universität wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Einfluss einer 18-monatigen Gedächtnistrainingsintervention auf oxidative DNA-Schäden bei institutionalisierten PensionistInnen“

verfasst von

Marie-Luise Wallner, Bakk.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 066 838
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Masterstudium Ernährungswissenschaften
Betreut von:	Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner

Anmerkungen

Aufgrund der leichteren Lesbarkeit des Textes wurde die männliche Form für beide Geschlechter verwendet. Der Begriff Pensionisten schließt daher weibliche und männliche Personen mit ein.

Da diese Masterarbeit im Rahmen einer zwei Jahre dauernden Studie der Plattform „Active Ageing“ geschrieben wurde, kann es zu inhaltlichen Überschneidungen mit meinen Kolleginnen kommen.

Irene Redlingshofer, Bakk.
Irina Demund, Bakk.
Bianca Arnold, MSc
Claudia Traxler, MSc
Tanja Spitzer, MSc
Sarah Proprentner, MSc
Tanja Eberhart, MSc

I. Inhaltsverzeichnis
II. Abbildungsverzeichnis
III. Tabellenverzeichnis
IV. Abkürzungsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung 1
2. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) 2
3. Quellen für ROS 3
3.1 Endogene Quellen 3
3.2 Exogene Quellen 4
4. Abwehr 5
4.1 Enzymatische antioxidative Abwehr 6
4.1.1 Glutathion Peroxidase 7
4.1.2 Katalase (CAT) 7
4.1.3 Superoxid Dismutase (SOD) 8
4.2 Nicht-enzymatische antioxidative Abwehr 8
4.2.1 Vitamin C 10
4.2.2 Vitamin E 10
4.2.3 Carotinoide 11
4.2.4 Flavonoide 13
4.2.5 Spurenelemente 14
4.2.6 Glutathion 14
5. Oxidativer Stress 15
6. Oxidative DNA-Schäden 18
7. Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Alterung 21
8. Effekte von psychologischen Faktoren auf die DNA bzw. ROS 24
8.1 Tierversuche 25
8.2 Humanstudien 26
9. Prinzip des Comet Assay 29
10. Material und Methoden 34
10.1 Studiendesign 34
10.2 Trainingsintervention 35
10.3 Ernährungsintervention 35

10.4 Gedächtnistraining für die Kontrollgruppe 36
10.4.1 Durchgeführte Übungen 37
10.5 Veränderungen im Alter 37
11. Comet Assay 40
11.1 Verwendete Chemikalien 40
11.2 Verwendete technische Geräte 41
11.3 Verwendete Materialien 41
11.4 Herstellung der Lösungen 42
12. Durchführung des Comet Assay 44
12.1 Beschichten der Objektträger 44
12.2 Aufbereitung der Lymphozyten 44
12.3 Aufbereitung der Kontrollprobe 45
12.4 Aufbringen auf Objektträger 45
12.5 Behandlung mit H_2O_2 46
12.6 Lyse 46
12.7 Behandlung mit FPG 46
12.8 Alkalibehandlung und Elektrophorese 46
12.9 Neutralisation 47
12.10 Färben und Auszählen 47
13. Statistik 48
14. Ergebnisse der 18-monatigen Intervention mit Gedächtnistraining 49
14.1 Aufteilung der Probanden nach Gruppen 49
14.2 Geschlechter- und Altersverteilung 50
14.3 Body Mass Index (BMI) 51
14.4 Ergebnisse zum Zeitpunkt T4 (Einfluss einer 12-monatigen Intervention) 54
14.4.1 DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse, aufgeteilt nach Interventionsgruppen (T4) 54
14.4.2 DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse, aufgeteilt nach Alterskategorien (T4) 56
14.4.3 DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2, aufgeteilt nach Interventionsgruppen (T4) 56
14.4.4 DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2, aufgeteilt nach Alterskategorien (T4) 58
14.4.5 DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG, aufgeteilt nach

Interventionsgruppen (T4) 59
14.4.6 DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG, aufgeteilt nach Alterskategorien (T4) 61
14.4.7 Korrekturfaktoren 62
14.5 Ergebnisse zum Zeitpunkt T5 (Einfluss einer 18-monatigen Intervention) 63
14.5.1 DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse, aufgeteilt nach Interventionsgruppen (T5) 63
14.5.2 DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse, aufgeteilt nach Alterskategorien (T5) 64
14.5.3 DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2, aufgeteilt nach Interventionsgruppen (T5) 65
14.5.4 DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2, aufgeteilt nach Alterskategorien (T5) 66
14.5.5 DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG, aufgeteilt nach Interventionsgruppen (T5) 67
14.5.6 DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG, aufgeteilt nach Alterskategorien (T5) 69
14.6 Zusammenfassung der Ergebnisse (T1, T4 und T5) 70
15. Schlussbetrachtung 72
16. Zusammenfassung 74
17. Abstract 75
18. Literaturverzeichnis 76
19. Lebenslauf 83

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus, wie α-Tocopherol, Ascorbat und reduziertes Glutathion (GSH) durch das NADPH-Glutathion-Reduktase System freie Radikale fangen 11
Abbildung 2: Positive und negative Auswirkungen von ROS 16
Abbildung 3: Mögliche (krebserregende) Eigenschaften von ROS/RNS 17
Abbildung 4: Interventionsgruppen 35
Abbildung 5: Veränderung der kognitiven Leistungen mit dem Alter 39
Abbildung 6: Einzelne Schritte bei der Durchführung des Comet Assay 30
Abbildung 7: DNA-Schäden als Kometen sichtbar 33
Abbildung 8: Unterschiedlich große DNA-Schäden in Prozent 48
Abbildung 9: Probandenanzahl in den einzelnen Gruppen (T5) 49
Abbildung 10: Geschlechterverteilung in der Kontrollgruppe 50
Abbildung 11: BMI bei Frauen und Männern aus allen Interventionsgruppen (T1 und T4) 53
Abbildung 12: BMI der unterschiedlichen Interventionsgruppen (T1 und T4) 54
Abbildung 13: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse in allen Interventionsgruppen (T1 und T4) 55
Abbildung 14: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse in der Gedächtnisgruppe (T1 und T4) 56
Abbildung 15: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2 in allen Interventionsgruppen (T1 und T4) 57
Abbildung 16: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2 in der Gedächtnisgruppe (T1 und T4) 58
Abbildung 17: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG in allen Interventionsgruppen (T1 und T4) 60
Abbildung 18: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG in der Gedächtnisgruppe (T1 und T4) 61
Abbildung 19: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse in allen Interventionsgruppen (T1, T4 und T5) 63
Abbildung 20: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse in der Gedächtnisgruppe (T1, T4 und T5) 64
Abbildung 21: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2 in allen Interventionsgruppen (T1, T4 und T5) 65

Abbildung 22: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2 in der Gedächtnisgruppe (T1, T4 und T5)..... 67
Abbildung 23: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG in allen Interventionsgruppen (T1, T4 und T5) 68
Abbildung 24: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG in der Gedächtnisgruppe (T1, T4 und T5)..... 69

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien inkl. Produzent und Produktnummer 40
Tabelle 2: Verwendete technische Geräte inkl. Produzent und Produktnummer 41
Tabelle 3: Verwendete Materialien inkl. Produzent und Produktnummer 41
Tabelle 4: Aufteilung der Probanden zum Zeitpunkt T1..... 49
Tabelle 5: Einteilung der Gedächtnisgruppe nach Alterskategorien 51
Tabelle 6: Einteilung des BMI nach Alter..... 51
Tabelle 7: Mittelwerte der DNA-Schäden in allen Gruppen zu den Zeitpunkten T1, T4 und T5 70
Tabelle 8: Mittelwerte der DNA-Schäden in den Alterskategorien in der Gedächtnisgruppe zu den Zeitpunkten T1, T4 und T5..... 71

IV. Abkürzungsverzeichnis

AL	ad libitum
AP	Apurin/Apyrimidin
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine serum albumin
CA	Chromosomen-Anomalie
CAT	Katalase
Cu,Zn-SOD	Kupfer,Zink-enthaltende Superoxid-Dismutase
CR	caloric restriction
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Endo III	Endonuklease III
Fe_2^+	Eisen
FBS	Fetal bovine serum
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
GSR	Glutathionreduktase
GST	Glutathion-S-Transferase
GPx	Glutathionperoxidase
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
HCl	Hydrochloric acid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-1-ethansulfonsäure
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
LDL	Low density lipoprotein

LMA	Low melting agarose
Mn-SOD	Mangan-enthaltende Superoxiddismutase
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOH	Natriumhydroxid
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NMA	Normal melting agarose
NO•	Stickstoffmonoxid-Radikal
$\bullet O_2^-$	Superoxid-Anion
O_2	Sauerstoff
OGG1	Oxoguanin-Glykosylase
OH^-	Hydroxidion
•OH	Hydroxyl-Radikal
$ONOO^-$	Peroxynitrit
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat buffered saline
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Revolutions per minute
RPMI	RPMI-1640 (ohne L-Glutamin)
SCA	Schwesterchromatidaustausch
Se	Selen
SH	Sulfhydrylgruppe
SOD	Superoxid-Dismutase
Tris	2-Amino-2(hydroxylmethyl)-propan-1,3-diol
Triton-X	O-[4-(1,1,3,3-Tetramethyl-butyl)phenoxy]polyethoxyethanol
8-OHdG	8-Hydroxy-2-Desoxyguanosin

1. Einleitung und Fragestellung

Wenn die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) das antioxidative Potential der Zelle übersteigt, kommt es zum oxidativen Stress und folglich zu Schädigungen an Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren. Insbesondere genotoxischer Stress, durch Oxidation, aktiviert DNA schädigende Signalwege. Dadurch steigt das Risiko für zelluläre Alterungsprozesse oder Apoptose, welche als Schlüsselereignis für Alterungsprozesse im Gewebe bekannt sind. Oxidativer Stress wird auch mit altersabhängigen medizinischen Erkrankungen, wie kardiovaskulären Erkrankungen, Demenz, usw. in Zusammenhang gebracht (Jorgensen et al., 2013).

Die Forschungsplattform Active Ageing hat in Zusammenarbeit mit anderen Departments im Zeitraum von zwei Jahren eine Studie durchgeführt. Dabei ging es um die Frage, ob Training, Supplemente und Gedächtnistraining bei institutionalisierten Pensionisten einen Einfluss auf Gesundheit und Lebensqualität bzw. die Entstehung von oxidativen DNA-Schäden haben. An der Studie nahmen insgesamt 105 Pensionisten (durchschnittlich 83 Jahre alt) aus 5 Wohnhäusern des Kuratoriums für Wiener Pensionisten-Wohnhäuser teil. Das Blut der Teilnehmer wurde unter anderem auch auf DNA-Schäden untersucht. Diese Schäden wurden mit Hilfe des Comet Assay gemessen, womit Einzel- und Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden können. Verwendet man zusätzlich noch Reparatur-Enzyme wie die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase, kann die Sensitivität und Spezifität deutlich erhöht werden (Collins et al., 1997).

In anderen Studien wurden schon mehrfach die Auswirkungen von Sport und Ernährung auf die Entstehung von oxidativen DNA-Schäden untersucht. Über den Einfluss von sozialen Kontakten, psychologischem Stress, Gedächtnistraining, usw. gibt es jedoch nur wenige und vor allem widersprüchliche Daten.
In dieser Arbeit geht es um die Einwirkung von kognitivem Training und psychischem Stress auf die Entstehung von oxidativen DNA-Schäden.

2. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies sind Zwischenprodukte bei der Atmung und des aeroben Stoffwechsels. ROS sind, wenn sie in einem richtigen Maß gebildet werden, mit zahlreichen biologischen Prozessen verknüpft. Die streng kontrollierte Bildung von ROS ist ein grundlegender Prozess und eines der zentralen Elemente bei der Zellsignalisierung, Genexpression und Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase und Signaltranstuktionswegen, die an Funktion, Wachstum, Differenzierung und Tod von Zellen beteiligt sind. Andererseits können sie, wenn sie in einem Übermaß vorhanden sind, negative Auswirkungen haben (Al-Gubory et al., 2010).

Der Begriff „reaktive Sauerstoffspezies“ ist ein Sammelbegriff für freie Radikale und ihre nicht radikalen Zwischenprodukte (Burton und Jauniaux, 2011). Reaktive Stickstoffspezies (RNS) ist ein ähnlicher Sammelbegriff für Stickstoffmonoxid-Radikale ($NO^{\cdot}$), Stickstoffdioxid-Radikale ($NO_2^{\cdot}$), $ONOO^-$ und andere Oxide und Produkte von Stickstoff (Wiseman und Halliwell, 1996).
Freie Radikale haben ein oder mehrere ungepaarte Elektronen und diese unvollständige Elektronenhülle verleiht ihnen ihre hohe Reaktionsfähigkeit. Freie Radikale können von zahlreichen Elementen gebildet werden, aber in biologischen Systemen sind meist solche mit Sauerstoff oder Stickstoff die Wichtigsten. Unter physiologischen Bedingungen ist das gängigste freie Sauerstoffradikal das Superoxid-Anion ($\bullet O_2^-$) (Burton und Jauniaux, 2011), welches durch die Addition eines Elektrons zu molekularem Sauerstoff, vor allem in den Mitochondrien gebildet wird (Birben, et al., 2012). Weitere Quellen für Superoxide, unter physiologischen Bedingungen, beziehen die NADPH-Oxidase, Cytochrom P450 und andere Oxido-Reduktasen mit ein. Demzufolge erhöhen verschiedene Wachstumsfaktoren, Medikamente und Toxine die Bildung von ROS. Superoxide werden durch die Superoxid-Dismutase entgifted, wobei Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entsteht. Wasserstoffperoxid ist kein freies Radikal, weshalb es weniger reaktiv ist als das Superoxidanion. Aufgrund der engen Einbindung in die Bildung und Entgiftung von freien Radikalen fällt das H_2O_2 dennoch unter den Begriff ROS. Da es nicht polar ist, kann es sich durch Zell- und Organellmembranen ausbreiten und arbeitet daher weitgehend als sekundärer Botenstoff bei Signal-Transduktionswegen. Wasserstoffperoxid wird wiederum durch Katalase und Glutathionperoxidase zu

Wasser entgifted (Burton und Jauniaux, 2011). In einer Folge von Reaktionen, genannt Haber-Weiss und Fenton-Reaktion, kann Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Übertragungsmetallen, wie Fe_2^+ und Cu_2^+, zu OH^- abgebaut werden.

$Fe^{3+} + \cdot O_2 \rightarrow Fe^{2+} + O_2$ Haber-Weiss

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + \cdot OH$ Fenton Reaktion (Birben et al., 2012)

Ein Ungleichgewicht in den Konzentrationen von Superoxidanion und Wasserstoffperoxid kann in der Entstehung des viel gefährlicheren Hydroxyl-Radikals (•OH) resultieren. Diese Reaktion wird durch freie Eisenionen in der Fenton-Reaktion katalysiert. Das Hydroxyl-Ion reagiert mit jedem biologischen Molekül in seiner unmittelbaren Umgebung, (Burton und Jauniaux, 2011) kann also Proteine, Lipide und die DNA schädigen (Birben et al. 2012) und aufgrund der hohen Reaktivität gibt es keinen bekannten Scavenger dafür (Burton und Jauniaux, 2011).

3. Quellen für ROS

3.1 Endogene Quellen

Die Bildung von freien Radikalen kann als zweischneidiges Schwert betrachtet werden, da auf der einen Seite sauerstoffabhängige Reaktionen und aerobe Respiration lebenswichtig sind. Auf der anderen Seite hat die Bildung von ROS aber das Potential, Schäden zu verursachen.

Sauerstoff kann durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies toxisch und mutagen wirken. Das (einzelne) Sauerstoffatom ist instabil, weshalb jedes dazu neigt ein Zwillingsatom zu binden, also molekularen Sauerstoff zu bilden. Die Stabilität dieser Bindung ist gefährdet, da nur ein Paar von Elektronen gemeinsam genutzt wird und zwei ungepaarte Elektronen übrig bleiben, weshalb Sauerstoff genau genommen ein freies Diradikal ist. Wenn das Sauerstoffatom kein Zwillingsatom findet, akzeptiert es auch Wasserstoff zur Bildung von Wasser, aber es kann ein Elektron mehr oder weniger da sein, was in Instabilität resultiert. Dieser Komplex stellt ein freies Radikal dar (Buonocore et al., 2010).

Die wichtigsten endogenen Quellen für ROS sind Stoffwechselprozesse, vorrangig oxidativer Stoffwechsel in den Mitochondrien und pathologische Prozesse wie Entzündungen. ROS sind nicht nur Nebenprodukte des zellulären Stoffwechsels, sondern werden mitunter auch durch spezifische Plasmamembranoxidasen als Reaktion auf Wachstumsfaktoren und Zytokine gebildet und dienen als sekundäre Botenstoffe in spezifischen Signalwegen. Im Allgemeinen kann man sagen, dass ROS in normalen physiologischen Mengen eine Rolle bei Signalwegen und Genexpression spielen, weshalb ihre Produktion von entscheidender Bedeutung ist (Barzilai und Yamamoto, 2004).

