Der Serum-Malondialdehyd-Spiegel, welcher ein Marker für oxidativen Stress ist, sank sowohl bei jungen als auch bei älteren Frauen. Im Vergleich zu den inaktiven Teilnehmer:innen wiesen die Trainingsgruppen niedrigere Werte des oxidativen Stressmarkers auf. Der natürliche Alterungsprozess führt zu einer Abnahme der Kapazität des antioxidativen Systems. Training kann jedoch die Produktion von ROS und Entzündungsmarkern wie TNF- α reduzieren und die Genexpression antioxidativer Enzyme fördern. Ähnliche positive Trainingsanpassungen wurden bei jungen und älteren Frauen beobachtet. Die Resultate dieser Studien legen nahe, dass Widerstandstraining die antioxidative Kapazität des Organismus in allen Altersgruppen verbessert. Nach zwölfwöchigem Krafttraining kam es zu einem signifikanten Anstieg der totalen antioxidativen Kapazität, Malondialdehyd- und NF- κ B-Konzentrationen und zu einer signifikanten Abnahme der Proteinoxidation. In der Studie wurde festgestellt, dass Krafttraining nicht nur das antioxidative System effektiv beeinflusst, sondern auch die Lipidoxidation reduzieren kann (Alikhani & Sheikholeslami-Vatani, 2019).

Es ist anzumerken, dass diverse Studien unterschiedliche Auswirkungen von Trainingsprogrammen auf den oxidativen Stress aufzeigen, insbesondere in Kombination mit einer Proteinsupplementation. Während in einigen Studien ein Anstieg festgestellt wurde, ließen sich keine signifikanten Veränderungen der Aktivität antioxidativer Enzyme und oxidativer Stressmarker durch eine Molkenproteinsupplementierung bei älteren Frauen beobachten (Nabuco et al., 2019). Mögliche Gründe für diese Unterschiede können in der Art und Intensität des Trainings sowie in den Eigenschaften der Probanden gesehen werden.

Zum Zeitpunkt T0 ließen sich positive Korrelationen zwischen BMI, Gesamtkörperfett und FRAP-Konzentration erkennen. Es bestand ein leicht signifikanter Zusammenhang zwischen der FRAP-Konzentration und der Proteinzufuhr zum Zeitpunkt T1. Jedoch war dieser Effekt lediglich in der K-Gruppe zu beobachten.

5.2 GSH/GSSG/GSH-GSSG-Ratio – Frauen

Die Auswertung zeigte, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede in den GSH- und GSSG-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] sowie des GSH-GSSG-Ratio zwischen den Gruppen gab. Weder eine erhöhte Proteinzufuhr noch ein regelmäßiges Krafttraining beeinflussten das Redoxgleichgewicht von GSH und GSSG bei den Teilnehmerinnen.

In der K- und PL-Gruppe sanken die GSH-Konzentrationen zwischen T0 und T1, stiegen aber wieder zwischen T1 und T2. Die PL-Gruppe zeigte die größten Schwankungen (-10% und $+6\%$). Im Vergleich dazu kam es zu einer kontinuierlichen, jedoch nicht signifikanten Abnahme der GSH-Konzentration in der PH-Gruppe über den gesamten Interventionszeitraum. Auch bei der Analyse der GSSG-Konzentrationen fiel auf, dass die stärksten Schwankungen in der PL-Gruppe auftraten. Generell kam es in allen Gruppen zu einer Konzentrationsabnahme zwischen T0 und T1 sowie zu einer Zunahme zwischen T1 und T2. Die GSSG-Konzentration war zum Zeitpunkt T2 in der K- und in der PL-Gruppe höher als zum Messzeitpunkt T0. Nur die PH-Gruppe zeigte eine Abnahme der GSSG-Konzentration zwischen den Messzeitpunkten T0 und T2. Auch die GSH-GSSG-Ratio-Analyse verdeutlichte bei der PL-Gruppe die stärksten Schwankungen mit einer kontinuierlichen Abnahme zwischen T0 und T2. Währenddessen gab es in den anderen beiden Gruppen einen leichten Anstieg zwischen T0 und T1, gefolgt von einer Rückkehr zum Ausgangsniveau von T0 zu T2. Zusammenfassend ließ sich kein signifikanter Effekt auf die GSH- und die GSSG-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] sowie auf den GSH-GSSG-Ratio feststellen.

Untersuchungen des menschlichen Plasmas zeigen, dass der Gehalt an GSH mit dem Alter korreliert und kontinuierlich abnimmt, während der Gehalt an GSSG steigt. Das bedeutet, dass das Verhältnis von GSH zu GSSG kleiner wird, je älter eine Person wird. Bemerkenswert ist, dass dieses Verhältnis jedoch bis zum etwa fünfundvierzigsten Lebensjahr stabil bleibt; erst danach lässt sich eine lineare Abnahme beobachten. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass der GSH-Stoffwechsel ab dem späten mittleren Lebensalter nicht mehr in der Lage ist, mit der zunehmenden oxidativen Belastung Schritt zu halten (Jones et al., 2002).

Rowiński et al. untersuchten die Aktivität endogener antioxidativer Enzyme wie der SOD, CAT und GPx bei älteren Personen zwischen 65 und 69 Jahren sowie bei solchen über 90 Jahre, die unterschiedlich körperlich aktiv waren. Die Ergebnisse zeigten, dass Männer im Vergleich zu Frauen ausgeprägtere adaptive Veränderungen im antioxidativen Enzymsystem aufwiesen.

Bei den Frauen, egal ob aktiv oder inaktiv, konnten keine signifikanten Unterschiede in der Enzymaktivität der GPx festgestellt werden. Jedoch ließ sich bei aktiven Frauen im Vergleich zu inaktiven eine Reduktion von oxidativem Stress und oxidativer Proteinschädigung beobachten. Außerdem war die Lipidperoxidation bei jüngeren aktiven Frauen höher als bei älteren mit hoher Aktivität (Rowiński et al., 2013).