Die Belastung von ROS kann zusätzlich durch die Gegenwart von freien Metallen wie Eisen, Kupfer und Mangan, die aus Metalloprotein-Komplexen freigesetzt wurden, verstärkt werden. Abgesehen von Mitochondrien gibt es auch andere zelluläre Quellen, wie zum Beispiel die Xanthine Oxidase. Zusätzliche endogene Ursprünge sind Neutrophile, Eosinophile und Makrophagen (Buonocore et al., 2010).

3.2 Exogene Quellen

Zigarettenrauch enthält zahlreiche Oxidantien, freie Radikale und organische Verbindungen wie Superoxide und Stickstoffmonoxid. Des Weiteren aktiviert die Inhalation von Zigarettenrauch in die Lunge ebenfalls einige endogene Mechanismen wie die Akkumulierung von Neutrophilen und Makrophagen, welche die oxidativen Schäden weiter erhöhen (Birben et al., 2012).

Die Exponierung mit *Ozon* kann eine Lipidperoxidation verursachen und zum Zustrom von Neutrophilen in das Epithel der Atemwege führen. Sogar bei gesunden Personen kann dies eine verringerte Lungenfunktion bewirken (Birben et al., 2012).

Ionisierende Strahlung konvertiert Hydroxylradikale, Superoxide und organische Radikale, in Gegenwart von O_2, zu Wasserstoffperoxid und organischen Hydroperoxiden. Diese Hydroperoxide reagieren mit Eisen und Kupfer in der Fenton-Reaktion, wodurch oxidativer Stress ausgelöst wird (Birben et al., 2012).

Schwermetallionen, wie Eisen, Kupfer und Cadmium können die Bildung von reaktiven Radikalionen induzieren und zelluläre Schäden, durch verminderte Enzymaktivität durch Lipidperoxidation und Reaktion mit Proteinen und DNA verursachen. Einer der wichtigsten Mechanismen der metallvermittelten Erzeugung von freien Radikalen ist die Fenton-Reaktion. Superoxidanione und Wasserstoffperoxide können mit Übertragungsmetallen, wie Eisen und Kupfer, durch die metallkatalysierte Haber-Weiss/Fenton-Reaktion interagieren und so OH-Radikale bilden (Birben et al., 2012).

4. Abwehr

Lebewesen haben verschiedene Wege entwickelt, um diesen schädigenden Substanzen entgegen zu wirken. Dazu zählen präventive Mechanismen, antioxidative Abwehr und Reparaturmechanismen (Buonocore et al., 2010).
Die erste Verteidigungslinie gegen ROS ist der Schutz vor ihrer Bildung, d.h. die Prävention, wofür es in der Biologie zahlreiche Strategien gibt. Diese reichen vom Plankton, welches von der Meeresoberfläche absteigt, um die Sonnenbestrahlung zu verringern bis hin zur Verpackung der DNA in Chromatin, um das genetische Material, durch bereitstellen alternativer Ziele zu schützen. Zusätzlich beinhaltet die Prävention von Kettenreaktionen das Binden von Metallionen, im speziellen Eisen- und Kupferionen. Dies ist eine wichtige Möglichkeit, um die Lipidperoxidation und die Fragmentierung der DNA zu kontrollieren. Somit sind metallbindende Proteine wie Ferritin, Transferrin, usw. bei der Steuerung von möglichen radikalbildenden Reaktionen von zentraler Bedeutung. Für den Schutz der Zellen vor einfallenden Strahlen können auch spezielle Pigmente verantwortlich sein, beispielsweise Melanin für UV-Strahlen oder Carotinoide für Singulett-Sauerstoff (Sies, 1997).

Eine Verteidigungsmöglichkeit gegen die Toxizität von Sauerstoff ist die Gewebekonzentration von nur 0,5 bis 5%, im Gegensatz zum Gehalt in der Luft von 20%. Dieser relativ geringe Gehalt verhindert, dass die meisten oxidativen Schäden gar nicht erst entstehen. Es wird geschätzt, dass jeden Tag etwa $2x10^4$ DNA-schädigende Ereignisse in jeder Zelle des menschlichen Körpers stattfinden. Ein erheblicher Teil der Schäden wird durch ROS verursacht (Barzilai und Yamamoto, 2004).

Die intrazelluläre Produktion und Verbreitung von ROS wird durch hochkomplexe und integrierte antioxidative Systeme geregelt. Zellen von Säugetieren haben eine Vielzahl von zusammenhängenden enzymatischen, antioxidativen Mechanismen entwickelt, welche ihnen ermöglichen, die oxidative Umgebung zu bekämpfen und so (Al-Gubory et al., 2010) Zellen und Organe vor Schädigungen durch frei Radikale zu schützen (Rahman, 2007). Neben enzymatischen Systemen gibt es auch nicht-enzymatische, diätetische Antioxidantien (Al-Gubory et al., 2010).

Der Begriff „Antioxidans" bezieht sich auf jedes Molekül, das freie Radikale stabilisieren oder deaktivieren kann, bevor es die Zellen angreift. Die Antioxidantien sind entweder schon im Körper vorhanden oder können von außen, z.B. als Teil der Nahrung oder als Supplement, aufgenommen werden. Manche Antioxidantien aus Lebensmitteln können freie Radikale nicht neutralisieren, verbessern aber die endogene Aktivität und werden folglich trotzdem als Antioxidantien klassifiziert. Ein ideales Antioxidans sollte leicht adsorbiert werden können und die freien Radikale schnell quenchen, sowie mit Redoxmetallen Chelate bilden. Weiters sollte es im wässrigen und/oder Membranbereich arbeiten und die Genexpression auf eine positive Weise beeinflussen. Endogene Antioxidantien spielen in der Erhaltung der optimalen Zellfunktionen und auf diese Weise auch bei der systemischen Gesundheit und dem Wohlbefinden eine entscheidende Rolle. Jedoch dürften endogene Antioxidantien in Situationen, welche oxidativen Stress begünstigen, nicht ausreichen. Deshalb könnten zusätzlich dietätische Antioxidantien erforderlich sein, um die optimale Zellfunktion zu unterstützen (Rahman, 2007).
Die effizientesten enzymatischen Antioxidantien sind Glutathionperoxidasen, Katalasen und Superoxid Dismutasen. Zu den nicht enzymatischen Antioxidantien gehören Vitamin C und E, Glutathion, Carotinoide, Flavonoide, etc. Manche Antioxidantien können mit anderen interagieren und so ihren Orginialzustand wiederherstellen. Dieser Mechanismus wird oft als „antioxidatives Netzwerk" bezeichnet (Rahman, 2007).

4.1 Enzymatische antioxidative Abwehr

Es gibt zahlreiche spezialisierte antioxidative Enzyme, die mit oxidativen Verbindungen reagieren und sie generell auch entgiften. Die Wichtigsten sind

Glutathionperoxidasen, Katalasen und Superoxid Dismutasen (Sies, 1997). Bei der enzymatischen Abwehr haben alle Enzyme ein Übergangsmetall in ihrem Kern, welches dazu in der Lage ist, während des Entgiftungsprozesses Elektronen auf verschiedene Arten zu übertragen (Burton und Jauniaux, 2011).

4.1.1 Glutathion Peroxidase

Es gibt zwei Formen der Glutathion-Peroxidase, eine ist Selen-abhängig (GPx) und die andere Selen-unabhängig (Glutathion-S-Transferase, GST). Der Unterschied besteht in der Anzahl der Untereinheiten, des katalytischen Mechanismus und der Bindung von Selen im aktiven Zentrum. Der Glutathionstoffwechsel ist einer der Wichtigsten antioxidativen Abwehrmechanismen in der Zelle. Es gibt vier verschiedene Selen-abhängige Glutathionperoxidasen beim Menschen und man weiß, dass diese zwei Elektronen addieren um Peroxide, durch die Bildung von Selenolen (Se-OH), zu reduzieren. Selen-abhängige Glutathionperoxidasen arbeiten in Verbindung mit dem Tripeptid Glutathion (GSH), welches in hohen Konzentrationen in Zellen vorhanden ist und die Umwandlung von Wasserstoffperoxid oder organischen Peroxiden zu Wasser oder Alkohol katalysiert, während es gleichzeitig GSH oxidiert. Außerdem konkurriert es mit der Katalse um Wasserstoffperoxid als Substrat und ist die wichtigste Quelle für den Schutz vor oxidativem Stress (Rahman, 2007). Die Aktivität der Glutathionperoxidase hängt vom Vorhandensein des GSH, als Wasserstoffdonator, ab (Burton und Jauniaux, 2011).

4.1.2 Katalase (CAT)

Die Katalase ist ein Tetramer bestehend aus 4 identischen Monomeren, wobei jede eine Hämgruppe in ihrem aktiven Zentrum enthält (Birben et al., 2012). Dieses Enzym ist in den Peroxisomen von aeroben Zellen vorhanden und fördert sehr effizient die Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff. Die Katalase hat eine der höchsten Umsatzgeschwindigkeiten aller Enzyme, denn ein Molekül Katalase wandelt jede Minute ungefähr 6 Millionen Moleküle Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff um (Rahman, 2007).

4.1.3 Superoxid Dismutase (SOD)

Die Superoxid-Dismutase ist eines der effektivsten intrazellulären enzymatischen Antioxidantien und katalysiert die Umwandlung von Superoxidanionen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. SOD neutralisiert Superoxidanione durch aufeinanderfolgende oxidative und reduktive Zyklen von übertragenden Metallionen in ihrem aktiven Zentrum. SOD existiert in unterschiedlichen Isoformen, welche sich in der Art ihres aktiven Metallzentrums, der Zusammensetzung der Aminosäuren, Co-Faktoren, usw. unterscheiden. Beim Menschen gibt es drei unterschiedliche Formen der SOD, zytosolische Cu,Zn-SOD, mitochondriale Mn-SOD und extrazelluläre SOD. Die zytosolische SOD hat zwei identische Untereinheiten und jede dieser Untereinheiten enthält, ebenso wie das aktive Zentrum, ein zweikerniges Metallcluster aus Kupfer- und Zinkionen. Es katalysiert speziell die Dismutation des Superoxidanions zu Sauerstoff und Wasser. Die mitochondriale Mn-SOD enthält ein Manganatom pro Untereinheit und ist auf die Mitochondrien beschränkt. Die extrazelluläre SOD enthält Kupfer und Zink, und ist ein tetramerisches Glykoprotein (Rahman, 2007).

4.2 Nicht-enzymatische antioxidative Abwehr

Eine Strategie für präventive Antioxidation könnte Prävention durch Umleitung (Diversion) sein. Dies geschieht durch Kanalisierung einer angreifenden Spezies zu einem weniger schädlichen Produkt, wodurch das Risiko für weitere Schädigung verringert wird. Im Extremfall könnte dies gesunde Zellen einbeziehen, wie beispielsweise die Zellen der Darmschleimhaut. Diese Zellen sind einer Vielzahl von reaktiven Zwischenprodukten und Xenobiotika ausgesetzt, und die Akkumulationsquote von Produkten durch oxidative Schäden ist in diesen Zellen sehr hoch. Die Beseitigung von gesunden Zellen verhindert die Ausbreitung von „challenging species“. Diese Art der Prävention überschneidet sich teilweise mit dem Konzept der Interzeption (Sies, 1997).

Das Grundproblem der Interzeption besteht darin, eine beschädigte Spezies abzufangen wenn sie schon einmal gebildet wurde und sie vor weiteren schädigenden Reaktionen zu schützen. Dies ist der Prozess der Deaktivierung. Für radikale Verbindungen besteht die letzte Deaktivierung aus der Bildung von nicht-radikalen und nicht-reaktiven Endprodukten (Sies, 1997).

Ein zweites Ziel von biologischer Wichtigkeit ist der Transfer der radikalen Funktion weg von den empfindlicheren Zielstellen zu Zellkompartimenten, in denen eine oxidative Herausforderung weniger Schaden anrichten würde. Im Allgemeinen ist damit der Transfer der oxidierenden Äquivalente weg von der hydrophoben in die wässrige Phase gemeint, beispielsweise von der Membran in das Cytosol. Biologisch gesehen kombinieren die effizientesten abfangenden Antioxidantien diese beiden Strategien. Zuerst reagieren sie mit den freien Radikalen, wie Lipidperoxidradikalen und zweitens sind sie fähig, mit wasserlöslichen Verbindungen zusammenarbeiten, um sich selbst zu regenerieren. Solche abfangenden, kettenbrechenden Antioxidantien sind häufig phenolische Verbindungen. (R,R,R)-α-Tocopherol ist wahrscheinlich die effizienteste Verbindung in der Lipidphase. Dieses biologische Antioxidans enthält schützende Methylgruppen in der Nähe der phenolischen Hydroxylgruppe der funktionellen Gruppe und ist in der Membran optimal durch Phytyl-Seitenketten positioniert (Sies, 1997).
Für das effiziente Abfangen durch phenolische Antioxidantien ist es notwendig, dass die Lebenszeit der Radikale nicht zu kurz ist. Peroxylradikale sind deshalb wichtige Reaktionspartner, da sich ihre Lebensdauer über Sekunden erstreckt. Im Gegensatz dazu kann das Hydroxylradikal mit seiner hohen Reaktivität und extrem kurzen Lebenszeit nicht mit angemessener Effizienz abgefangen werden. Hocheffiziente biologische Polyenquencher für Singulett Sauerstoff, insbesondere Carotinoide, stellen trotz ihrer Reaktivität und kurzen Lebensdauer ein geeignetes Abwehrsystem gegen diese Sauerstoffspezies dar (Sies, 1997).

Zusätzlich zum primären Schutz gegen ROS durch antioxidative Enzyme, gibt es eine sekundäre Abwehr durch kleine Moleküle, sogenannte „Scavenger“, welche mit Radikalen reagieren und andere radikale Verbindungen produzieren. Wenn diese „Scavenger“ weniger schädliche radikale Spezies erzeugen, nennt man sie Antioxidantien. Beispielsweise können α-Tocopherol, Ascorbat und GSH in Kombination als zelluläre Antioxidantien wirken (Bandyopadhyay et al., 1999).
Antioxidative Vitamine gehören zu den wichtigsten dietätischen Antioxidantien, welche die ROS unmittelbar abfangen, und stellen eine bedeutende Quelle für den Schutz gegen die schädlichen Wirkungen von ROS dar. Spurenelemente sind äußerst wichtig, da sie einen Teil des aktiven Zentrums darstellen, der für die Funktion der antioxidativen Enzyme notwendig ist bzw. wirken sie als Cofaktoren bei

der Regulierung von antioxidativen Enzymen. Polyphenole sind wegen ihrer günstigen Auswirkung auf die Gesundheit als natürliche Antioxidantien besonders wichtig und kommen bei einer Ernährung mit einem hohen Anteil an Obst und Gemüse ubiquitär vor (Al-Gubory et al., 2010).

4.2.1 Vitamin C

Wasserlösliche Ascorbinsäure unterstützt in vivo den antioxidativen Schutz, vorwiegend als Fänger von Peroxyl- und Sauerstoffradikalen in wässrigen Phasen (Jacob und Burri, 1996) und schützt so auch vor DNA-Schäden (Al-Gubory et al., 2010). Es ist in Geweben und Flüssigkeiten mit einem hohen Potential für Radikalbildung, wie Auge, Gehirn, Leber, usw. angereichert (Jacob und Burri, 1996). Mit steigendem Alter verringert sich der Plasmagehalt von Vitamin C (Birben et al., 2012). Die oxidierte Form des Vitamins, Dehydroascorbinsäure, wird schnell durch das GSH und/oder NADPH in die reduzierte Form umgewandelt. Es gibt Hinweise, dass Ascorbat durch die Regenerierung der reduzierten Form von α-Tocopherol, dem primären Antioxidans in der Lipidphase, auch vor Lipidperoxidation schützt (Jacob und Burri, 1996). Vitamin C verhindert die Oxidation von LDL in vitro, vorrangig durch das Abfangen von freien Radikalen und anderen ROS, wodurch sie eine Interaktion mit LDL verhindern. In empirischen Daten wurde auch gezeigt, dass die Aufnahme von Vitamin C mit einer reduzierten Anzahl an kardiovaskulären Krankheiten assoziiert ist, wobei neuere Ergebnisse eher enttäuschend sind und keine Korrelation zeigen (Rahman, 2007).

Allerdings kann Ascorbat, zusätzlich zu seiner antioxidativen Fähigkeit, in geringer Konzentration und in Gegenwart von katalytischen Metallionen (Kupfer und Eisen), aufgrund seiner metallreduzierenden Fähigkeiten das Hydroxylradikal bilden. Ascorbat ist das einzige zelluläre Reduktionsmittel, um O_2^- in der metallkatalysierten Haber-Weiss Reaktion unter physiologischen Bedingungen auszutauschen (Bandyopadhyay et al., 1999).

4.2.2 Vitamin E

Das fettlösliche Vitamin E kommt in der hydrophoben Innenseite von Zellmembranen konzentriert vor und ist hauptsächlich für die Abwehr gegen oxidationsinduzierte

Membranschäden verantwortlich. α-Tocopherol ist die aktivste Form von Vitamin E und das bedeutendste membrangebundene Antioxidans in der Zelle. Vitamin E gibt Elektronen an Peroxylradikale ab, welche während der Lipidperoxidation produziert werden (Birben et al., 2012), weshalb die Hauptfunktion auch der Schutz vor Lipidperoxidation ist. Vitamin E zeigte auch Schutz vor LDL-Oxidation in vitro, eine erhöhte Oxidationsbeständigkeit von LDL, sowie eine verringerte agonisteninduzierte Plättchenaggregation und Gefäßerweiterung ex vivo (Rahman, 2007). Außerdem löst es Apoptose von Krebszellen aus und inhibiert die Bildung von freien Radikalen (Birben et al., 2012).

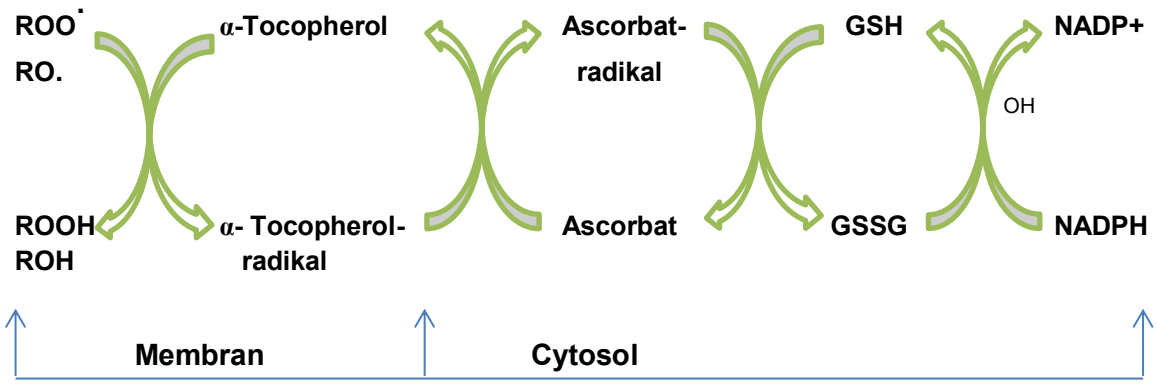

Abbildung 1: Mechanismus, wie α-Tocopherol, Ascorbat und reduziertes Glutathion (GSH) durch das NADPH-Glutathion-Reduktase System freie Radikale fangen (Bandyopadhyay et al., 1999)

Gebildete Tocopherolradikale können zur Membranoberfläche wandern und werden dort durch Reaktion mit Ascorbat oder GSH wieder zu α-Tocopherol regeneriert. Das resultierende Ascorbatradikal kann durch Reduktion mit GSH, welches auch direkt ROS fangen kann, das Ascorbat regenerieren. Das entstandene GSSG (Glutathion-Disulfid) kann durch das NADPH-Glutathion-Reduktase System das GSH erneuern (siehe Abb. 1) (Bandyopadhyay et al.,1999).

4.2.3 Carotinoide

Die einzigartige Struktur von Carotinoiden bestimmt ihre potentiellen biologischen Funktionen. Die meisten Carotinoide können von einer Grundstruktur aus 40 Kohlenstoffmolekülen abgeleitet werden, welche ein System von konjugierten Doppelbindungen beinhalten. Die zentrale Kette dürfte zyklische Endgruppen enthalten, welche mit sauerstoffhältigen funktionellen Gruppen substituieren können.

Basierend auf ihrer Zusammensetzung können sie in zwei Gruppen eingeteilt werden. Carotine, die nur Kohlenstoff- und Wasserstoffatome enthalten und Oxocarotinoide (Xanthophylle), die mindestens ein Sauerstoffatom beinhalten. Das Muster von konjugierten Doppelbindungen im Polyenrückgrat von Carotinoiden bestimmt ihre lichtabsorbierenden Eigenschaften und beeinflusst ihre antioxidative Aktivität. Carotinoide sind lipophile Moleküle, welche dazu geneigt sind, sich in lipophilen Kompartimenten, wie Membranen und Lipoproteinen, anzureichern. Die Lipophilität dieser Verbindungen beeinflusst auch Absorption, Transport und Ausscheidung im Organismus (Stahl und Sies, 2003).

Carotinoide sind am ehesten beim Scavenging von zwei ROS Typen beteiligt, dem Singulett Sauerstoff und Peroxylradikalen. Das Zusammenspiel von Carotinoiden mit Singulett Sauerstoff hängt weitgehend vom physikalischen Quenching ab, welches direkten Energietransfer zwischen den beiden Molekülen beinhaltet (Stahl und Sies, 2003), wodurch elektronisch angeregte Moleküle inaktiviert werden können (Al-Gubory et al., 2010). Die Effizienz der Carotinoide für das physikalische Quenching hängt wiederum von der Anzahl der im Molekül vorhandenen konjugierten Doppelbindungen ab (Stahl und Sies, 2003), welche die Fähigkeit besitzen, ungepaarte Elektronen zu delokalisieren (Rahman, 2007).
Carotinoide reagieren höchst wirksam mit Peroxylradikalen, die während der Lipidperoxidation gebildet werden. Das Abfangen von Peroxylradikalen unterbricht die Reaktionsfolge, welche letztendlich zu Schäden an lipophilen Kompartimenten führen würde. Carotinoide spielen beim Schutz von Zellmembranen und Lipoproteinen, vor oxidativen Schäden, eine wichtige Rolle.
Die antioxidative Aktivität von Carotinoiden hängt von der Sauerstoffspannung im System ab. Bei einem geringen Sauerstoffpartialdruck, der in den meisten Geweben unter physiologischen Bedingungen herrscht, hemmt β-Carotin die Oxidation. Im Gegensatz dazu folgt auf die anfängliche antioxidative Aktivität von β-Carotin eine prooxidative Wirkung bei hoher Sauerstoffspannung. Die prooxidative Wirkung könnte mit der nachteiligen Wirkung, beobachtet bei einer Supplementierung von hohen Dosen von β-Carotin, verbunden sein (Stahl und Sies, 2003).

Eine Reihe von epidemiologischen Studien hat gezeigt, dass eine erhöhte Aufnahme von Carotinoiden über Supplemente mit einem verringerten Risiko für einige

degenerative Krankheiten, wie verschiedene Krebsarten, kardiovaskuläre und ophthalmologische Krankheiten korreliert. Der präventive Effekt wurde mit ihrer antioxidativen Wirkung assoziiert und außerdem beeinflussen Carotinoide die Zellsignalisierung (Stahl und Sies, 2003).

4.2.4 Flavonoide

Flavonoide sind eine große Klasse von niedermolekularen, ubiquitären Gruppen von Pflanzenmetaboliten und wesentlicher Bestandteil der menschlichen Ernährung. Sie sind aus phenolischen und Pyranringen zusammengesetzt und während des Metabolismus werden Hydroxylgruppen hinzugefügt, methyliert, sulfatiert oder glucuronidiert. Die biologischen Eigenschaften von Flavonoiden werden durch Menge, Natur und Position der Substituenten, sowie der Anzahl der Hydroxylgrupppen bestimmt. Diese Faktoren entscheiden darüber, ob ein Flavonoid als Antioxidans oder als Regulator für Enzymaktivität agiert oder ob es antimutagene oder zytotoxische Eigenschaften besitzt (Rahman, 2007).

Die am häufigsten berichtete Aktivität von Flavonoiden ist ihr Schutz gegen oxidativen Stress. Demnach können sie Peroxylradikale fangen, sind effektive Inhibitoren der Lipidperoxidation und können redoxaktive Metalle chelatieren und dadurch vor dem katalytischen Abbau von Wasserstoffperoxid schützen. Allerdings können Flavonoide unter gewissen Umständen prooxidative Aktivität zeigen und man glaubt, dass dies direkt proportional zur Anzahl von Hydroxylgruppen ist (Rahman, 2007).

In manchen großen prospektiven Studien wurde auf die protektive Rolle von Flavonoiden in der Ernährung hingedeutet. In vitro unterdrücken sie die LDL-Oxidation und nach Aufnahme von flavonoidreichen Lebensmitteln kommt es zu einer erhöhten antioxidativen Kapazität und reduzierten Oxidierbarkeit von LDL. Außerdem ist eine hohe Aufnahme von Flavonoiden mit einer verringerten Mortalitätsrate bei koronaren Herzkrankheiten assoziiert. Es gibt aber auch Studien, bei denen gar kein Effekt sichtbar war (Rahman, 2007).

4.2.5 Spurenelemente

Spurenelemente haben eine indirekte antioxidative und detoxifizierende Eigenschaft und sind demzufolge essentiell für die Abwehrsysteme gegen ROS-induzierte Zellschäden. Tatsächlich sind Kupfer, Zink, Mangan und Selen von besonderer Wichtigkeit, da sie essentielle Bestandteile von enzymatischen, antioxidativen Systemen (SOD und GPx) sind (Al-Gubory et al., 2010).

4.2.6 Glutathion

Das Tripeptid Glutathion ist ein multifunktionales, intrazelluläres Antioxidans. Es ist in Cytosol und Mitochondrien reichlich vorhanden und stellt dort das wichtigste lösliche Antioxidans dar. Die reduzierte Form des Glutathion ist GSH, während die oxidierte Form das GSSG ist (Glutathion-Disulfid). Oxidiertes Glutathion akkumuliert an der Innenseite der Zellen und das Verhältnis von GSH/GSSG ist ein guter Maßstab für oxidativen Stress im Organismus. Die vorwiegende Schutzfunktion von Glutathion gegen oxidativen Stress ist, dass es als Cofaktor für mehrere entgiftende Enzyme fungiert. Es beteiligt sich am Aminosäuretransport durch die Plasmamembran, fängt direkt Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff ab und regeneriert Vitamin C und E in ihre aktiven Formen (Rahman, 2007).

Die Glutathionreduktase (GSR) katalysiert die Reduktion der oxidierten Form des Glutathion (GSSG) zu reduziertem Glutathion (GSH), mit NADPH als Reduktionsmittel. Daher ist GSR essentiell für den Glutathion-Redox-Zyklus zur Aufrechterhaltung der Zellen in einem reduzierten Zustand. Im reduzierten Zustand von Glutathion ist die Thiolgruppe des Cysteins in der Lage, ein reduziertes Äquivalent ($H^+ + e^-$) einem anderen instabilen Molekül, z.B. ROS zur Verfügung zu stellen. Durch Übertragung eines Elektrons reagiert das GSH mit einem weiteren reaktiven GSH, um GSSG zu bilden. Die Glutathion-S-Transferase spielt eine wichtige Rolle bei der Entgiftung reaktiver Metaboliten durch Katalysierung ihrer Konjugation mit Glutathion (Al-Gubory et al., 2010).

5. Oxidativer Stress

Das Ungleichgewicht zwischen der Produktion reaktiver Spezies und antioxidativer Abwehr nennt man oxidativer Stress (Halliwell, 2001). Sies definierte dies als Störung im prooxidativen-antioxidativen Gleichgewicht zugunsten des Erstgenannten, was zu möglichen Schäden führen kann (Sies, 1997). Grundsätzlich können zwei verchiedene Umstände zu oxidativem Stress führen. Entweder durch verminderte Antioxidantien, denn Mutationen können sich beispielsweise auf die Enzyme der antioxidativen Abwehr (wie Mn-SOD oder GPx) auswirken oder toxische Substanzen können diese Abwehr vermindern. Auch eine geringe Aufnahme von „diätetischen" Antioxidantien und anderen essentiellen Bestandteilen der Ernährung kann zu oxidativem Stress führen (Halliwell, 2001).
Die zweite Möglichkeit ist eine gesteigerte Produktion von ROS, beispielsweise durch Exposition mit erhöhtem Level an Toxinen, welche ihrerseits reaktive Spezies sind (z.B. NO_2) oder sie werden zu solchen Spezies metabolisiert. Auch die übermäßige Aktivierung von „natürlichen" ROS-Produktionssystemen (z.B. Aktivierung von phagozytären Zellen bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis) trägt zur erhöhten Bildung von ROS bei (Halliwell, 2001).

Oxidativer Stress ist nicht immer schlecht, denn die Bildung von ROS an Entzündungsstellen zerstört nicht nur eindringende Krankheitserreger, sondern hilft auch eine übermäßige Entzündungsreaktion unter gewissen Umständen zu modulieren. Sie können manchmal, beispielsweise durch die Regulierung der Lymphozytenfunktion, antiinflammatorisch wirken. Reaktive Sauerstoffspezies spielen eine wichtige Rolle, weshalb die Herausforderung darin besteht, die antioxidative Abwehr weiterzuentwickeln und gleichzeitig die Schäden zu verringern (Buonocore et al., 2010).

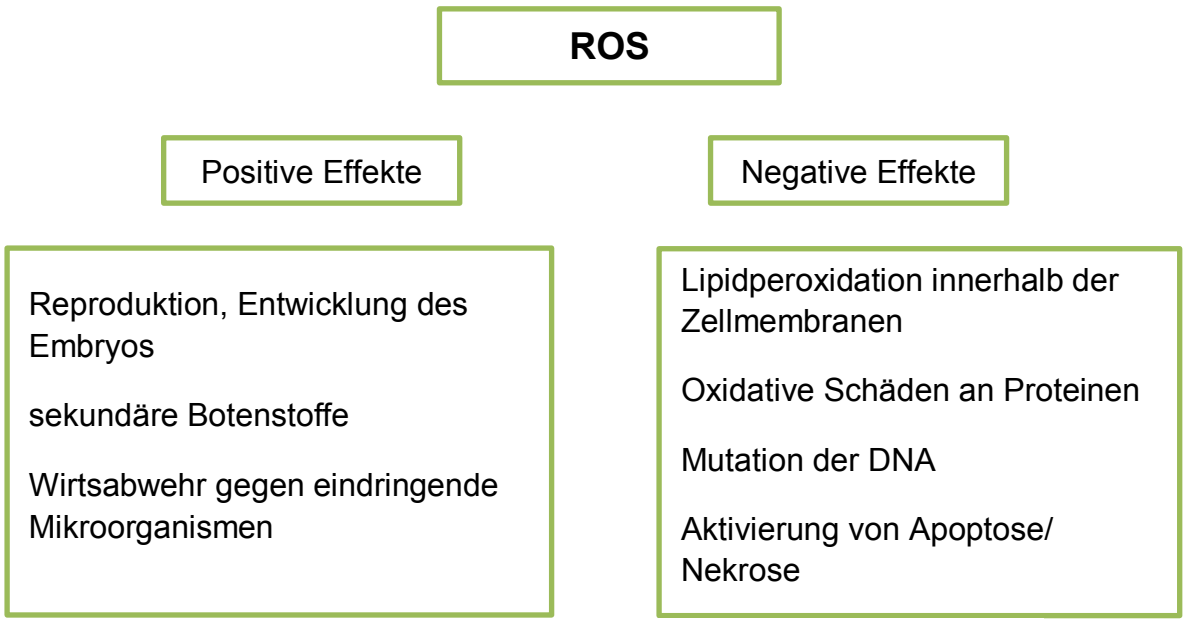

Abbildung 2: Positive und negative Auswirkungen von ROS (modifiziert nach Buonocore et al., 2010)

ROS werden während des normalen Zellstoffwechsels gebildet, sind essentiell für das Leben, können uns vor Infektionen schützen, sind nützlich für die Reproduktion und fetale Entwicklung und spielen als sekundäre Botenstoffe eine physiologische Rolle. ROS sind außerdem an der intrazellulären Regulierung der Kalzium-Konzentration, der Protein-Phosphorylierung und der Aktivierung einiger Transkriptionsfaktoren beteiligt. Auf der anderen Seite können sie den Zelltod durch Apoptose oder Nekrose auslösen, aber auch zu neurodegenerativen Erkrankungen beitragen und Proteine, Lipide und DNA schädigen. Allerdings sind Zellen durch Hochregulierung von Abwehr- und Reparatur-Systemen in der Lage, sich an den Stress anzupassen, wodurch sie möglicherweise, aber nicht völlig, vor Schäden geschützt sind. Der menschliche Körper ist in der Lage, die Balance zwischen ROS und Antioxidantien sehr sorgfältig zu regulieren, aber die ständige Schädigung durch freie Radikale könnte zu einem Zustand der Irreversibilität führen (Buonocore et al., 2010).