Allerdings wurde in einer Studie von Karolkiewicz et al. aus dem Jahr 2009 gezeigt, dass ein 8-wöchiges Aerobic-Training bei gesunden, übergewichtigen postmenopausalen Frauen im Alter von 65 Jahren einen signifikanten Anstieg der GSH-Konzentration und eine Verbesserung der antioxidativen Kapazitäten bewirkte. Das Studienteam führt beide Effekte auf eine höhere Insulinsensitivität zurück (Karolkiewicz et al., 2009).

Bei der Interpretation der vorliegenden Studienergebnisse ist zu beachten, dass die GSH-Konzentration auch mit der Konzentration von Östrogen korreliert, da eine verminderte Östrogenproduktion mit einer erhöhten Peroxidbildung in systemischen Geweben einhergeht (Viña et al., 2005). Östrogen spielt eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung des GSH-Spiegels, wie in der Studie von Sheng-Huang et al. festgestellt wurde, in der die Auswirkungen der Östrogenkonzentration auf die GSH-Konzentration während des weiblichen Zyklus untersucht wurden. Die Arbeit zeigte, dass eine hohe Östrogenkonzentration stark positiv mit der GSH-Konzentration in den Erythrozyten der Proband:innen korrelierte (Sheng-Huang et al., 2015).

In der vorliegenden Analyse geht es jedoch ausschließlich um postmenopausale Proband:innen und ein Zusammenhang zwischen der GSH- oder GSSG-Konzentration und dem Östrogenspiegel wurde nicht untersucht. Darüber hinaus wurde in keiner der genannten Studien eine Ernährungs- und Bewegungsintervention kombiniert.

5.3 FRAP – Männer und Frauen

Die Analyse aller Daten zeigte signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede der FRAP-Konzentrationen zwischen den Interventionsgruppen, mit den größten Veränderungen in der PH-Gruppe. Nach Geschlecht getrennt wiesen die Männer in allen Gruppen eine höhere FRAP-Konzentration auf – mit bis zu 12 bis 14 % in der PH-Gruppe. Dies kann mit dem postmenopausalen Rückgang des Östrogenspiegels erklärt werden, wie bereits oben angeführt.

In der PH-Gruppe resultierte die Proteinzufuhr von 2 g pro kg Körpergewicht und Tag in einem signifikanten Abfall der FRAP-Konzentrationen zwischen T0 und T1. Dies lässt vermuten, dass eine erhöhte Proteinaufnahme die antioxidative Kapazität durch gesteigerten Stoffwechsel und Oxidation zusätzlicher Proteine beeinträchtigen könnte. Zwar ließ sich zwischen T1 und T2 ebenfalls ein signifikanter Abfall der FRAP-Konzentrationen beobachten, jedoch war dieser mit der Einführung der Bewegungsintervention zwischen T1 und T2 weniger ausgeprägt.

In einer Studie von Shahar et al. (2013) wurde ebenfalls der Einfluss einer 12-wöchigen Intervention in Form von körperlicher Aktivität und Proteinsupplementierung (1,5 g pro kg Körpergewicht pro Tag) in Form eines pflanzlichen Proteinpulvers bei älteren Menschen mit Sarkopenie untersucht. Es ergaben sich signifikante Auswirkungen auf oxidative Stressmarker. Eine Abnahme der Carbonylproteine – ein oxidativer Stressmarker – ließ sich in der Kontrollgruppe und in der Exercise+Protein-Gruppe (ExP) beobachten, während die SOD-Werte in der Protein- und in der ExP zunahmen, in der Ex-Gruppe jedoch sanken. Die ExP zeigte zusätzlich einen Anstieg der Lipidhydroperoxid-Spiegel.

Die Ergebnisse der Studie legen damit ebenfalls nahe, dass körperliche Betätigung und Proteinzufuhr gemeinsam positive Auswirkungen auf oxidativen Stress haben könnten. Die Proteinzufuhr könnte die antioxidative Abwehr fördern, während körperliche Aktivität allein möglicherweise die SOD-Spiegel verringert. Die Kombination beider Faktoren könnte jedoch potenziell negative Auswirkungen auf den Lipidoxidationsstatus haben (Shahar et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit ließ sich hingegen lediglich ein signifikanter Effekt auf das antioxidative Potenzial älterer Personen aufgrund der erhöhten Proteinaufnahme beobachten, jedoch wurde das Krafttraining auch nur über einen Zeitraum von 8 Wochen durchgeführt. In der Studie von Shahar et al. (2013) gab es im Vergleich zu der vorliegenden Untersuchung jedoch neben der Kontrollgruppe außerdem eine Gruppe, die nur Teil der Bewegungsintervention war.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von körperlicher Aktivität und Proteinsupplementierung auf verschiedene antioxidative Enzyme und Oxidationsmarker untersucht. Es wurde festgestellt, dass Bewegung einen positiven Effekt auf die Unterdrückung freier Radikale hat, da bei den Proband:innen, die sich nur bewegt haben, keine Veränderungen der SOD festgestellt wurde, während bei den Teilnehmenden, die zusätzlich Proteinsupplemente erhielten, eine Erhöhung der antioxidativen Enzyme beobachtet wurde. Es wurden jedoch keine signifikanten Veränderungen der Marker für Lipid-

und Proteinoxidation gefunden. Daher scheint die sportliche Betätigung die antioxidativen Enzyme zu erhöhen, hat jedoch keinen Einfluss auf die Oxidationswerte. Die Proteinsupplementierung hingegen erhöht die antioxidativen Enzyme, hat jedoch keine Auswirkungen auf die Oxidationsmarker. Es wurden auch keine Effekte auf Hormone und Entzündungsmarker festgestellt.

5.4 GSH/GSSG/GSH-GSSG-Ratio – Männer und Frauen

Bei der Untersuchung des GSH-GSSG-Ratio nach Geschlechtern konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Diese Ergebnisse wurden durch die Analyse bestätigt, bei der sich keine signifikante Wirkung des Geschlechts als Variable zeigte. Es gab keine signifikanten Interaktionen oder Haupteffekte bei der Betrachtung aller Teilnehmer.