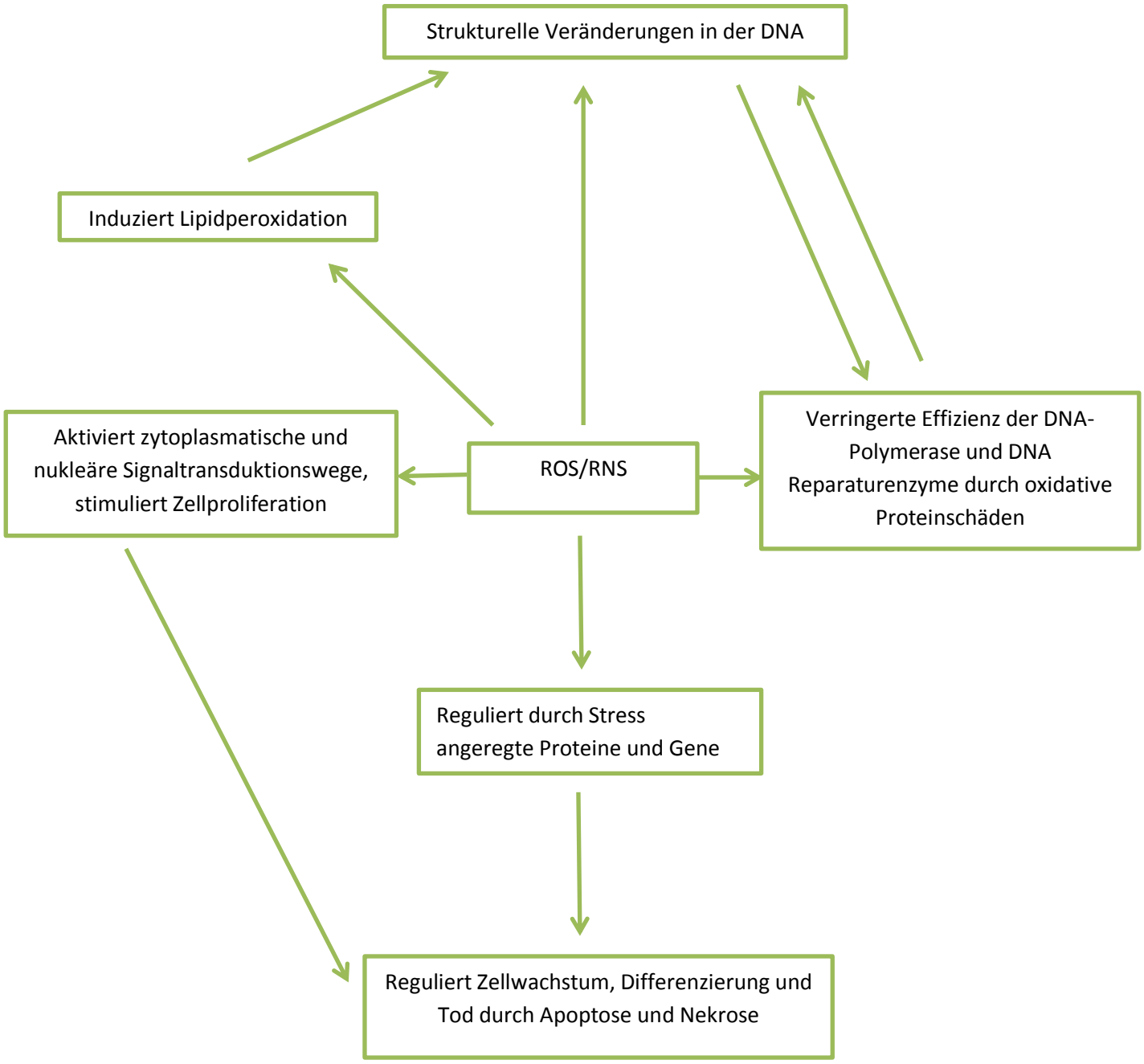

Abbildung 3: Mögliche (krebserregende) Eigenschaften von ROS/RNS (modifiziert nach Wiseman und Halliwell, 1996)

Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies spielen eine Schlüsselrolle bei der Krebsentstehung von Menschen, insbesondere da die Hinweise zunehmen, dass Antioxidantien die Entstehung von manchen Krebsarten verhindern oder verzögern können. ROS und RNS haben gezeigt, dass sie viele Eigenschaften von Karzinogenen besitzen. Die Mutagenese durch ROS/RNS könnte zur Initiierung von Krebs beitragen, zusätzlich zur Bedeutung in der Promotions- und Progressionsphase. Sie können beispielsweise zu strukturellen Veränderungen an der DNA, z.B. Mutationen am Basenpaar, Umlagerungen, Insertion oder

Sequenzamplifikation führen. ROS können zusätzlich zu Punktmutationen auch zu schwerwiegenden chromosomalen Veränderungen führen.
Weiters beeinträchtigen sie die zytoplasmatischen und nuklearen Signaltransduktionswege. Zum Beispiel kann H_2O_2, welches die Zell- und Organellmembranen leicht passieren kann, zur Verdrängung von inhibitorischen Untereinheiten des zytoplasmatischen Transkriptionsfaktors Nuklearfaktor κB führen, wodurch der aktivierte Faktor zum Kern wandern kann. Außerdem sind ROS/RNS in der Lage, die Aktivität von Proteinen und Genen zu regulieren, die auf Stress reagieren und mit Zellproliferation, Differentierung und Apoptose verbunden sind (Wiseman und Halliwell, 1996).

Oxidativer Stress kann zu folgenden Konsequenzen führen:
1. Anpassung: Beispielswiese durch die Überregulierung von antioxidativen Abwehrsystemen. Wenn sich z.B. erwachsene Ratten langsam an erhöhten Sauerstoff gewöhnen, können sie reinen Sauerstoff viel länger tolerieren als Kontrollratten. Vermutlich aufgrund der erhöhten Synthese von antioxidativen Abwehrenzymen und GSH in der Lunge.
2. Gewebsverletzungen: Oxidativer Stress kann bei DNA, Proteinen und Lipiden Schäden verursachen. Oftmals ist es nicht klar, welcher Punkt als Erstes angegriffen wird, da sich die Verletzungsmechanismen weitgehend überlagern. Allerdings kann das Hauptziel variieren. Wenn Säugetierzellen mit H_2O_2 inkubiert werden, kommt es zuerst zu vermehrten DNA-Strangbrüchen, bevor eine Lipidperoxidation oder oxidative Proteinschäden nachweisbar sind.
3. Zelltod: Dies geschieht entweder durch Nekrose oder Apoptose (Halliwell, 2001).

6. Oxidative DNA-Schäden

Die Bausteine der DNA werden Nukleotide genannt. Jedes Nukleotid besteht aus einem Zuckermolekül (Desoxyribose), einer Phosphatgruppe und einer stickstoffhältigen Base. Wenn man den Vergleich mit einer Leiter verwendet, enthalten die Seiten der Leiter die Phosphate und Zuckermoleküle, und die Sprossen die stickstoffhältigen Basen. Diese Basen sind mit den Basen der komplementären Seite der Leiter durch schwache Bindungen verknüpft. Es gibt vier Arten von Nukleotiden innerhalb der DNA, Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin. Diese

Nukleotide binden sich in einer komplementären Art aneinander, demzufolge bindet Adenin immer an Thymin und Guanin immer an Cytosin, sofern kein Schaden auftritt. Es ist daher verständlich, dass so eine komplexe Struktur mit schwachen Bindungen eine Vielzahl von Schwachstellen und entstehenden Schadensformen aufweist.
Es wurden schon etliche Arten von DNA-Schäden identifiziert. Veränderungen an der chemischen Struktur von Basen können zwar nicht die Transkription oder Replikation behindern, verursachen jedoch häufig Fehlkodierungen, die wiederum zur Mutagenese führen. Helixverdrehende Läsionen stören Basenpaarung und normale Transkription und Replikation und entstehen vorrangig durch exogene Quellen. Bei Doppelstrangbrüchen sind beide Seiten der DNA-Helix betroffen und sind daher schwerwiegendere Schäden und eine größere Herausforderung für die Reparatur (Gidron et al., 2006).

Die Toxizität von ROS kommt von der Fähigkeit, mit allen Komponenten des DNA-Moleküls zu reagieren, wodurch Schäden an Purin- und Pyrimidinbasen entstehen. Der Angriff der ROS auf die DNA stellt den ersten Schritt in der Mutagenese, Karzinogenese und dem Altern dar. ROS-induzierte DNA-Schäden sind z.B. Einzel- oder Dopplstrangbrüche der DNA oder Änderungen an Purinen, Pyrimidinen oder der Desoxyribose. DNA-Schäden können ebenso zur Induktion der Transkription oder Signaltransduktionswege, Fehler bei der Replikation und der Genominstabilität führen, von denen alle mit der Karzinogenese assoziiert sind (Buonocore et al., 2010).
Die endogenen Reaktionen, die wahrscheinlich zu den permanenten DNA Schäden beitragen sind Oxidation, Methylierung, Depurinierung und Desaminierung. Die Methylierung von Cytosinen in der DNA ist wichtig für die Regulierung der Genexpression, und normale Methylierungsmuster können während der Karzinogenese verändert werden. Es wurde festgestellt, dass die Umwandlung von Guanin zu 8-Hydroxyguanin die enzymkatalysierte Methylierung von benachbarten Cytosinen verändert, und daher eine Verbindung zwischen oxidativen DNA-Schäden und modifizierten Methylierungsmustern liefert. Dieses 8-Hydroxyguanin ist ein gängiges Ergebnis eines ROS-Angriffs und wird meist als Index für oxidative DNA-Schäden verwendet. Gelegentlich wird es auch als Nucleosid, 8-Hydroxydesoxyguanosin (8-OHdG) gemessen (Wiseman und Halliwell, 1996).

ROS und RNS können auch die mitochondriale DNA schädigen, was bei etlichen Krankheiten und dem Alterungsprozess eine Rolle spielt. Es wird vermutet, dass Mitochondrien die wichtigste intrazelluläre Quelle für ROS darstellen. Es scheint sehr wahrscheinlich, dass die mitochondriale Elektronentransportkette in vivo ROS bildet und dadurch die DNA der Mitochondrien geschädigt wird. In der mitochondrialen DNA sind mehr oxidative DNA-Basenschäden (als 8-OHdG gemessen) vorhanden, als in der DNA des Zellkerns. Dies könnte an der Nähe der mitochondrialen DNA zur Bildung der ROS während des Elektronentransports, dem Fehlen der Histonproteine (die die DNA vor Angriffen schützen würde) oder einer ineffizienten Reparatur liegen, sodass sich die geschädigten Basen in einem hohen Level ansammeln können. Oxidative Schäden könnten auch zur Zerstörung und Mutation der mitochondrialen DNA beisteuern, welche sich mit fortschreitendem Alter, in höherem Maß als in der nukleären DNA, ansammeln. Schaden an der mitochondrialen DNA können bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, aber auch bei Atherosklerose eine Rolle spielen (Wiseman und Halliwell, 1996).

DNA-Schäden können durch einen Reihe von Enzymen repariert werden. DNA von menschlichen Zellen und Geweben enthalten geringe Mengen an Produkten von Basenschäden, was darauf hindeutet, dass diese Enzyme nicht die komplette Entfernung der modifizierten Basen bewirkt, möglicherweise weil sie nahe an der maximalen Kapazität in vivo arbeiten. In Übereinstimmung damit wurde beobachtet, dass der Steady-State von einem oder mehreren Produkten von Basenschäden bei einer Anzahl von chronischen Entzündungserkrankungen, z.B. Hepatitis und rheumatoider Arthritis, mit einem Anstieg der Produktion von ROS/ROS begleitet wurden. Sie waren auch in der isolierten DNA aus einer Biopsie von kanzerösen Tumoren aus humanen Lungen, Kolon, Niere, Brust, etc. vermehrt nachweisbar (Adachi et al., 1995; Malins und Haimanot, 1991; Jaruga et al., 1994; Hagen et al., 1994).
Ein Anstieg von Produkten der DNA-Basenschädigung könnte entweder aufgrund eines Anstiegs an oxidativen Schäden und/oder einer verringerten Reparaturaktivität entstehen. Die erhöhte Schädigung der DNA bei Entzündungen entsteht vermutlich infolge einer gesteigerten Produktion von ROS/RNS, häufig durch die Aktivierung von Phagozyten (Wiseman und Halliwell, 1996).

DNA-Glykosylasen existieren für die Reparatur von etlichen DNA-Basenläsionen, einschließlich oxidierte, methylierte und desaminierte Basen. Es existiert auch ein Reparatursystem für die abasischen Apurin/Apyrimidin (AP) Stellen, die durch spontane Depurinierung produziert werden. Durch ROS/RNS entstandene DNA-Schäden können auch zu multiplen Läsionen, darunter Einzel- und Doppelstrangbrüche, AP-Stellen und modifizierte Pyrimidine und Purine, führen. Die Reparatur dieser Läsionen geschieht vorrangig durch Basenexzisionsreparatur, wenngleich auch die Nucleotidexzisionsreparatur beteiligt sein könnte (Wiseman und Halliwell, 1996).

7. Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Alterung

Eine der am meisten studierten und akzeptierten Hypothesen über die molekulare Basis des Alterns ist die „oxidative stress theorie of aging“. Vor über 50 Jahren wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress, der Lebensdauer und altersbedingten Erkrankungen gibt. Diese Theorie wurde zuallererst von Denham Harman als die „free radical theorie of aging“ entworfen und besagte, dass Sauerstoffradikale eine wichtige Rolle im Alterungsprozess spielen könnten. Später führte er an seiner Theorie eine leichte Veränderung durch, denn er wurde auf die Rolle der Mitochondrien besonders aufmerksam, da diese einen bedeutenden Ort für die Bildung von ROS darstellen. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass die oxidativen Schäden mit dem Alter zunehmen, und dass zahlreiche Formen von ROS dafür verantwortlich sind. Deshalb wurde Harman`s Theorie in „oxidative stress theorie of aging“ umbenannt (Salmon et al., 2010).
Die Basis dieser Theorie ist, dass ein chronischer Zustand von oxidativem Stress in allen Zellen von aeroben Organismen unter normalen physiologischen Bedingungen, durch eine Imbalance zwischen Pro- und Antioxidantien existiert. Diese Imbalance führt dann zu einer Ansammlung von oxidativen Schäden in zellulären Makromolekülen und trägt zu einer fortschreitenden Verschlechterung in zellulären Prozessen bei. Dadurch könnte die Regulation von oxidativem Stress unmittelbar den Alterungsprozess steuern (Salmon et al., 2010).
Wenn man die Theorie sehr streng interpretiert sagt sie voraus, dass eine Reduktion von oxidativem Stress, durch verkleinern der pro-oxidativen Belastung oder Erhöhung der antioxidativen Abwehr oder einer Kombination von beidem, die

Lebensdauer erhöhen sollten. Also würde diese Theorie voraussagen, dass eine lange Lebensdauer mit reduziertem oxidativen Stress korrelieren sollte. Bei den meisten Säugetiermodellen kann die Lebensdauer durch experimentelle Intervention, wie Kalorienreduktion ohne Mangelernährung oder genetische Mutation, verlängert werden. Vor über 80 Jahren zeigte eine Kalorienreduktion ohne Mangelernährung durchwegs eine Verlängerung der Lebensdauer von mehreren unterschiedlichen Tiermodellen, inklusive Mäuse und Ratten. Studien haben meist herausgefunden, dass die lange Lebensdauer assoziiert war mit Kalorienreduktion, auch mit reduziertem oxidativem Stress bzw. Schäden verbunden ist. Viele Studien mit Nagetieren, mit einer Reduktion von Kalorien, zeigten verringerte Werte von oxidierten Proteinen, Lipiden und DNA, kleinere Raten an mitochondrialer ROS-Produktion und erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress, verglichen mit Nagetieren, die nach Belieben gefüttert wurden (Salmon et al., 2010).

Es wurden Versuche zur Identifikation von Mechanismen, die stressbedingter beschleunigter Alterung zugrundeliegen, durchgeführt. Ein wichtiges Ergebnis war, dass die Telomerlänge durch psychologischen Stress und psychische Störungen verringert wird. Ein ähnliches Phänomen ist oxidativer Stress, denn die ständigen Angriffe der ROS auf die DNA gelten als Schlüsselfaktor für das Altern. Insbesondere genotoxischer Stress, durch Oxidation, beschleunigt die Verkürzung der Telomere und aktiviert DNA-schädigende Signalwege. Dadurch steigt das Risiko für zelluläre Alterungsprozesse oder Apoptose, welche als Schlüsselereignis für Alterungsprozesse im Gewebe bekannt sind. Allerdings zeigt eine neuere Meta-Analyse, dass es in verschiedenen Organen von Nagetieren zu einer altersabhängigen Ansammlung an oxidativ geschädigter DNA kommt. Oxidativer Stress wurde auch mit altersabhängigen medizinischen Erkrankungen, wie kardiovaskulären Erkrankungen und Demenz, in Zusammenhang gebracht (Jorgensen et al., 2013).
Telomere sind Nukleoprotein-Komplexe, die die Enden der Chromosomen schützen. Die Proteine, welche die Struktur der Telomere aufrechterhalten, sind für das abtasten, signalisieren und reparieren von DNA-Schäden zuständig. Die Telomerlänge ist teilweise vererbbar und verringert sich bei jeder Replikation von somatischen Zellen, und führt eventuell zur Zellalterung. Die Verkürzung der

Telomere wird durch oxidativen Stress reguliert und auch die individuelle Variation der antioxidativen Abwehrkapazität kann das Ausmaß der Verkürzung beeinflussen. Kürzere Leukozytentelomere sind mit erhöhter Morbidität und Mortaliät durch Herzerkrankungen und Infektionskrankheiten assoziiert, die beide zu einem Rückgang der kognitiven Fähigkeiten führen können (Harris et al., 2006).

Oxidative Veränderungen von intrazellulären Proteinen (beispielsweise der Verlust von Sulfhydrylgruppen (-SH), Bildung von Carbonylen) spielen eine Schlüsselrolle bei der Verursachung von altersassoziierten Verlusten physiologischer Funktionen. Wenn es zu einem oxidativen Schaden an einem spezifischen Protein kommt, vorzugsweise am aktiven Zentrum, kann dies zu einem fortschreitenden Verlust von bestimmten biochemischen Funktionen führen. Der Verlust von -SH Gruppen kann durch ein breites Spektrum an ROS induziert werden und ist eines der häufigsten unmittelbaren Antworten auf ein höheres Level an oxidativem Stress. Funktionale Konsequenzen eines -SH Verlustes inkludiert die Fehlfaltung von Proteinen, verringerte antioxidative Kapazität und den Verlust von gewissen spezifischen Funktionen, wie die Bindung von Schwermetallen und schwefelhaltigen Aminosäuren. Altersabhängige Verluste von -SH wurden an einer Vielfalt von Geweben und Spezies, wie Homogenate von Gehirn, Herz und Skelettmuskeln und Nieren von Nagetieren gemeldet. Die Kalorienrestriktion schwächt den Verlust von -SH ab, wohingegen Hyperoxie den gegenteiligen Effekt zeigt (Sohal, 2002).

Vergleicht man „nach Belieben“ (AL) gefütterte Mäuse mit CR-Mäusen (Kalorienrestriktion), hatten letztere eine um 35% längere Lebenserwartung als die AL Mäuse. Das altersbedingte Ansteigen des Proteincarbonylgehaltes von Homogenaten war bei CR Mäusen deutlich langsamer, als bei AL Mäusen. Ähnlich zeigten Ganzkörperhomogenate von relativ langlebigen transgenen D.melagonaster eine Überexpression von Cu, Zn-SOD und Katalse und eine langsamere Ansammlung von Proteincarbonylen als die Kontrolle. Es wurde schon mehrmals vermutet, dass sich die Schwankungen bei der Anhäufungsrate von oxidativ modifizierten Proteinen in vivo, aus entsprechenden Unterschieden bei der Oxidans-Bildung, antioxidativer Abwehr, Reparatur, verringerter Kapazität oder der Anfälligkeit für oxidative Veränderungen ergeben (Sohal, 2002).

Bei Fliegen beispielsweise führt Hyperoxie oder relativ hohe physische Aktivität zu erhöhter Oxidansbildung und erhöhter Ansammlungsrate von Proteincarbonylen. Vergleiche zwischen verschiedenen Spezies mit unterschiedlicher Lebensdauer deuten auch darauf hin, dass Gewebe der relativ langlebigen Spezies, wie Taube oder Kuh, für radiographisch induzierte Protein-Carbonylierung weniger anfällig sind, als Gewebe von kurzlebigeren Spezies, wie Maus oder Ratte. Zusammenfassend scheint es, dass eine Kombination mehrerer Faktoren die Mengen der Proteinoxidationsprodukte bestimmt (Sohal, 2002).

Die „oxidative stress theorie of aging“ prophezeit, dass Manipulationen, die oxidativen Stress bzw. Schäden verursachen, auch den Alterungsprozess verändern. Mäuse, bei denen das antioxidative Abwehrsystem durch genetische Manipulation verändert wurde, zeigten, mit wenigen Ausnahmen, keine Änderung in der Lebensdauer. Bei diesen knock-out Mäusen zeigte erhöhter oxidativer Stress beschleunigte Pathologie, wohingegen verringerter oxidativer Stress die Pathologie verzögerte. Diese widersprüchlichen Beobachtungen könnten meinen, dass oxidativer Stress, wenn überhaupt, eine sehr begrenzte Rolle beim Alterungsprozess, aber eine Wichtige bei der Gesundheitsspanne spielt, oder die Rolle von der Umwelt abhängt. In einer Umwelt mit geringem Stress, wie unter optimalen Bedingungen zu erwarten ist, spielt oxidativer Stress kaum eine Rolle beim Altern. Jedoch spielt oxidativer Stress bzw. Schaden bei chronischem Stress eine wichtige Rolle bei der Alterung. Unter diesen Umständen übt eine verstärkte antioxidative Abwehr einen antiaging Prozess aus, der zu Veränderungen in der Lebensspanne, altersbezogener Pathologie und physiologischen Funktionen führt (Salmon et al., 2010).

8. Effekte von psychologischen Faktoren auf die DNA bzw. ROS

Studien, die Effekte von psychologischem Stress auf die Produktion von ROS untersuchten, ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Eine Studie fand heraus, dass akuter psychologischer Stress die Produktion von ROS bei gesunden Personen reduziert, während es die kardiovaskuläre Reaktion erhöht. Im Gegensatz dazu demonstrierten Bagchi et al., dass akuter und chronischer psychischer Stress zu einem beständigen Anstieg von Hinweisen für ROS (Hydroxylradikale, Superoxidanione) bei Ratten führt. Im Einklang mit dieser Studie fanden Lesgards et

al. heraus, dass eine kombinierte Messung von Stress bei der Arbeit und zu Hause mit einer geringeren antioxidativen Aktivität beim Menschen verbunden ist (Gidron et al., 2006).

8.1 Tierversuche

Adachi et al. wollten den reinen Effekt von psychischem Stress auf die DNA-Integrität, unter Verwendung eines konditionierten emotionalen Stressmusters und Messung von 8-Hydroxy-2-Desoxyguanosin (8-OHdG) untersuchen. Dies untersuchte er mit unterbrochenen elektrischen Schocks und zwei Gruppen von männlichen Ratten, „Respondern“ und „Sendern“. Die Sender reagierten auf die Schocks (akustischer, olfaktorischer und visueller Ausdruck), was als konditionierte emotionale Reize für die Responder diente. Sie fanden heraus, dass eine einmalige Exposition mit einem konditionierten emotionalen Reiz nicht mehr DNA-Schäden hervorbringt, während zwei bis vier Expositionen mehr DNA-Schäden als in der Kontrolle ergaben. Während das Level von 8-OHdG nach ein bis drei Stunden später wieder zu dem der Kontrollen zurückkehrte, stiegen sie nach sechs bis achtzehn Stunden, nach Exposition mit dem emotionalen Reiz, wieder signifikant höher an als bei der Kontrolle. Dies weist darauf hin, dass eine solche Belastung langfristige Auswirkungen auf die DNA-Integrität hat (Gidron et al., 2006).

In einem Experiment von Fischman et al. wurde der Effekt von Stress auf unvorhergesehende DNA-Synthese in Blut-Lymphozyten getestet. Die Lymphozyten von Ratten, die unterbrochenen Fußschocks ausgesetzt wurden, hatten höhere Werte an unvorhergesehener DNA-Synthese als die Lymphozyten der ungestressten Kontrollgruppe. Dies zeigte, dass unvorhergesehende DNA-Synthese als Antwort auf den Schaden, durch psychischen Stress durch Fußschocks, auftritt. Fischman et al. zeigten, dass mehrere Arten von Stress DNA-Schäden hervorrufen und dass die Art des DNA-Schadens von der Art der Belastung abhängen könnte. Basierend auf den Ergebnissen aus den Tierversuchen wurde geschlussfolgert, dass psychologischer Stress zu DNA-Schäden führen kann (Gidron et al., 2006).

8.2 Humanstudien

Forlenza et al. hatten die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) nach Exposition von Lymphozyten in vitro mit UV-Licht an 19 gesunden Studenten gemessen. Von diesen Personen hatten nur 14 vollständige Daten zu Perioden mit geringem (nach Erholung/Urlaub) und hohem Stress (Prüfungen) angegeben. Die Reparatur wurde anhand unvorhergesehender DNA-Synthese gemessen. Die Proben der Teilnehmer wurden in 10% autologem Serum inkubiert, welches Stresshormone und andere immunologische Faktoren enthält, die für die DNA-Reparatur möglicherweise relevant sind und die neuroimmunologischen Eigenschaften der Teilnehmer reflektiert. Während der stressigen Phase wurde vermehrte NER als in der nachfolgenden Erholung gemessen und auch während dem Stress, wenn die Lymphozyten keinem UV-Licht ausgesetzt waren, war die NER höher. Daher folgerten die Autoren, dass die stressvolle Zeit für sich allein größere DNA-Schäden verursacht, welche wiederum eine höhere Reparaturantwort auslösen.
Eine neuere Studie untersuchte den Effekt von Prüfungsstress auf diverse Ergebnisse, inklusive DNA-Schäden (gemessen mit Comet Assay), Rate der Lipidoxidation und Level an Antioxidantien bei Studenten. Sie fanden signifikant höhere Konzentrationen von DNA-Schäden in Lymphozyten, schnellere Oxidation von Lipiden und weniger Antioxidantien am Abend vor der Prüfung, als in einer nicht-stressigen Periode. Es gab auch eine signifikante umgekehrte Korrelation zwischen der antioxidativen Konzentration und DNA-Schäden, aber nur während der stressigen Zeit. Diese Studie besagt, dass während Zeiten mit psychischem Stress der mögliche Effekt von mobilisierenden Antioxidantien für die Verminderung von DNA-Schäden stärker war, als während nicht-stressigen Perioden (Gidron et al., 2006).

Die oben genannten Studien deuten darauf hin, dass es unter verschiedenen Umständen, Spezies und menschlichen Kulturen einen Zusammenhang zwischen unterschiedlichen psychologischen Faktoren und DNA-Schäden gibt, und auch gewisse Parallelen bei Tier- und Humanstudien. Studien, die mit Tieren durchgeführt wurden zeigten, dass wiederholter Stress zu DNA-Schäden führt.
Keine der Studien betrachtete die internen Ressourcen oder hindernden Variablen und ihre Beziehung zu DNA-Schäden. Zukünftige Studien sollten die Effekte von Persönlichkeitsvariablen, protektiven Faktoren wie Widerstandsfähigkeit oder

Kohärenzgefühl und ungünstige Effekte wie Feindseligkeit oder eine negative Art untersuchen (Gidron et al., 2006). Sehr wenige Studien testeten den Zusammenhang zwischen äußeren Hindernissen und DNA-Schäden, aber eine Studie fand eine Verbindung zwischen einer schlechten Beziehung zu den Eltern und DNA-Schäden (Irie et al., 2002). Mehrere Studien fanden auch zwischen bestimmten psychologischen Faktoren wie Angst, Depression, Wut und DNA-Schäden eine Verbindung (Irie et al., 2001a). Angesichts des Querschnitts- und Korrelationsdesigns dieser Studien ist es unmöglich zu unterscheiden, ob DNA-Schäden eine Ursache oder Folge für solche psychologischen Ereignisse sind oder einfach ein begleitendes Ergebnis (Gidron et al., 2006).
Der Zusammenhang war bei etlichen der humanen Studien geschlechterspezifisch. Bei Frauen waren negative Gemütslage, Anspannung und ineffektive stressbewältigende Strategien, psychischer Stress bei der Arbeit und wenig Aussicht auf Stressverminderung mit höheren DNA-Schäden verbunden. Bei Männern wurde die Integrität der DNA möglicherweise nachteilig beeinträchtigt, wenn sie im letzten Jahr einen Trauerfall erlitten, sich selbst Vorwürfe machten oder ein hohes Arbeitspensum wahrgenommen hatten (Rollnik et al., 2003).
Dies deutet darauf hin, dass qualitativ unterschiedliche und mehr psychische Faktoren mit DNA-Schäden bei Frauen assoziiert waren, als bei Männern. Es wurde spekuliert, dass evolutionäre Prozesse zu einer unterschiedlichen Empfindlichkeit des menschlichen Genoms auf diverse Umweltanforderungen führten. Es ist möglich, dass die Evolution, um eine stabile (traditionelle) kinderpflegende Funktion zu erhalten, die Frauen empfindlicher gegenüber einer größeren Vielfalt von Umwelt (und psychischen) Stressoren machte, welche ihre DNA-Integrität beeinflussen könnten, um entsprechende schützende Reaktionen zu übernehmen. Alternativ könnte auch der unterschiedliche Umgang von Frauen und Männern mit Stress für die Geschlechterunterschiede verantwortlich sein (Gidron et al., 2006).

Viele Studien prüften einen Zusammenhang zwischen psychischen Faktoren und DNA-Schäden, hervorgerufen durch oxidativen Stress. Jedoch erscheinen die Auswirkungen von Stress auf die ROS-Produktion widersprüchlich (Gidron et al., 2006). Mehrere Studien haben herausgefunden, dass akute psychische Belastung etliche Indizien für oxidativen Stress reduziert (Atanackovic et al., 2002). Zusätzlich führt akuter mentaler Stress (z.B. eine Rede halten) zu einer Erhöhung oxidativer

Metaboliten von Bilirubin, einem Antioxidans, welches positiv mit wahrgenommenem Stress korreliert (Yamaguchi et al., 2002). Es ist möglich, dass dieser Stress zu vermehrtem oxidativen Stress führt, welcher dann als Ausgleich eine antioxidative Anwort hervorruft (Gidron et al., 2006).
Im Einklang mit Atanackovic et al. wurde herausgefunden, dass Stresshormone wie Cortisol, ROS reduzieren. Im Gegensatz dazu fand man heraus, dass eine kombinierte Messung von Stress bei der Arbeit und zu Hause mit einer geringeren antioxidativen Aktivität assoziiert war und dass bei Ratten akuter und chronischer Stress zu einer vermehrten ROS-Produktion führt. Angesichts der widersprüchlichen Auswirkungen von Stress auf die ROS-Produktion bleibt es unklar, ob die direkten Effekte von Stress auf die DNA-Integrität von der ROS-Produktion stammen. Ein alternativer biologischer Weg, der psychische Faktoren mit durch oxidativen Stress induzierten DNA-Schäden verbinden könnte, ist die Aktivität von pro-inflammatorischen Zytokinen (beispielsweise Interleukin-6 oder Interferon-Gamma). Es wurde herausgefunden, dass diese üblicherweise während psychischem Stress erhöht sind und oxidativen Stress induzieren bzw. Antioxidantien hemmen und dadurch zu vermehrten Schäden an der DNA führen (Gidron et al., 2006).

Cortisol stellt einen potentiell wichtigen Mechanismus zwischen chronischem Stress und beschleunigter Alterung dar. Wenn Ereignisse als stressig empfunden werden und besonders wenn der Stressor negative Effekte oder soziale Gefahr hervorruft (Dickerson und Kemeny, 2004), könnte dies eine erhöhte Cortisolsekretion auslösen, welche wiederum die metabolische Energie mobilisiert um den Stressor bewältigen zu können (Kirschbaum et al., 1993).
Die mit chronischem Stress verbundenen Veränderungen der Biomarker werden oft als Anzeichen für den „Verschleiß“ des Körpers interpretiert. Eine alternative Interpretation ist, dass Veränderungen nicht den Verlust von Ressourcen, sondern eine Umverteilung darstellen. Chronischer Stress gestaltet die Struktur des Zentralnervensystems um und bietet eine anatomische Grundlage für Veränderungen in der Dynamik von Stresshormonen. Diese Änderungen könnten eine „beabsichtigte“ Optimierung der Funktionen des neuroendokrinen Systems darstellen, welches bedauerliche Nebeneffekte hat. Das bedeudet, die Optimierung steigert kurzzeitig die Kapazitäten für effiziente Reaktionen auf Stress, während es langfristig die Anfälligkeit für altersbedingte Erkrankungen erhöht. Von dieser Seite

betrachtet, kann die erhöhte Cortisolreaktivität an sich keine Störung oder Versagen des Systems sein, aber eine Anpassung, um eine anspruchsvolle Umwelt bewältigen zu können, welche kurzzeitig Vorteile fürs Überleben hat, aber langfristig negative Konsequenzen für gesundes Altern.
Letztendlich unterstützen diese Daten die Aussage, dass chronischer, psychischer Stress die Schäden fördern und das Risiko für Krankheiten erhöhen könnte, wohingegen „überschaubarer“ Stress die Belastbarkeit und Widerstandsfähigkeit gegenüber Krankheiten unterstützen könnte (Aschbacher et al., 2013).