Interessanterweise zeigte die gesamte Stichprobe einen kontinuierlichen Rückgang des GSH-GSSG-Verhältnisses. Jedoch stieg bei den männlichen Probanden in der Protein-High-Gruppe nach der Interventionsphase, in der wöchentliches Krafttraining durchgeführt wurde, das Verhältnis wieder an. Daraus lässt sich folgern, dass das Krafttraining möglicherweise einen positiven Einfluss auf das antioxidative System der Männer hatte.

Ferner zeigte die bivariate Korrelation nur bei den Männern einen negativen Zusammenhang zwischen Alter und GSH-GSSG-Ratio, während dieser bei den Frauen nicht vorhanden war. Dies lässt vermuten, dass das Alter bei Männern einen stärkeren Einfluss auf ihr antioxidatives System hat als bei Frauen. Es wäre interessant, zu analysieren, welche Faktoren diesen geschlechtsspezifischen Unterschied bewirken. Auch könnte er bedeuten, dass Männer im höheren Alter anfälliger für oxidative Schäden sind als Frauen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um diese Hypothese zu bestätigen und die genauen Mechanismen zu verstehen.

5.5 Thiole in der PH-Gruppe – Männer und Frauen

Zwischen T0 und T1 kam es zu einer Abnahme der reduzierten Thiole bei den Männern und Frauen der PH-Gruppe, in der weiteren Analyse ließ sich jedoch kein signifikanter Interaktionseffekt durch die erhöhte Proteinzufuhr von 2 g pro kg Körpergewicht pro Tag beobachten. Zwischen T1 und T2 stiegen die Konzentrationen der reduzierten Thiole bei den Männern und Frauen wieder leicht an, wobei der Effekt bei den Frauen schwächer ausfiel, wie schon bei der Analyse von FRAP aufgefallen war.

Es ist anzunehmen, dass der oxidative Stress zwischen T0 und T1 zunächst zugenommen hat, sich jedoch nach Einführung des Krafttrainings wieder normalisiert hat. Thiole, die eine bedeutende Rolle bei der antioxidativen Abwehr spielen, können durch Proteinzufuhr moduliert werden. Proteine sind reich an schwefelhaltigen Aminosäuren wie Cystein, die die Vorläufer von Thiolen wie GSH sind. Eine erhöhte Proteinzufuhr kann somit die Verfügbarkeit von Cystein erhöhen und die Synthese von GSH, einem relevanten Antioxidans, fördern (Robert Koch-Institut, 2008). Studienergebnisse zeigen zudem, dass serumfreie Thiole mit einem verringerten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse und niedrigerer Gesamtmortalität einhergehen (Abdulle et al., 2020).

Eine Studie an älteren Männern und Frauen (durchschnittlich 77 Jahre) zeigte, dass eine hauptsächlich pflanzlich basierte, proteinreiche Diät in Kombination mit einem Krafttraining zu einer signifikanten Erhöhung des Gesamt-GSH führte, während sich das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem GSH verringerte, wie auch in der vorliegenden Masterarbeit (Smeuninx et al., 2020). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass die kombinierte Anwendung von erhöhter Proteinzufuhr und Krafttraining einen synergistischen Effekt auf den Thiolstatus bei älteren Personen haben kann.

Lebensstilveränderungen wie eine erhöhte Proteinaufnahme können demnach einen Einfluss auf den Thiolstatus und damit auf den allgemeinen Gesundheitszustand einer Person haben. Darüber hinaus spielen Thiole eine bedeutende Rolle in der Neutralisation von freien Radikalen. Sie reduzieren somit oxidativen Stress und unterstützen den Entgiftungsprozess toxischer Metalle.

Limitationen und Verbesserungsvorschläge

Eine Einschränkung der vorliegenden Masterarbeit besteht darin, dass nur die Proben der Probanden der Protein High Group beider Geschlechter für die Analyse der Gesamtthiole verwendet wurden. Im Gegensatz zu den FRAP- und GSH/GSSG-Messungen, bei denen zuvor an einer bekannten Probe geübt wurde, wurden für die Gesamtthiol-Analyse direkt die Proben der Probanden verwendet, bevor eine ausreichende Vertrautheit mit dem Kit und der Methode erlangt wurde.

Eine andere Master-Studentin, die zur gleichen Zeit die gleichen Analysen im Rahmen der Vitamin-D-Studie durchführte, hatte die Messungen der Gesamtthiole zuvor an einer bekannten Probe geübt und das Verfahren in Bezug auf die Messeinstellungen und die zu verwendende Probenmenge angepasst. Des Weiteren konnte mit dem Kit lediglich der reduzierte Thiolgehalt nachgewiesen werden und nicht, wie erwartet, der Gesamtthiolgehalt. Dennoch stimmten die gemessenen Werte mit der vorgegebenen Standardreihe überein. Nichtsdestotrotz sollten die Ergebnisse der Gesamtthiol-Analyse mit Vorsicht interpretiert werden.

Schlussbetrachtung

Im Rahmen der NutriAging-Studie befasst sich diese Masterarbeit mit der Frage, inwiefern sich eine erhöhte Proteinzufuhr – sowohl allein als auch in Verbindung mit einem betreuten Krafttraining – auf die antioxidative Kapazität bei älteren Menschen auswirkt. Die Teilnehmer:innen wurden mittels eines Randomisierungsverfahrens in drei Gruppen eingeteilt, basierend auf Geschlecht und Alter. Während der Intervention wurde die gesteigerte Eiweißzufuhr ausschließlich durch den Verzehr herkömmlicher Lebensmittel erreicht.

Für eine umfassende Bewertung der antioxidativen Kapazität wurden mehrere Methoden angewandt. Zunächst wurde der FRAP-Test durchgeführt, welcher die eisenreduzierende Kapazität aller antioxidativen Verbindungen im Plasma bestimmt. Diese Methode erlaubt eine quantitative Messung der gesamten antioxidativen Kapazität.

Zusätzlich wurde der Gehalt an reduziertem Glutathion (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSG) bestimmt. Glutathion stellt eine zentrale Komponente des antioxidativen Abwehrsystems des Körpers dar und fungiert als wesentlicher Regulator für die Redox-Homöostase. Zur genaueren Bestimmung der antioxidativen Kapazität wurde das Verhältnis von GSH zu GSSG berechnet. Ein hohes Ratio GSH/GSSG weist auf eine erhöhte antioxidative Kapazität des Organismus hin.