9. Prinzip des Comet Assay

Die Einzelzell-Gelelektrophorese oder Comet Assay ist eine schnelle, einfache, sensitive, zuverlässige und einigermaßen preiswerte Methode, um DNA-Schäden zu messen (Collins et al., 1997). Zudem wird es aber auch für Genotoxizitäts-Tests, humanes Biomonitoring und molekulare Epidemiologie verwendet (Collins, 2004) und ist ein unschätzbares Hilfsmittel zur Erforschung grundlegender Aspekte von DNA-Schäden (Collins et al., 1997) und deren Reparatur (Collins, 2004). Der Comet Assay beruht auf der Fähigkeit von negativ geladenen DNA-Fragmenten, durch ein Agarosegel, in Reaktion auf ein elektrisches Feld, zum Pluspol zu wandern. Das Ausmaß der DNA-Migration hängt direkt von der DNA-Schädigung der Zelle ab (Tice et al., 2000).

Beim Comet Assay, wie er zurzeit praktiziert wird, wird die DNA bei hohem pH-Wert, vor und während der Elektrophorese, inkubiert. In der Theorie findet die Lockerung der „supercoiled“ DNA Schleifen von Einzelstrangbrüchen bei neutralem sowie auch bei alkalischem pH statt. In der Praxis wurde dies von Ostling und Johanson bestätigt (Collins et al., 1997). Die Lyse von Zellen bei einer hohen Salzkonzentration, das DNA „unwinding“ und die Elektrophorese werden bei einem spezifischen pH-Wert durchgeführt. Das Entwinden der DNA und Elektrophorese bei neutralem pH-Wert erleichtert die Detektion von Doppelstrangbrüchen und „cross links“. Bei einem pH-Wert von 12,1 bis 12,4 werden Einzel- und Doppelstrangbrüche, unvollständige Exzisions-Reparaturstellen und “cross links” erkannt. Wenn der pH-Wert höher als 12,6 ist, kann man zusätzlich zu allen vorherig genannten auch alkalilabile Stellen erfassen (Miyamae et al., 1997). In einem elektrischen Feld wandert die DNA aus der

Zelle in Richtung Anode und erscheint so als „Komet“. Die Größe und Form des Kometen sowie die Verteilung der DNA innerhalb des Kometen korreliert mit dem Ausmaß der DNA-Schädigung (Fairbairn et al., 1995).

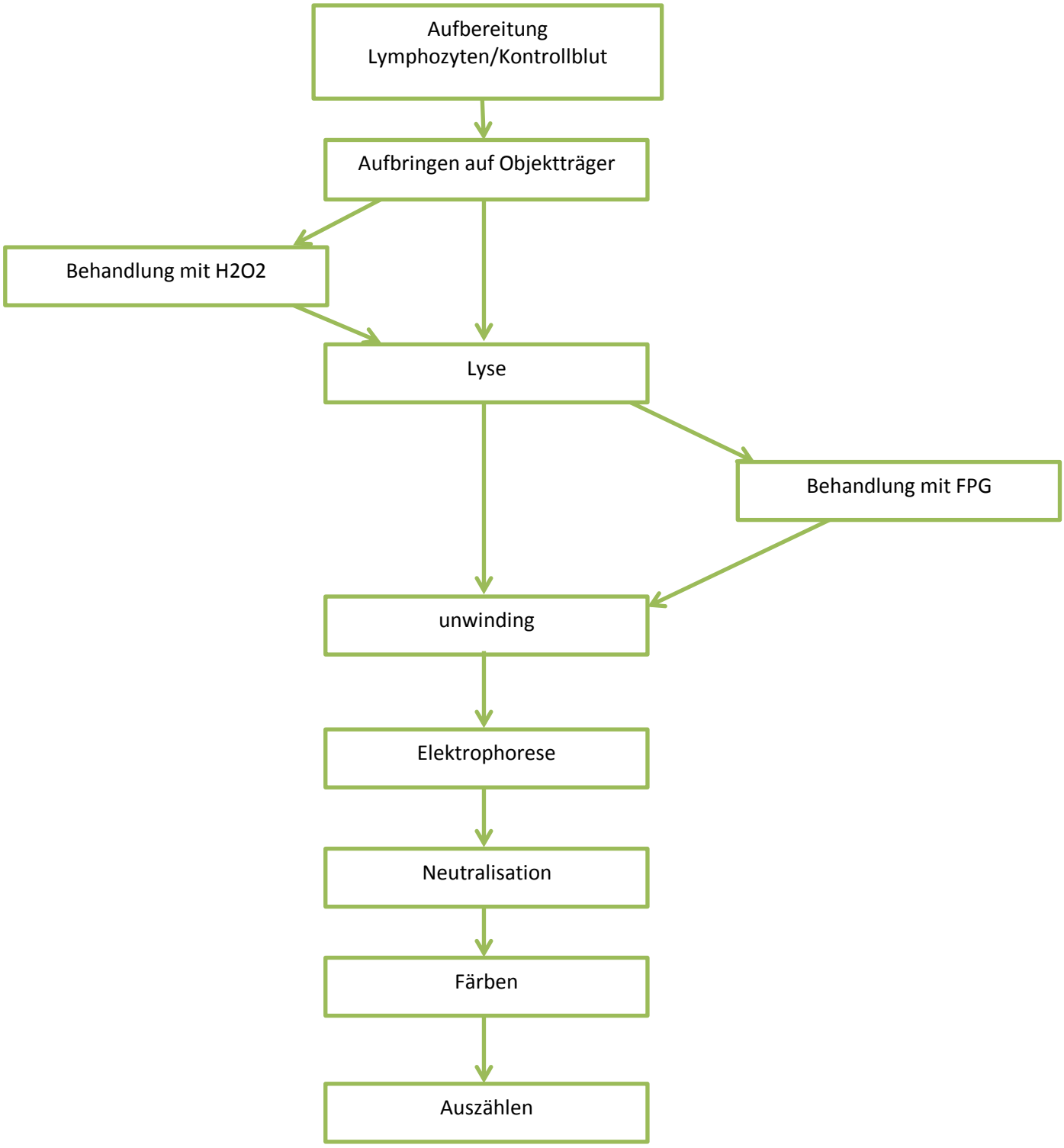

Abbildung 4: Einzelne Schritte bei der Durchführung des Comet Assay

Die nach der Elektrophorese entstehenden „Bilder“ sind unterschiedlich, denn durch die Verwendung von Alkali werden die Kometenschweife ausgeprägter und erweitern den nutzbaren Bereich der Schäden, die nachgewiesen werden können (Collins, 2004). Unter neutralen Bedingungen sind maximal 25% der DNA im Schweif, wohingegen es unter alkalischen Bedingungen 90% oder mehr sein können. Wenn es jedoch um die Sensitivität bei einer geringen Anzahl an Strangbrüchen geht, sind beide Methoden ähnlich. Nach der alkalischen Elektrophorese werden die Objektträger „neutralisiert“. Während die DNA im Schweif einzelsträngig bleibt, ist es der DNA im Kopf möglich, sich wieder aneinanderzulagern und erscheint so doppelsträngig, wenn sie mit Acridinorange gefärbt wird. Diese Aneinanderlagerung ist zu erwarten, wenn die DNA im Kopf aus intakten „supercoiled“ Schleifen besteht. Die Stränge mit gelockerten und gebrochenen Schleifen im Schweif können sich im Gegensatz dazu im Alkali auftrennen, sodass die Wiedervereinigung sehr unwahrscheinlich ist (Collins et al., 1997).

Mit den Objektträgern können unterschiedliche Parameter nachgewiesen werden. Der als „Lyse“ gekennzeichnete Objektträger zeigt lediglich Strangbrüche, inklusive alkalilabile Stellen. Der als „Puffer“ benannte Objektträger zeigt die Strangbrüche und zusätzlich jegliche Brüche, die während der Inkubation mit dem Reaktionspuffer auftreten. Dieser Objektträger gilt auch als Kontrolle für die mit Enzymen inkubierten Zellen, welche zusätzlich oxidierte Purine (FPG) oder Pyrimidine (Endo III) aufzeigen. Um also die wirkliche Anzahl der FPG-sensitiven Stellen bestimmen zu können, wird die Differenz zwischen dem Enzympuffer und dem FPG berechnet.
Die enzymatische Modifikation des Comet Assay wurde an verschiedenen Zelltypen, wie Primärkulturen, Zelllinien und Lymphozyten durchgeführt. Humane Lymphozyten können einfach gesammelt werden und sie repräsentieren vermutlich den Gesamtstatus des Körpers wieder. Sie werden beim Comet Assay auch dazu verwendet, die Exposition des Menschen gegenüber genotoxischen Substanzen, als Resultat von Berufstätigkeit, medikamentöser Behandlung, Erkrankung oder Umweltverschmutzung zu überprüfen (Azqueta et al., 2009).
Bevor man die aufbereiteten Zellen weiter verwendet, prüft man sie auf ihre Lebensfähigkeit. In vielen Laboren ist es Routine, diese mit Zugabe von Trypanblau (zur Zellsuspension) durchzuführen. Zellen, die den Farbstoff aufnehmen, sind ausgesprochen lebensunfähig, wohingegen lebensfähige Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen. Eine hohe „viability“ wird von vielen als Voraussetzung für den Comet

Assay betrachtet. Allerdings zeigt Trypanblau nur an, ob die Zellmembran intakt ist und nicht, ob die Zelle lebensfähig ist (Collins, 2004).

Nach Aufbereitung der Lymphozyten werden diese mit Hilfe von Agarose auf, mit Agarose beschichtete, Objektträger aufgetragen und für mindestens eine Stunde in die Lyse gestellt (Tice et al., 2000). Dieser Vorgang dient dazu, dass Membran, Zytoplasma und Nucleoplasma entfernt werden und die DNA als Nucleotid zurückbleibt (Collins, 2004).
Ein Teil der Zellen wird davor aber noch mit Wasserstoffperoxid behandelt. Damit misst man die Empfindlichkeit der DNA gegenüber exogenen Schäden. Die Messung von DNA-Strangbrüchen gibt nur begrenzte Informationen, denn die Brüche repräsentieren möglicherweise den direkten Effekt von manchen schädigenden Stoffen, werden aber üblicherweise rasch wieder repariert. Dies könnten Apurin/Apyrimidin-Stellen sein, welche alkalilabil sind und daher als Brüche aufscheinen. Um die Analyse spezifischer und sensitiver zu machen, wird zusätzlich die Verdauung der Nucleotide mit einem Enzym durchgeführt, das eine bestimmte Art von Schaden erkennt und einen Bruch erzeugt. Die Endonuklease III (Endo III) wird zum Nachweis von oxidierten Pyrimidinen verwendet und Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) zur Erkennung des Hauptoxidationsproduktes, 8-Oxoguanin, ebenso wie für andere veränderte Purine genutzt (Collins, 2004).

Damit die DNA-Struktur freigelegt werden kann, werden die Zellen in der Elektrophorese mit dem alkalischen Elektrophoresepuffer vollständig bedeckt und verbleiben dort für 20 Minuten. Dadurch erhält man aus der Doppelhelix der DNA einzelsträngige DNA und außerdem werden die alkalilabilen Stellen als Einzelstrangbrüche sichtbar. Nach diesem Schritt wird die Elektrophorese mit demselben Puffer eingeschalten, wodurch die negativ geladenen Bruchstücke der DNA zum Pluspol wandern und somit Kometen entstehen. Nach der Elektrophorese werden die Objektträger in einem entsprechenden Puffer bzw. destilliertem Wasser neutralisiert (Tice et al., 2000). Es ist meist nicht durchführbar, die Objektträger gleich nach der Durchführung des Comet Assays auszuzählen. Wenn sich die Gele auf normalen Objektträgern aus Glas befinden, können diese getrocknet und unbegrenzt gelagert werden. Getrocknete Gele sind leichter auszuzählen, da sich die Kometen auf derselben Ebene befinden (Collins, 2004).

Die DNA wird durch ein Fluoreszenzmikroskop, nach vorheriger Färbung mit einem DNA-bindenden Farbstoff sichtbar gemacht. Der am häufigsten verwendete Farbstoff ist Ethidiumbromid, welches ein interkalierender Farbstoff ist, welcher sich effizienter an doppel- als an einzelsträngige DNA bindet. Die Auswahl der Kometen ist sowohl für die computerbasierte als auch für die visuelle Analyse ein Problem. Die Kometen müssen ohne Voreingenommenheit ausgezählt werden und sollen das gesamte Gel repräsentieren. Deshalb ist es nötig, das Gel systematisch abzusuchen. Die Ränder, sowie Bereiche um Luftblasen sollen vermieden werden, da sich dort oft Kometen mit einem hohen Schaden befinden. Kometen die sich überlappen (meist solche mit langem Schweif), kann man auch nicht auszählen. Wichtig ist auch, dass das Gel nicht zu dicht mit Zellen vollgepackt ist. Die empfohlene Anzahl auf einem Gel ist ca. 2×10^4 (Collins, 2004), und wir verwendeten 1×10^6 Zellen pro Gel.

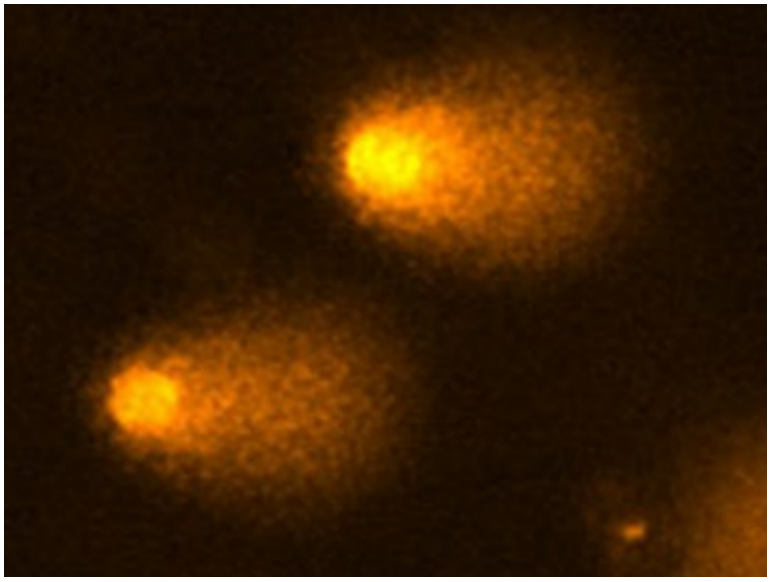

Abbildung 5: DNA-Schäden als Kometen sichtbar (Lamy, 2008)

Die meist genutzten Parameter bei der Analyse sind „tail length“, relative Fluoreszenz-Intensität von Kopf und Schweif (üblicherweise in Prozent der DNA im Schweif ausgedrückt) und „tail-moment“. Die „tail length“ ist nicht sehr nützlich, da sie nur die Länge des Schweifs angibt, nicht aber die Menge der DNA-Bruchstücke. Die relative Schweif-Intensität ist der nützlichste Parameter, da sie eine lineare Beziehung zur Bruch-Häufigkeit hat, verhältnismäßig unbeeinflusst von Grenzwerten ist und eine Unterscheidung von Schäden über den weitest möglichen Bereich

erlaubt (in der Theorie von 0 bis 100 % DNA im Schweif). Außerdem gibt es einen klaren Hinweis darauf, wie die Kometen tatsächlich aussehen. Der dritte Parameter, „tail moment“ (eigentlich das Produkt von Schweiflänge und Anteil der DNA im Schweif) ist nicht linear in Bezug auf die Dosis und gibt keine Auskunft über das Aussehen der Kometen (Collins, 2004).

10. Material und Methoden

10.1 Studiendesign

Im Rahmen der Forschungsplattform „Active Ageing“ wurde für 18 Monate eine beobachterblinde, randomisierte Interventionsstudie in Zusammenarbeit mit dem Kuratorium Wiener Pensionisten-Wohnhäuser durchgeführt. Bei dieser Studie arbeiteten Personen des Departments für Ernährungswissenschaften, der Pharmakognosie sowie den Sportwissenschaften zusammen. Das Ziel war es herauszufinden, ob Ernährungs- und Trainingsinterventionen bei institutionalisierten Pensionisten einen Einfluss auf Gesundheit, Mobilität und Lebensqualität haben. Teilgenommen haben zu Beginn der Studie 117 Pensionisten im Alter von 65 bis 98 Jahren (Durchschnittsalter 83 Jahre) aus 5 Wohnheimen – Leopoldau, Atzgersdorf, Mühlengrund, Trazerberg und Hohe Warte.