Darüber hinaus wurde auch der Gesamtgehalt an reduzierten Thiole in der PH-Gruppe gemessen. Mit dem FLOUstar Optima wurden die photometrische Messungen durchgeführt. Die angewandten Methoden ermöglichten es, den Einfluss einer gesteigerten Proteinzufuhr in Kombination mit regelmäßigem, die Intensität steigerndem Krafttraining auf das antioxidative Potenzial bei älteren Menschen zu untersuchen.

Die Analysen zeigten, dass eine erhöhte Proteinzufuhr in der PH-Gruppe bei Frauen zu einer signifikanten Reduktion der FRAP-Konzentration führt. Ähnliche Ergebnisse wurden bei beiden Geschlechtern beobachtet. Das zusätzliche Krafttraining führte zu einer nicht signifikanten Abnahme der FRAP-Konzentration. In Bezug auf GSH, GSSG und den GSH/GSSG-Quotienten wurden durch die Ernährungs- und Bewegungsinterventionen keine signifikanten Veränderungen festgestellt. Das GSH-GSSG-Verhältnis korrelierte geschlechtsspezifisch, wobei nur Männer mit zunehmendem Alter einen niedrigeren antioxidativen

Redoxpaarquotienten aufwiesen. Die Messung der reduzierten Thiole ergab keine signifikanten Ergebnisse bei geschlechtsspezifischer Betrachtung nach den modifizierten Ernährungs- und Bewegungsinterventionen in der PH-Gruppe.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine erhöhte Proteinzufuhr das antioxidative Potenzial beeinflussen kann. Allerdings lässt sich dies durch körperliche Aktivität, wie die FRAP-Werte in der PH-Gruppe nahelegen, kompensieren. Diese Erkenntnisse ergänzen die Ergebnisse von Ricarda Baron, welche sich auf die männlichen Teilnehmer der gleichen Studie konzentriert und somit eine ganzheitliche Perspektive auf die Auswirkungen von Ernährung und Bewegung im Alter bietet. Um ein besseres Verständnis für die Auswirkungen von oxidativem Stress im Alter und die belastungsinduzierte Produktion von freien Radikalen zu erlangen, bedarf es weiterer Untersuchungen. Insbesondere in Bezug auf die erhöhte Proteinzufuhr bei Personen über 65 Jahren in Kombination mit körperlicher Aktivität sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der postmenopausalen Veränderungen der GSH-Werte sollten durchgeführt werden, da Östrogen mit der Glutathion Konzentration im Plasma korreliert. Es wurde in der vorliegenden Studie nicht differenziert, ob die Probanden hauptsächlich tierische oder pflanzliche Proteine konsumierten. Dies wäre für weitere Forschungsfragen von erheblicher Relevanz aufgrund unterschiedlicher Aminosäuremuster.

Abstract

Aim: To study the effects of increased protein intake combined with an exercise intervention on antioxidant potential (FRAP, GSH, GSSG and thiols) in seniors aged 65-85 years.

Background: Ageing is the result of biochemical processes that occur throughout life and lead to physical senescence. The free radical theory states that the increase in free radicals with age causes oxidative stress, which is a significant factor in the ageing process. It is evident that adequate protein intake is essential for older adults, as proteins play a key role in maintaining muscle mass, strength and functionality. The DACH-Reference values recommend a protein intake of 1.0 g/kg body weight per day for people 65 years of age and older. A protein-rich diet can support the body's antioxidant defences, reduce oxidative stress and thus promote health and longevity.

The study comprised two phases. In the first phase, 119 healthy, independently living seniors were randomly assigned to three groups: a control group, a group with a protein intake of 1 g/kg/day according to the DACH recommendations for people over 65 years of age and a group with a high protein intake of 2 g/kg/day. The initial phase of the study spanned six weeks and involved an increase in protein intake, which was set at 1 g/kg/day or 2 g/kg/day, depending on group participation. In the subsequent phase, participants with a protein intake of 1 g/kg/day or 2 g/kg/day underwent guided strength training twice a week for eight weeks in addition to the nutritional intervention. The medical, anthropometric and functional parameters of the participants were recorded at three timepoints. These were the baseline (T0), after the nutritional intervention (T1) and after completion of the additional training (T2). Plasma samples were analyzed photometrically (FRAP GSH, GSSG, thiol determination).

Results: In women, a notable decline in FRAP concentrations ($\mu\text{mol/L}$) was observed, which was more pronounced in the group with a daily protein intake of 2 g/kg body weight compared to baseline ($p = 0.002$). Conversely, supplementary strength training had no discernible impact on the FRAP concentrations [$\mu\text{mol/L}$]. A significant correlation was found between FRAP concentration and BMI (kg/m^2) ($r = 0.355$, $p = 0.004$) and fat mass (kg) ($r = 0.346$, $p = 0.006$) in women. The results demonstrated that males had higher FRAP levels compared to females, particularly within the cohort which consumed 2 g of protein per kg of body weight, with a mean difference of 12-14%. However, the findings revealed that strength training did not significantly impact FRAP concentrations. Furthermore, the investigations into the GSH and

GSSG concentrations [$\mu\text{mol/l}$] or the GSH-GSSG ratio revealed that neither diet nor exercise had an impact. The GSH-GSSG ratio in women was slightly higher than in men. The analysis of thiols in the group with a protein intake of 2 g/kg/kg/day also did not provide any significant gender-specific differences.

Conclusion: It can be demonstrated that increased protein intake has the potential to significantly impair the antioxidant balance. However, it is possible to offset this effect by engaging in physical activity. Further research is required to gain a deeper understanding of the exact effects of increased protein intake linked to oxidative stress in combination with physical activity in the elderly.

Zusammenfassung

Ziel: Die Auswirkungen einer erhöhten Proteinaufnahme in Kombination mit einer Bewegungsintervention auf das antioxidative Potenzial (FRAP, GSH, GSSG und Thiole) von Senior:innen im Alter von 65 bis 85 Jahren zu untersuchen.