Für die Aufnahme in die Studie waren folgende Einschlusskriterien zu erfüllen.

- Ein Mindestalter von 65 Jahren
- Beim „mini-mental state“ Test eine Mindestpunktezahl von 23
- Mindestens 4 Punkte bei „short physical performance battery“
- Eine Strecke von 10 Metern ohne Hilfsmittel gehen

Ausgeschlossen wurden Personen mit chronischen Krankheiten, manifester Osteoporose und die Einnahme cortisonhaltiger Medikamente und Antikoagulantien. Ebenso war die Durchführung eines Krafttrainings, mehr als 1-mal pro Woche, während der letzten 6 Monate ein Ausschlussgrund.

Es wurden regelmäßig zu Beginn, nach 3, 6, 12 und 18 Monaten verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Den Probanden wurden Blut, Urin und Mundschleimhaut entnommen, Ultraschall- oder Magnetresonanzuntersuchungen

und Muskelbiopsien vorgenommen und es haben auch Krafttests und funktionelle Tests, betreffend ihrer körperlichen Leistungsfähigkeit, stattgefunden.

Die teilnehmenden Personen wurden auf insgesamt drei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe machte Krafttraining, die Zweite Krafttraining und eine Ernährungsintervention und die dritte Gruppe war die Kontrolle. Diese absolvierten ein Gedächtnistraining, um die Compliance zu erhöhen und den Einfluss von sozialen Kontakten zu berücksichtigen.

Abbildung 6: Interventionsgruppen

10.2 Trainingsintervention

Das Training wurde nach den Richtlinien der Österreichischen Sportwissenschaftlichen Gesellschaft und des American College of Sport Medicine gestaltet. Es wurde in Kleingruppen mit maximal 15 Personen, zwei Mal pro Woche für je 50 Minuten trainiert. In den ersten sechs Monaten wurde zwei Mal pro Woche unter Aufsicht trainiert, in den nächsten sechs Monaten einmal mit und einmal ohne Aufsicht und in den letzten sechs Monaten trainierten die Pensionisten eigenständig. Das Training wurde in 3 Einheiten unterteilt:

- 10 Minuten dauernde Aufwärmphase mit Balancetraining
- 30 Minuten dauernde Phase für Stabilisationsübungen mit dem eigenem Körpergewicht, Theraband oder Sessel mit steigender Intensität. Trainiert werden vor allem Arme, Schultern, Brust, Rücken, Bauch und Beine.
- 10 Minuten für Entspannungsübungen

10.3 Ernährungsintervention

Die Trainings- und Ernährungsgruppe erhielt in den ersten sechs Monaten zusätzlich zum Training noch das diätetische Lebensmittel FortiFit der Firma Nutricia. Die Pensionisten bekamen zusätzlich zu ihrer normalen Ernährung täglich zum Frühstück

und unmittelbar nach dem Training eine Portion FortiFit. Das ist ein pulverförmiges Supplement, das noch mit Wasser verrührt werden muss. Es enthält Vitamine, Mineralstoffe, essentielle Aminosäuren (Leucin) und Proteine (Nutricia, 2010).
Mit zunehmendem Alter kommt es zum Abbau von Muskelmasse und -kraft, einer sogenannten Sarkopenie. Dies ist ein Syndrom, das zu körperlichen Einschränkungen, verringerter Lebensqualität und sogar zum Tod führen kann (Cruz-Jentoft et al., 2010).
Bewegung in Kombination mit adäquater Protein- und Energieaufnahme sind wichtige Komponenten für die Prävention und das Management von Sarkopenie. Die alleinige Supplementierung von Proteinen würde nur den Verlust von Muskelmasse verringern. Die ausreichende Aufnahme von Proteinen (angereichert mit Leucin) könnte außerdem die Muskelkraft verbessern und Vitamin D ist für die Aufrechterhaltung der Muskelfunktion von Bedeutung (Morley et al., 2010).

10.4 Gedächtnistraining für die Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe hat im ersten halben Jahr zwei Mal pro Woche mit Unterstützung trainiert. In den nächsten sechs Monaten haben die Pensionisten einmal selbstständig und einmal mit Hilfe und in den letzten sechs Monaten nur noch selbstständig geübt. Die Pensionisten bekamen von den Verantwortlichen verschiedene Übungsblätter, konnten aber auf Wunsch auch eigene mitbringen. Es wurden Übungen zu Wahrnehmung, Enkodierung, Dekodierung, Entspannung, Bewegungsübungen und Spiele durchgeführt.
Die Übungen wurden nach den Grundsätzen des Ganzheitlichen Gedächtnistrainings ausgeführt. Dabei werden alle Leistungen des Gehirns, wie Konzentration, Merkfähigkeit, logisches Denken, Erinnerungsvermögen, usw. trainiert (Prang, 2012). Überdies werden die Sinne mit einbezogen, die Kommunikation gefördert und Entspannung berücksichtigt. Durchgeführt werden die Übungen spielerisch, ohne Leistungsdruck und Stress (Roland, 2010). Am wirksamsten ist das Gedächtnistraining, wenn man es mit körperlichem Training bzw. Bewegung verknüpft, da das Gehirn besser durchblutet wird und so mehr Sauerstoff bekommt. Der Hirnforscher Gerd Kempermann stellte bei aktiven Mäusen eine Vermehrung von Synapsen zwischen den Neuronen fest, wodurch die Mäuse eine verbesserte Lernleistung zeigten (Prang, 2012).

10.4.1 Durchgeführte Übungen

Ultrakurzzeitgedächtnis (sensorischer Speicher) - Wahrnehmung

1. optische und visuelle Aufgaben (z.B. Puzzles, Unterschiede erkennen)
2. akustische Aufgaben (Geräusche, z.B. von Küchengeräten erkennen)
3. olfaktorische Aufgaben (z.B. Kräuter und Gewürze erkennen)
4. taktile Wahrnehmung (z.B. identifizieren von Gegenständen)

Kurzzeitgedächtnis - Enkodierung

Für die Verankerung von Informationen

Interne Gedächtnisstrategien: wiederholen, visualisieren, assoziieren, gruppieren, ordnen sowie Mnemotechniken (z.B. Eselsbrücken, Loci-Technik, Zahlensymbole).

Die externe Gedächtnisstrategie wäre, wenn man Kalender oder Listen als Merkhilfen verwendet.

Langzeitgedächtnis - Dekodierung

1. Wortfindung (z.B. Buchstabengerüste, Anagramme)
2. Abrufübungen (z.B. Sprichwörter, Redewendungen, Gegensätze)
3. Überlegen/Entscheiden (z.B. Unterschiede und Gemeinsamkeiten von Begriffen, Antwortalternativen)

Es wurden auch Übungen für die Konzentration (Wörter-, Zahlensuche, ungewohnte Textformatierungen) und für die Kreativität (Geschichten erfinden, vorgegebene Formen ersetzen) durchgeführt und gehören zu allen oben genannten drei Bereichen. Des Weiteren wurden Fingerübungen (z.B. gegengleiche Bewegungen), Bewegungsspiele (z.B. Darstellende, Vertrauens-, Ball-, Geschicklichkeitsspiele) und Gleichgewichtsübungen im Sitzen, sowie Entspannungs- und Aktivierungsübungen (z.B. Fantasiereisen oder Autogenes Training) ausgeübt.

10.5 Veränderungen im Alter

Obwohl eine Vielzahl an Faktoren des Alterns von den Genen abhängig ist, behaupten GerontologInnen, dass das Fortschreiten der Alterung durch einen gesunden, aktiven Lebensstil mit Bewegung, gesunder Ernährung und sozialen

Kontakten, etc. verlangsamt werden kann. Beispielsweise kann die Leistungsfähigkeit von Herz und Gefäßen sowie die Muskelkraft durch regelmäßige Bewegung erhalten oder sogar erhöht werden. Dies kann vor allem die aktive Lebenszeit verlängern. Dasselbe gilt auch für die geistigen Fähigkeiten, denn wenn das Gedächtnis beständig trainiert wird, kann dessen Leistung verbessert werden. Aber auch körperliches Training und ein gesunder Lebensstil haben einen positiven Einfluss auf die kognitiven Fähigkeiten (Arbeitsgemeinschaft des Mindwellness-Projekts, 2010). Je älter man wird, desto mehr verändert sich die Leistungsfähigkeit der kognitiven Funktionen. Es kommt zu Problemen bei der Aufmerksamkeit, Lösung von Problemen und dem Gedächtnis, und es wird schwieriger, sich neue Information zu merken und sich an diese zu erinnern. Im Gegensatz dazu gibt es auf den Zugriff von erarbeitetem Wissen im Alter keine Probleme (Kliegel et al., 2003).

Das Gedächtnis und Lernen wird in drei Phasen unterteilt, in Enkodierung, Speicherung und dem Abruf der Informationen. Zuerst gelangt die aus der Umwelt stammende Information in einen sensorischen Speicher (Kliegel et al., 2003), wo sie für nur 3 Sekunden festgehalten wird. Wenn die Information während dieser Zeit nicht in das Kurzzeitgedächtnis gelangt und verarbeitet wird, geht sie verloren. Während der Übertragung auf das Kurzzeitgedächtnis werden die Informationen (meist unterbewusst) selektiv reduziert, da es ansonsten zur Überlastung des Kurzzeitgedächtnisses kommt (Biermann und Weißmantel, 2003). Im Kurzzeitgedächtnis werden Informationen aufgenommen und verschlüsselt bzw. abgerufen und entschlüsselt (Kliegel et al., 2003).
Im Langzeitgedächtnis gibt es nur verschlüsselte, semantisch kodierte Informationen, die erst im Kurzzeitgedächtnis entschlüsselt und abgerufen werden können. Außerdem hat es eine unbegrenzte Kapazität, im Gegensatz zum Kurzzeitgedächtnis, und die dort gespeicherte Information kann man im Normalfall nie wieder „verlieren“. Die Kapazität des Ultrakurzzeit- und des Kurzzeitgedächtnisses verändert sich während des Alterns nicht wesentlich. Die eigentlichen Probleme liegen in der langsameren Ver- und Entschlüsselung bzw. der Verarbeitung der Informationen, das heißt, dass sich die flüssige Intelligenz verschlechtert (Biermann und Weißmantel, 2003).

Abbildung 7: Veränderung der kognitiven Leistungen mit dem Alter (Oswald, 2010)

Während des Alterungsprozesses ändern sich fortwährend die kognitiven Fähigkeiten, jedoch nicht in allen Bereichen gleich (Oswald, 2010). Eine moderne Theorie zur Intelligenz besagt, dass sich die Intelligenz aus der flüssigen und der kristallinen Intelligenz zusammensetzt (Kempa, 2010). Zur kristallinen Intelligenz zählen jene Fähigkeiten, die sich jeder Mensch individuell während seines Lebens erarbeitet (Biermann und Weißmantel, 2003) und die im Langzeitgedächtnis gespeichert wird (Kempa, 2010), z.B. schreiben, lesen oder ein Musikinstrument spielen. Bei der flüssigen Intelligenz handelt es sich um basale Funktionen bei der Verarbeitungsgeschwindigkeit von Informationen, z.B. Geschwindigkeit am Zebrastreifen oder wenn man verschiedene Dinge zur gleichen Zeit beachten muss (Oswald, 2010). Während des Alterungsprozesses verändert sich die kristalline Intelligenz kaum bzw. kann sie bei regelmäßigem Gebrauch sogar gesteigert werden (siehe Abb. 5). Dagegen zeigen sich bei der flüssigen Intelligenz im Laufe des Alterns verringerte Leistungen, d.h dass die Arbeitsprozesse schlechter bzw. langsamer Ablaufen (Biermann und Weißmantel, 2003).

11. Comet Assay

11.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Abkürzung	Produzent	Produktnummer
2-Amino-2(hydroxylmethyl)-propan-1,3-diol	Tris	Sigma-Aldrich	77-86-1
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES	Sigma-Aldrich	7365-49-9
Bovine serum albumin	BSA	Sigma-Aldrich	A2153-50
Dimethylsulfoxide >99,5%	DMSO	Sigma-Aldrich	67-68-5
Ethidiumbromid (10 mg/ml)		Sigma-Aldrich	056 K8907
Ethylendiamintetraaceticacid	EDTA	Sigma-Aldrich	60-004
Fetal bovine serum	FBS	PAA	A15-039
Glycerol 99%		Sigma-Aldrich	G901-2
Hydrochloric acid >25%	HCl	Roth	6331-4
Kaliumchlorid	KCl	Merck	493C-0500
Kaliumhydroxid >86%	KOH	Sigma-Aldrich	60370
Low melting agarose	LMA	Invitrogen	16520-050
Natriumchlorid	NaCl	Sigma-Aldrich	60-00-4
Natriumhydroxid	NaOH	Sigma-Aldrich	1310-73-2
Normal melting agarose	NMA	Invitrogen	16500-100
O-[4-(1,1,3,3-Tetramethyl-butyl)phenoxy]polyethoxyethanol	Triton X-100	Sigma-Aldrich	9002-93-1
Phosphat buffered saline	PBS	Sigma-Aldrich	D8537
RPMI-1640 (ohne L-Glutamin)	RPMI	PAA	E15-039
Trypanblau 0,4%		Sigma-Aldrich	761866
Wasserstoffperoxid 30%	H2O2	Sigma-Aldrich	H1009

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien inkl. Produzent und Produktnummer

11.2 Verwendete technische Geräte

Gerät	Produzent	Produktnummer
Countess automated cell counter	Invitrogen	C10283
Elektrophorese		
Fluoreszenzlampe	Zeiss	L200
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	038-03241
pH-Meter	Metrohm	40768330
Power Supply	peqLab	EV231
Zentrifuge	Eppendorf	5417R

Tabelle 2: Verwendete technische Geräte inkl. Produzent und Produktnummer

11.3 Verwendete Materialien

Material	Produzent	Produktnummer
Countess cell counting chamber slide	Invitrogen	C10227
Deckgläser 20 x 20	VWR	631-1568
Deckgläser 22 x 22	VWR	631-1570
Heparinröhrchen 9 ml		
Leucosepröhrchen 12 ml		
Objektträger	VWR	631-1551
Zentrifugenröhrchen 50 ml	VWR	525-0159

Tabelle 3: Verwendete Materialien inkl. Produzent und Produktnummer

11.4 Herstellung der Lösungen

Elektrophoreselösung (pH >13)

Einwaage (2 Liter):	24 g	0,3 M NaOH
	0,58 g	0,001 M EDTA

NaOH Pellets in dest. Wasser lösen, EDTA dazugeben und den pH-Wert messen (>13). In einen 2 Liter Messkolben geben und mit dest. Wasser auffüllen. Anschließend kalt stellen.

Enzympuffer (pH 8)

Einwaage (1 Liter):	95,3 g	40 mM HEPES
	74,56 g	0,1 M KCl
	1,46 g	0,5 mM EDTA
	2 g	0,2 mg/ml Bovine Serum Albumin

Alle Chemikalien in dest. Wasser lösen und im Messkolben auf einen Liter auffüllen. In 50 ml Röhrchen alliquotieren, mit Parafilm verschließen und bei -20°C lagern.
Zur Verwendung den aufgetauten Inhalt eines Röhrchens in dest. Wasser lösen und den pH-Wert mit 1 M KOH auf 8 einstellen. Puffer in einem 500 ml Messkolben mit dest. Wasser auffüllen und kalt stellen.

Ethidiumbromidlösung

Die Ethidiumbromid-Stocklösung hat eine Konzentration von 10 µg/ml. Für die Färbung der Zellen benötigt man eine Konzentration von 20 µg/ml, folglich mischt man 10 µl Stocklösung mit 5 ml bidest. Wasser. In dunklen Fläschchen kühl lagern.

FPG-Lösung

Menge:	2 ml	Enzympuffer
	20 µl	FPG-Stocklösung
	200 µl	Glycerol

Enzympuffer und Glycerol werden vermengt, dann wird die schon in 20 µl Alliquots eingefrorene FPG-Stocklösung mit 980 µl der Enzympuffer-Glycerollösung vermischt. Dieses Gemisch wird anschließend wieder bei -80°C zu 30 µl Alliquots eingeforen.

Low Melting Agarose

200 mg Low Melting Agarose in 20 ml PBS in der Mikrowelle, durch dreimaliges aufkochen lösen. Danach in das mit 37 °C temperierte Wasserbad stellen. Diese Agarose wird benötigt, um die Zellen an den Objektträger zu fixieren.

Lyselösung (pH 10)

Einwaage (2 Liter):	292,2 g	2,5 M NaCl
	58,4 g	0,1 M EDTA
	2,422 g	10 mM Tris

NaCl und Tris in destilliertem Wasser etwas auflösen lassen und 40 ml NaOH dazu pipettieren. Erst das EDTA sowie 8 ml NaOH dazugeben, damit sich das EDTA schneller löst. Den pH-Wert mit NaOH (ca. 78 ml) einstellen. In einen 2 Liter Messkolben geben, mit dest. Wasser auffüllen und in eine dunkle Flasche umfüllen. Erst kurz vor der Verwendung pro 100 ml Lyselösung 1 ml Triton X hinzufügen.