Hintergrund: Altern ist das Resultat biochemischer Prozesse, die im Laufe des Lebens auftreten und zur körperlichen Seneszenz führen. Die Theorie der freien Radikale besagt, dass die Zunahme freier Radikale im Alter oxidativen Stress verursacht, welcher einen bedeutenden Faktor im Alterungsprozess darstellt. Für ältere Menschen ist eine adäquate Proteinzufuhr von essenzieller Bedeutung, da Proteine eine wesentliche Rolle beim Erhalt von Muskelmasse, Kraft und Funktionalität spielen. Die DACH-Referenzwerte empfehlen älteren Menschen ab 65 Jahren eine Proteinzufuhr von 1,0 g/kg Körpergewicht pro Tag. Eine proteinreiche Ernährung kann die antioxidativen Abwehrkräfte des Körpers unterstützen, oxidativen Stress reduzieren und somit die Gesundheit sowie Langlebigkeit fördern.

Methode: 119 gesunde, selbstständig lebende Senior:innen wurden zufällig drei Gruppen zugeteilt: eine Kontrollgruppe, eine Gruppe mit einer Proteinaufnahme von 1 g/kg/Tag entsprechend den DACH-Empfehlungen für Personen über 65 Jahre und eine Gruppe mit einer hohen Proteinaufnahme von 2 g/kg/Tag. Die Studie umfasste zwei Phasen. Die erste Phase erstreckte sich über einen Zeitraum von sechs Wochen und beinhaltete eine Erhöhung der Proteinaufnahme, die je nach Gruppenzugehörigkeit auf 1 g/kg/KG/d oder 2 g/kg/KG/d festgelegt wurde. In der zweiten Phase absolvierten die Teilnehmer:innen, die den Gruppen mit einer Proteinaufnahme von 1 g/kg/KG/Tag bzw. 2 g/kg/KG/Tag zugeteilt waren, zusätzlich zu der ernährungsphysiologischen Intervention zweimal wöchentlich für die Dauer von acht Wochen ein angeleitetes Krafttraining. Medizinische, anthropometrische und funktionelle Parameter der Teilnehmer:innen wurden zu drei Zeitpunkten erhoben: Baseline (T0), nach der ernährungsphysiologischen Intervention (T1) und nach Abschluss des zusätzlichen Trainings (T2). Die Plasmaproben photometrisch ausgewertet (FRAP GSH, GSSG, Thiolbestimmung).

Ergebnisse: Bei Frauen wurde eine signifikante Abnahme der FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] beobachtet, die sich in der Gruppe mit einer täglichen Proteinzufuhr von 2 g/kg Körpergewicht im Vergleich zur Baseline ($p = 0,002$) manifestierte. Ein zusätzliches Krafttraining hatte hingegen keinen signifikanten Einfluss auf die FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$]. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der FRAP-Konzentration und dem BMI (kg/m^2) ($r = 0,355$, p

= 0,004) sowie der Fettmasse (kg) ($r = 0,346$, $p = 0,006$) bei Frauen festgestellt werden. Männer wiesen im Vergleich zu Frauen in der Regel höhere FRAP-Konzentrationen auf, insbesondere in der Gruppe mit einer täglichen Proteinzufuhr von 2 g/kg Körpergewicht, wobei ein Unterschied von 12 bis 14 % zu beobachten war. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass Krafttraining keinen signifikanten Einfluss auf die FRAP-Konzentrationen hatte.

Die Analysen der GSH- und GSSG-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] oder des GSH-GSSG-Verhältnisses lieferten keine signifikanten Ergebnisse durch die Ernährungs- und Bewegungsintervention. Der GSH-GSSG-Ratio bei Frauen war etwas höher als bei Männern. Auch die Analyse der Thiole in der Gruppe mit einer Proteinaufnahme von 2 g/kg/KG/Tag lieferte keine signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschiede.

Schlussfolgerung: Eine erhöhte Proteinaufnahme kann das antioxidative Gleichgewicht signifikant beeinträchtigen, dieser Effekt kann jedoch durch körperliche Aktivität wieder ausgeglichen werden.

Weitere Forschungsarbeiten sind erforderlich, um die genauen Auswirkungen einer erhöhten Proteinzufuhr auf oxidativen Stress, in Kombination mit körperlicher Aktivität, bei älteren Erwachsenen besser zu verstehen.

Literaturverzeichnis

- Abdulle, A. E., Bourgonje, A. R., Kieneker, L. M., Koning, A. M., La Bastide-Van Gemert, S., Bulthuis, M. L. C., Dijkstra, G., Faber, K. N., Dullaart, R. P. F., Bakker, S. J. L., Gans, R. O. B., Gansevoort, R. T., Mulder, D. J., Pasch, A., & Van Goor, H. (2020). Serum free thiols predict cardiovascular events and all-cause mortality in the general population: A prospective cohort study. *BMC Medicine*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01587-w>
- Alikhani, S., & Sheikholeslami-Vatani, D. (2019). Oxidative stress and anti-oxidant responses to regular resistance training in young and older adult women. *Geriatrics and Gerontology International*, 19(5), 419–422. <https://doi.org/10.1111/ggi.13636>
- Anderson, M. E. (1998). Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. In *Chemico-Biological Interactions* (Vol. 111).
- Baron, R. (2021). Einfluss einer Protein- und Bewegungsintervention auf das antioxidative Potenzial von älteren Personen. (unveröffentlichte Masterarbeit, Ernährungswissenschaften). Universität Wien, Wien.
- Barzilai, N., Huffman, D. M., Muzumdar, R. H., & Bartke, A. (2012). The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes* (Vol. 61, Issue 6, pp. 1315–1322). <https://doi.org/10.2337/db11-1300>
- Bauer, J. M. (2011). Ernährung im Alter: Grundlage für den Erhalt von Funktionalität und Lebensqualität. *Internist*, 52(8), 946–954. <https://doi.org/10.1007/s00108-011-2806-7>
- Bauer, J. M., Haack, A., Winning, K., Wirth, R., Fischer, B., Uter, W., Erdmann, J., Schusdziarra, V., & Sieber, C. C. (2010). Impaired postprandial response of active ghrelin and prolonged suppression of hunger sensation in the elderly. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, 65 A(3), 307–311. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp174>
- Bauer, J. M., Wirth, R., Volkert, D., Werner, H., & Sieber, C. C. (2008). Malnutrition, sarkopenie und kachexie im alter - Von der pathophysiologie zur therapie - Ergebnisse

- eines internationalen expertenmeetings der BANSS-Stiftung. In *Deutsche Medizinische Wochenschrift* (Vol. 133, Issue 7, pp. 305–310). <https://doi.org/10.1055/s-2008-1046711>
- Behl, C., & Ziegler, C. (2016). Molekulare Mechanismen der Zellalterung und ihre Bedeutung für Alterserkrankungen des Menschen. *Springer Berlin Heidelberg*.
<https://doi.org/10.1007/978-3-662-48250-6>
- Benzie, I. F. & Strain, S. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.
<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Berrazaga, I., Micard, V., Gueugneau, M. & Walrand, S. (2019). The role of the anabolic properties of plant- versus animal-based protein sources in supporting muscle mass maintenance: A critical review. *Nutrients*, 11(8), 1825.
<https://doi.org/10.3390/nu11081825>
- Brandt, U. (2014). Oxidoreduktasen und oxidativer Stress. In: Heinrich, P., Müller, M., Graeve, L. (eds) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. *Springer-Lehrbuch*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-17972-3_20
- Burd, N. A., Gorissen, S. H. & Van Loon, L. J. C. (2013). Anabolic resistance of muscle protein synthesis with aging. *Exercise And Sport Sciences Reviews*, 41(3), 169–173.
<https://doi.org/10.1097/jes.0b013e318292f3d5>
- Cohn, V. H., & Lyle, J. (1966). A fluorometric assay for glutathione. *Analytical Biochemistry*, 14(3), 434–440. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90286-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90286-7)
- DACH, (2017). Deutsche Gesellschaft für Ernährung, Österreichische Gesellschaft für Ernährung, Schweizerische Gesellschaft für Ernährung (eds). *Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. 2nd ed, revised*. Bonn: 2017.
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C. D., Medrano, E. E., Linskens, M. H., Rubelj, I. & Pereira-Smith, O. M. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363–9367.
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.20.9363>

- Dionisio, K. L., Phillips, K., Price, P. S., Grulke, C. M., Williams, A., Biryol, D., Hong, T., & Isaacs, K. K. (2018). Data Descriptor: The Chemical and Products Database, a resource for exposure-relevant data on chemicals in consumer products. *Scientific Data*, 5. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.125>
- Duan, Y., Li, F., Li, Y., Tang, Y., Kong, X., Feng, Z., Anthony, T. G., Watford, M., Hou, Y., Wu, G. & Yin, Y. (2016). The role of leucine and its metabolites in protein and energy metabolism. *Amino Acids*, 48(1), 41–51. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2067-1>
- Elmadfa, I. & Leitzmann, C. (2023). *Ernährung des Menschen* (7. Aufl.). Eugen-Ulmer-Verlag.
- Field, A. (2017). *Discovering statistics using IBM SPSS statistics* (5th edition). SAGE Publications.
- Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010). Extending healthy life span-from yeast to humans. *In Science* (Vol. 328, Issue 5976, pp. 321–326). <https://doi.org/10.1126/science.1172539>
- Garinis, G. A., Van der Horst, G. T. J., Vijg, J. & Hoeijmakers, J. H. (2008). DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nature Cell Biology*, 10(11), 1241–1247. <https://doi.org/10.1038/ncb1108-1241>
- Goodpaster, B. H., Park, S. W., Harris, T. B., Kritchevsky, S. B., Nevitt, M., Schwartz, A. V, Simonsick, E. M., Tykavsky, F. A., Visser, M., & Newman, A. B. (2006). The Loss of Skeletal Muscle Strength, Mass, and Quality in Older Adults: *The Health, Aging and Body Composition Study*. <https://academic.oup.com/biomedgerontology/article/61/10/1059/600461>
- Gorissen, S. H. M. & Witard, O. C. (2018). Characterising the muscle anabolic potential of dairy, meat and plant-based protein sources in older adults. *Proceedings of the Nutrition Society*, 77(1), 20–31. <https://doi.org/10.1017/S002966511700194X>
- Gossau, A. & Rensing, L. (2002). Oxidativer Stress, altersabhängige Zellschädigungen und antioxidative Mechanismen. *Z Gerontol Geriat*, © Steinkopff Verlag, 35, 139–150. <https://doi.org/10.1007/s003910200018>

- Green, D. R., Galluzzi, L. & Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the autophagy–inflammation–cell death axis in organismal aging. *Science*, 333(6046), 1109–1112.
<https://doi.org/10.1126/science.1201940>
- Hekimi, S., Lapointe, J. & Yang, W. (2011). Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends in Cell Biology*, 21(10), 569–576.
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.06.008>
- Hissin, P. J. & Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74(1), 214–226.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2)
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/nejmra0804615>
- Jones, D. P., Mody, V., Carlson, J. L., Lynn, M. & Sternberg, P. (2002). Redox analysis of human plasma allows separation of pro-oxidant events of aging from decline in antioxidant defenses. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(9), 1290–1300.
[https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01040-7](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01040-7)
- Karolkiewicz, J., Michalak, E., Pospieszna, B., Deskur-Śmielecka, E., Nowak, A. & Pilaczyńska-Szcześniak, Ł. (2009). Response of oxidative stress markers and antioxidant parameters to an 8-week aerobic physical activity program in healthy, postmenopausal women. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 49(1).
<https://doi.org/10.1016/j.archger.2008.09.001>
- Khan, S. S., Singer, B. D., & Vaughan, D. E. (2017). Molecular and physiological manifestations and measurement of aging in humans. *Aging Cell (Vol. 16, Issue 4, pp. 624–633)*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/accel.12601>
- Kołodziej, U., Maciejczyk, M., Niklińska, W., Waszkiel, D., Żendzian-Piotrowska, M., Żukowski, P. & Zalewska, A. (2017). Chronic high-protein diet induces oxidative stress and alters the salivary gland function in rats. *Archives of Oral Biology*, 84, 6–12.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.09.006>
- Kortebein, P., Symons, T. B., Ferrando, A., Paddon-Jones, D., Ronsen, O., Protas, E., Conger, S., Lombeida, J., Wolfe, R., & Evans, W. J. (2008). *Functional Impact of 10 Days of Bed*

Rest in Healthy Older Adults.

<https://academic.oup.com/biomedgerontology/article/63/10/1076/559225>

Liu, Y., Shi, Y., Han, R., Liu, C., Qin, X., Li, P., & Gu, R. (2023). Signaling pathways of oxidative stress response: the potential therapeutic targets in gastric cancer. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media S.A.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1139589>

Loenneke, J. P., Loprinzi, P. D., Murphy, C. H. & Phillips, S. M. (2016). Per meal dose and frequency of protein consumption is associated with lean mass and muscle performance. *Clinical Nutrition*, 35(6), 1506–1511.

<https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.04.002>

López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>

Mccords, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase and enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry* (Vol. 244, Issue 22).

Moore, A. Z., Caturegli, G., Metter, E. J., Makrogiannis, S., Resnick, S. M., Harris, T. B., & Ferrucci, L. (2014). Difference in muscle quality over the adult life span and biological correlates in the baltimore longitudinal study of aging. *Journal of the American Geriatrics Society*, 62(2), 230–236. <https://doi.org/10.1111/jgs.12653>

Mostoslavsky, R., Chua, K. F., Lombard, D. B., Pang, W. W., Fischer, M. R., Gellon, L., Liu, P., Mostoslavsky, G., Franco, S., Murphy, M. M., Mills, K. D., Patel, P., Hsu, J. T., Hong, A. L., Ford, E., Cheng, H. L., Kennedy, C., Nunez, N., Bronson, R., ... Alt, F. W. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, 124(2), 315–329. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.044>

Murphy, C. H., Oikawa, S. Y. & Phillips, S. M. (2016). Dietary protein to maintain muscle mass in aging: A case for per-meal protein recommendations. *The Journal of frailty & aging*, 5(1), 49–58. <https://doi.org/10.14283/jfa.2016.80>

Nabuco, H. C. G., Tomeleri, C. M., Fernandes, R. R., Sugihara Junior, P., Venturini, D., Barbosa, D. S., Deminice, R., Sardinha, L. B. & Cyrino, E. S. (2019). Effects of pre- or post-exercise whey protein supplementation on oxidative stress and antioxidant enzymes in

- older women. *Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports*, 29(8), 1101–1108. <https://doi.org/10.1111/sms.13449>
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986–28006. <https://doi.org/10.1039/c4ra13315c>
- Padilha, C. S., Ribeiro, A. S., Fleck, S. J., Nascimento, M. A., Pina, F. L. C., Okino, A. M., Venturini, D., Barbosa, D. S., Mayhew, J. L. & Cyrino, E. S. (2015). Effect of resistance training with different frequencies and detraining on muscular strength and oxidative stress biomarkers in older women. *Age*, 37(5). <https://doi.org/10.1007/s11357-015-9841-6>
- Pérez, V. I., Bokov, A., Remmen, H. van, Mele, J., Ran, Q., Ikeno, Y. & Richardson, A. (2009). Is the oxidative stress theory of aging dead? *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(10), 1005–1014. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.06.003>
- Petruck, G., Giudice, R. del, Rigano, M. M. & Monti, D. M. (2018). Antioxidants from plants protect against skin photoaging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1454936>
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry (Vol. 30, Issue 1, pp. 11–26)*. Springer India. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>
- Pivovarova-Ramich, O., Markova, M., Weber, D., Sucher, S., Hornemann, S., Rudovich, N., Raila, J., Sunaga-Franze, D., Sauer, S., Rohn, S., Pfeiffer, A. F. H., & Grune, T. (2020). Effects of diets high in animal or plant protein on oxidative stress in individuals with type 2 diabetes: A randomized clinical trial: High protein diet and oxidative stress. *Redox Biology*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101397>
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D. & Bitto, A. (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W. & Balch, W. E. (2009). Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annual Review of Biochemistry*, 78, 959–991. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.114844>

- Richter, M., Baerlocher, K., Bauer, J. M., Elmadfa, I., Hesecker, H., Leschik-Bonnet, E., Stangl, G., Volkert, D. & Stehle, P. (2019). Revised reference values for the intake of protein. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 74(3), 242–250.
<https://doi.org/10.1159/000499374>
- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehntopf, M., Stümvoll, M., Kahn, C. R. & Blüher, M. (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(21), 8665–8670.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0903485106>
- Robert Koch-Institut. (2008). Oxidativer Stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 51(12), 1464–1482. <https://doi.org/10.1007/s00103-008-0720-5>
- Rodier, F. & Campisi, J. (2011). Four faces of cellular senescence. *Journal of Cell Biology*, 192(4), 547–556. <https://doi.org/10.1083/jcb.201009094>
- Rowiński, R., Kozakiewicz, M., Kedziora-Kornatowska, K., Hübner-Woźniak, E. & Kedziora, J. (2013). Markers of oxidative stress and erythrocyte antioxidant enzyme activity in older men and women with differing physical activity. *Experimental Gerontology*, 48(11), 1141–1146. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.07.010>
- Rudnicka, E., Napierała, P., Podfigurna, A., Męczekalski, B., Smolarczyk, R., & Grymowicz, M. (2020). The World Health Organization (WHO) approach to healthy ageing. *Maturitas*, 139, 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2020.05.018>
- Rygiel, K. A., Picard, M., & Turnbull, D. M. (2016). The ageing neuromuscular system and sarcopenia: a mitochondrial perspective. *Journal of Physiology (Vol. 594, Issue 16, pp. 4499–4512)*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1113/JP271212>
- Salminen, A. (2012). aging-04-166-2. *Aging*, 4(3). <https://doi.org/10.18632/aging.100444>
- Shahar, S., Kamaruddin, N. S., Badrasawi, M., Mohamed Sakian, N. I., Manaf, Z. A., Yassin, Z., & Joseph, L. (2013). Effectiveness of exercise and protein supplementation intervention on body composition, functional fitness, and oxidative stress among elderly Malays with

- sarcopenia. *Clinical Interventions in Aging*, 8, 1365–1375.
<https://doi.org/10.2147/CIA.S46826>
- Sandri, M. (2008). Signaling in muscle Atrophy and Hypertrophy. *Physiology*, 23, 160–170.
<https://doi.org/10.1152/physiol.00041.2007>
- Schneider, E. L. (1979). Aging and cultured human skin fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*, 73(1), 15–18. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12532753>
- Seiler, A., Schneider, M., Förster, H., Roth, S., Wirth, E. K., Culmsee, C., Plesnila, N., Kremmer, E., Rådmark, O., Wurst, W., Bornkamm, G. W., Schweizer, U. & Conrad, M. (2008). Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell Metabolism*, 8(3), 237–248.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.07.005>
- Shaw, A. C., Joshi, S., Greenwood, H., Panda, A. & Lord, J. M. (2010). Aging of the innate immune system. *Current Opinion in Immunology*, 22(4), 507–513.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.05.003>
- Sheng-Huang, C., Chieh-Hsin, C., Mu-Chun, Y., Wen-Tung, H., Chia-Ying, H., Ya-Ting, H., Wan-Ling, S., Juan-Jen, S., Chih-Yang, H. & Jer-Yuh, L. (2015). Effects of estrogen on glutathione and catalase levels in human erythrocyte during menstrual cycle. *Biomedical Reports*, 3(2), 266–268. <https://doi.org/10.3892/br.2014.412>
- Sigma-Aldrich. (2018). Fluorometric Thiol Quantitation Kit Green Fluorescence Catalog Number MAK151 Storage Temperature-20 °C.
<https://www.sigmaaldrich.cn/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/305/880/mak151bul.pdf>
- Singh, V., Gera, R., Purohit, M., Patnaik, S. & Ghosh, D. (2017). Fluorometric Estimation of Glutathione in Cultured Microglial Cell Lysate. *Bio-protocol*, 7(11).
<https://doi.org/10.21769/bioprotoc.2304>
- Smeuninx, B., Greig, C. A., & Breen, L. (2020). Amount, Source and Pattern of Dietary Protein Intake Across the Adult Lifespan: A Cross-Sectional Study. *Frontiers in Nutrition*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00025>

- Staltner, R. (2019). Zufuhr von Makronährstoffen sowie Trinkverhalten von österreichischen Senioren im Rahmen der NutriAging Protein Studie. (unveröffentlichte Bachelorarbeit, Ernährungswissenschaften). Universität Wien, Wien.
- Tabas, I. (2010). Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nature Reviews Immunology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 36–46).
<https://doi.org/10.1038/nri2675>
- Takahashi, M., Miyashita, M., Park, J.-H., Kawanishi, N., Bae, S., Nakamura, Y., Sakamoto, S. & Suzuki, K. (2013). Low-volume exercise training and vitamin e supplementation attenuates oxidative stress in postmenopausal women. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 59(5), 375–383. <https://doi.org/10.3177/jnsv.59.375>
- Talens, R. P., Christensen, K., Putter, H., Willemsen, G., Christiansen, L., Kremer, D., Suchiman, H. E. D., Slagboom, P. E., Boomsma, D. I. & Heijmans, B. T. (2012). Epigenetic variation during the adult lifespan: Cross-sectional and longitudinal data on monozygotic twin pairs. *Aging Cell*, 11(4), 694–703. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00835.x>
- Tieland, M., Borgonjen-Van Den Berg, K. J., Van Loon, L. J. C. & de Groot, L. C. P. G. M. (2015). Dietary protein intake in dutch elderly people: A focus on protein sources. *Nutrients*, 7(12), 9697–9706. <https://doi.org/10.3390/nu7125496>
- Traylor, D. A., Gorissen, S. H. M., & Phillips, S. M. (2018). Perspective: Protein requirements and optimal intakes in aging: Are we ready to recommend more than the recommended daily allowance? *Advances in Nutrition* (Vol. 9, Issue 3, pp. 171–182). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy003>
- Turell, L., Radi, R., & Alvarez, B. (2013). The thiol pool in human plasma: The central contribution of albumin to redox processes. *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 65, pp. 244–253). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050>
- Toussaint, O., Royer, V., Salmon, M. & Remacle, J. (2002). Stress-induced premature senescence and tissue ageing. *Biochemical Pharmacology*, 64(5–6), 1007–1009. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01170-x](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01170-x)

- van Raamsdonk, J. M. & Hekimi, S. (2009). Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genetics*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000361>
- Vezzoli, A., Mrakic-Sposta, S., Montorsi, M., Porcelli, S., Vago, P., Cereda, F., Longo, S., Maggio, M., & Narici, M. (2019). Moderate intensity resistive training reduces oxidative stress and improves muscle mass and function in older individuals. *Antioxidants*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/antiox8100431>
- Viña, J., Borrás, C., Gambini, J., Sastre, J. & Pallardó, F. V. (2005). Why females live longer than males? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by oestrogenic compounds. *FEBS Letters*, 579(12), 2541–2545. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.03.090>
- Vlasits, J., Jakopitsch, C., Bernroitner, M., Zamocky, M., Furtmüller, P. G., & Obinger, C. (2010). Mechanisms of catalase activity of heme peroxidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Vol. 500, Issue 1, pp. 74–81). <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.04.018>
- Wu, J. Q., Kosten, T. R. & Zhang, X. Y. (2013). Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 46, 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.02.015>
- Zhang, H., Qi, G., Wang, K., Yang, J., Shen, Y., Yang, X., Chen, X., Yao, X., Gu, X., Qi, L., Zhou, C. & Sun, H. (2023). Oxidative stress: Roles in skeletal muscle atrophy. *Biochemical Pharmacology*, 214, 115664. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115664>