Neutralisationspuffer

Einwaage (2 Liter):	96,88 g	0,4 M Tris Base

Tris Base in dest. Wasser lösen und mit konz. HCl den pH-Wert auf 7,5 einstellen (ca. 110 ml). Anschließend auf 2 Liter auffüllen, in eine dunkle Flasche füllen und kalt stellen.

Normal Melting Agarose

1 g Normal Melting Agarose in 100 ml bidest. Wasser in der Mikrowelle, durch dreimaliges aufkochen lösen. Diese Agarose wird dann zur Beschichtung der Objektträger verwendet.

Wasserstoffperoxid

Man mischt 10,3 µl Wasserstoffperoxid mit 1 ml dest. Wasser. Davon gibt man 80 µl in einen Messkolben und füllt diesen mit dest. Wasser auf 80 ml auf. Anschließend kalt stellen.

12. Durchführung des Comet Assay

12.1 Beschichten der Objektträger

Die Objektträger werden mit der Normal Melting Agarose beschichtet. Dafür taucht man den Objektträger bis zur matten Fläche in die Agarose, streift die Rückseite ab und lässt sie dann (am besten über Nacht) auf einer ebenen Fläche trocknen. Anschließend können sie bis zur weiteren Verwendung in Boxen gelagert werden.

12.2 Aufbereitung der Lymphozyten

Für die Aufbereitung der Lymphozyten werden Leucosepröhrchen verwendet, da diese eine Trennschicht besitzen, wodurch die Lymphozyten während der Zentrifugation besser getrennt werden. Das Vollblut wird in Heparinröhrchen transportiert (ca. 9 ml) und auf 2 Leucosepröhrchen aufgeteilt. Nun wird das Vollblut mit 1000 rcf/g bei 16 °C für 15 Minuten ohne „brake“ zentrifugiert. Dadurch kommt es zur Auftrennung in Plasma, Lymphozytensuspension (PBMCs) und einem Pellet (Erythrozyten und Granulozyten). Damit sich die aufgetrennten Anteile nicht wieder vermischen, stellt man an der Zentrifuge „ohne brake“ ein.
Alle weiteren Schritte werden auf Eis durchgeführt. Die als Wolke sichtbaren PBMCs werden mit einer Kreisbewegung abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Mit kaltem PBS auf 15 ml auffüllen, das Röhrchen 5x über Kopf schwenken und anschließend mit 1300 rpm bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugieren. Den entstandenen Überstand absaugen, 1 ml PBS mit Druck dazugeben, damit sich das Pellet löst. Mit PBS auf 10 ml auffüllen, wieder 5x über Kopf schwenken und nochmals mit 1300 rpm bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugieren. Nochmals den Überstand entfernen und die Zellen mit 1 ml PBS resuspendieren.

Anschließend wird mit der Countess die Viability, also die lebenden und toten Zellen bestimmt. Dafür mischt man 10 µl Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau und gibt davon 10 µl auf den „chamber slide“. Für den Comet Assay benötigt man eine Zellkonzentration von 1 x 10^6 und eine Menge von insgesamt 150 µl. Bei einer höheren Konzentration wird mit PBS verdünnt.

12.3 Aufbereitung der Kontrollprobe

Das Kontrollblut wird wie die Lymphozyten aufbereitet (siehe 12.2.), mit dem Unterschied, dass die Kontrollen vor der Verwendung bei -80°C eingefroren werden, da man sie nur einmal herstellt. Die Zellen werden mit 1000 rpm bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend das PBS abgesaugt. Nun gibt man das Einfriermedium dazu, das aus 60% FBS (Kälberserum), 30% RPMI (Medium) und 10% DMSO (Lösungsmittel) besteht und teilt die Suspension auf Cups auf.
Pro Comet Assay benötigt man ein Cup der eingefrorenen Kontrollen. Diese taut man zuerst schnell in den Händen auf und zentrifugiert sie anschließend mit 3000 rpm bei 4 °C für 3 Minuten. Den Überstand abnehmen, 1 ml PBS dazugeben und darin das entstandene Pellet lösen. Anschließend wieder mit 3000 rpm bei 4 °C für 3 Minuten zentrifugieren. Den Überstand wieder abnehmen und das Pellet in 0,3 µl PBS lösen. Anschließend wird mit Hilfe der Countess die Zellzahl bestimmt.

12.4 Aufbringen auf Objektträger

Pro Proband werden insgesamt 5 Objektträger (d.h. 10 Gele) benötigt. Je 2 Gele für Lyse und H_2O_2 und je 3 Gele für Puffer und FPG (inkl. Ersatzgele, falls eines nicht auszählbar ist).
Die folgenden Schritte werden auf silbernen, gekühlten Tabletts durchgeführt und sollten rasch ausgeführt werden. In einem Cup werden 30 µl Zellsuspension mit 140 µl Agarose gemischt. Davon gibt man 2-mal je 70 µl auf den beschichteten Objektträger und bedeckt dies mit einem Deckglas (20x20 mm). Anschließend für ca. 5 Minuten kaltstellen, damit die Agarose fest wird.

12.5 Behandlung mit H_2O_2

Die Deckgläser von den Objektträgern entfernen und für 5 Minuten in einem Trog mit Wasserstoffperoxid inkubieren. Nachfolgend werden die Objektträger für 5 Minuten in einem Trog mit dest. Wasser gewaschen, um das H_2O_2 zu entfernen.

12.6 Lyse

Cover slips von den Objektträgern entfernen und diese dann Rücken an Rücken in den Trog stecken. Anschließend mit Lyselösung (inkl. Triton-X) auffüllen und für mindestens eine Stunde (max. 24 Stunden) im Kühlschrank stehen lassen.

12.7 Behandlung mit FPG

Dieser Schritt wird mit den Objektträgern „Puffer“ und „FPG“ durchgeführt. Vor der Behandlung werden die Objektträger 3-mal im Kühlschrank für je 5 Minuten in Enzympuffer gewaschen. Anschließend gibt man auf jedes Gel für Puffer je 50 µl Enzympuffer und bedeckt dieses mit einem Deckglas (22x22 mm). Dasselbe führt man mit den FPG-Gelen durch, anstatt Enzympuffer verwendet man aber die FPG-Lösung (30 µl eingefrorene FPG-Lösung plus 870 µl Enzympuffer). Nun werden die Objektträger in der „moist box“ für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach die Deckgläser wieder entfernen.

12.8 Alkalibehandlung und Elektrophorese

Dieser gesamte Vorgang wird im Kühllabor durchgeführt. Man legt alle Objektträger in die Elektrophorese (immer in dieselbe Richtung), gibt ca. 230 ml Elektrophoresepuffer in ein Becherglas und füllt den Rest in die Elektrophorese. Es ist wichtig, dass alle Objektträger mit Flüssigkeit bedeckt sind (dafür die Elektrophorese vorher mit einer Wasserwaage ausrichten) und man die Luftbläschen darunter entfernt. Jetzt werden die Objektträger im Dunkeln genau 20 Minuten inkubiert. Dies dient der Auflockerung der DNA.

Einstellungen: Spannung: 25 V, Strom: Maximum, Leistung: Maximum, Zeiteinheit: h, Zeit: 30 min

Die Stromstärke sollte bei 300 mA liegen. Wenn das nicht passt, gibt man Elektrophoresepuffer dazu oder weg. Während der Elektrophorese wird ein Spannungsfeld aufgebaut. Beschädigte, bruchstückhafte DNA ist negativ geladen und wandert so zum Pluspol, intakte DNA wandert nicht. Je kleiner die Stücke, desto weiter wandern sie.

12.9 Neutralisation

Die Objektträger aus der Elektrophorese nehmen und für 5 Minuten in einem Trog mit Neutralisationspuffer und anschließend für 5 Minuten in dest. Wasser waschen. Danach über Nacht im Dunkeln trocknen lassen und bis zum Auszählen kühl in Boxen lagern.

12.10 Färben und Auszählen

Für die Färbung der Zellen wird Ethidiumbromid (20 µg/ml) verwendet. Man gibt 30 µl Ethidiumbromid auf das Gel und bedeckt es mit einem Deckglas (22x22 mm). Anschließend zählt man, unter Verwendung des Programms „Comet 5.5“, pro Gel insgesamt 50 Zellen (in Schlangenlinien, ca. jede fünfte Zelle). Das Programm berechnet den Anteil der DNA im Schweif in Prozent (% tail DNA). Wichtig ist, die Zellen am Rand des Gels nicht auszuzählen und gefärbte Objektträger am gleichen Tag auszuzählen.

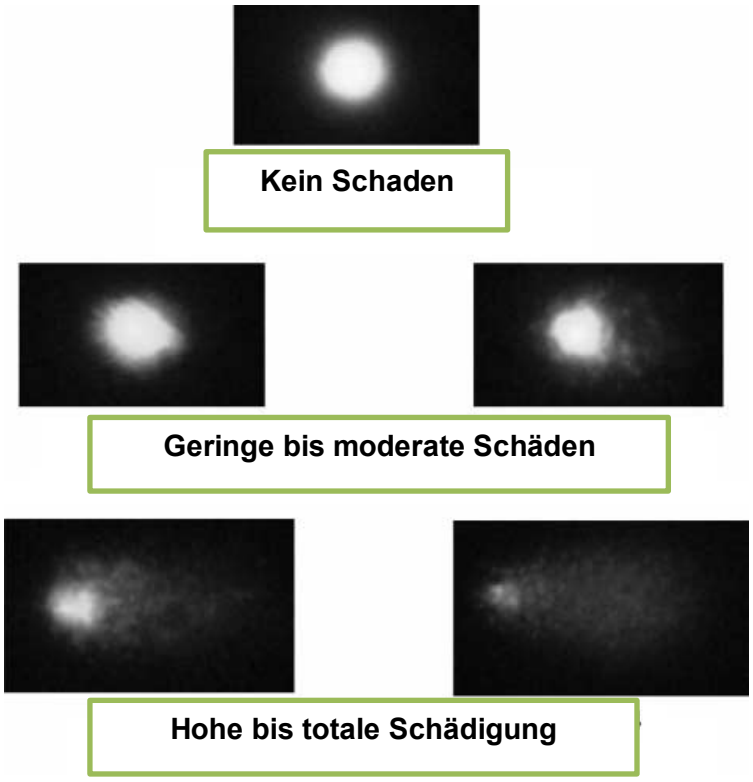

Abbildung 8: Unterschiedlich große DNA-Schäden in Prozent (modifiziert nach Waters et al., 2007)

13. Statistik

Von den Ergebnissen, die man mit dem Programm „Comet 5.5“ erhielt, berechnete man mittels Excel die Mittelwerte der DNA-Schäden, als Prozent der DNA im Schweif. Anschließend wurden Ausreißer entfernt und im Program „IBM SPSS Statistics Version 21“ mit den vorher berechneten Mittelwerten weitergerechnet. Die Daten wurden auf Normalverteilung geprüft. Durch deskriptive Statistik erhielt man die Verteilung der Probanden in den Interventionsgruppen, Alterskategorien, den durchschnittlichen BMI, etc. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Wilcoxon-Test überprüft und es wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha \leq 0{,}05$ verwendet.

14. Ergebnisse der 18-monatigen Intervention mit Gedächtnistraining

Zu Beginn waren 105 Probanden an der Studie beteiligt, aber zum Zeitpunkt fünf haben nur mehr 56 Personen die Studie abgeschlossen. Dies liegt daran, dass die Probanden aufgrund von gesundheitlichen oder terminlichen Problemen nicht mehr an der Studie teilnehmen konnten.

14.1 Aufteilung der Probanden nach Gruppen

Die Probanden wurden zu Beginn der Studie auf drei verschiedene Gruppen aufgeteilt. Es gab eine Trainingsgruppe, eine Trainings- und Ernährungsgruppe und eine Kontrollgruppe mit Gedächtnistraining. Zu Beginn waren in der Gedächtnisgruppe 33 Personen und zum Zeitpunkt fünf 14 Probanden. An der folgenden Tabelle sieht man die Verteilung der Probanden zu Beginn der Studie.

Interventionsgruppe	Häufigkeit	Prozent (%)
Training	38	36,2
Training + Ernährung	32	30,5
Gedächtnistraining	35	33,3
Gesamt	105	100

Tabelle 4: Aufteilung der Probanden zum Zeitpunkt T1

Die allgemeine Aufteilung zum Zeitpunkt T5 war folgende:

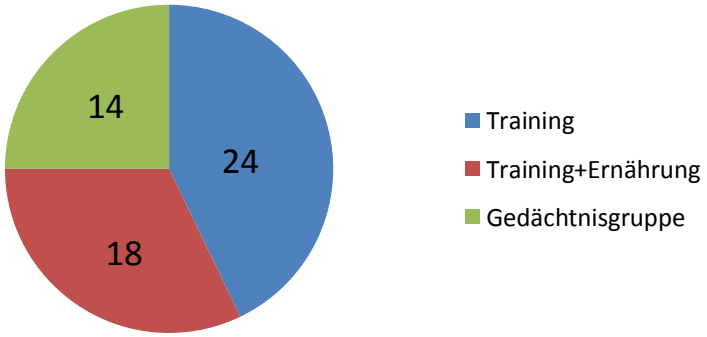

Abbildung 9: Probandenanzahl in den einzelnen Gruppen (T5)

14.2 Geschlechter- und Altersverteilung

An dieser Studie haben zum größten Teil Frauen teilgenommen. Zu Beginn der Studie waren dies 92 Frauen und nur 13 Männer und in der Kontrollgruppe war die Aufteilung der Geschlechter wie folgt:

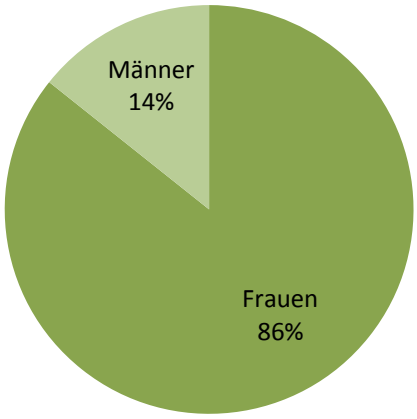

Abbildung 10: Geschlechterverteilung in der Kontrollgruppe

An der letzten Messung (T5) waren also nur sechs Männer, aber dafür 50 Frauen beteiligt. Dies könnte vor allem damit zusammenhängen, dass sich die Bevölkerung in den letzten Jahren, im Bezug auf Alter und Geschlecht, verändert hat. Es gibt weniger junge Leute (unter 15 Jahre), dafür aber weit mehr Personen im höheren Alter (über 65 Jahre). Zu Beginn des Jahres 2013 waren 20,1% der Bevölkerung unter 20 Jahre und 18,1% über 65 Jahre. Dagegen waren im Jahr 1981 28,7% unter 20 Jahre und nur 15,1% über 65 Jahre (Statistik Austria, 2014a). Ein weiterer Grund für die Überzahl an Frauen könnte die höhere Lebenserwartung sein. Im Jahr 2012 hatten Frauen bei der Geburt eine Lebenserwartung von 83,3 Jahren und Männer hingegen eine Lebenserwartung von 78,3 Jahren. Des Weiteren gibt es im Durchschnitt mehr Frauen in Österreich (51,2%) (Statistik Austria, 2013), denn in der Altersgruppe >75 Jahre kamen im Jahr 2012 581 Männer auf 1000 Frauen (Statistik Austria, 2014b), weshalb es vermutlich auch in den Altenheimen mehr Frauen als Männer gibt und an dieser Studie fast nur Frauen beteiligt waren.

Das hohe Alter der Probanden ist auch in der Einteilung nach Alterskategorien, zu Beginn der Studie in allen Gruppen, ersichtlich. Zu Beginn der Studie waren 51% der

Probanden über 85 Jahre alt, 38% waren zwischen 75-84 Jahre und nur 11% zwischen 65-74. Ähnliches sieht man auch in der Gedächtnisgruppe (siehe Tab. 5).

Alterskategorie	Probandenanzahl T1	Probandenanzahl T4	Probandenanzahl T5
65-74	3	2	2
75-84	10	5	5
≥ 85	20	13	7

Tabelle 5: Einteilung der Gedächtnisgruppe nach Alterskategorien

Bei der Betrachtung der Mittelwerte der jüngsten Gruppe (65-74 Jahre) innerhalb der Gedächtnisgruppe sollte man bedenken, dass nur sehr wenige Personen in die Berechnung miteinbezogen wurden (siehe Tab. 5). Dies liegt daran, dass zum Großteil über 75- bzw. 85-Jährige teilgenommen haben und die Gedächtnisgruppe zum letzten Zeitpunkt 14 Probanden beinhaltete. Deshalb sind die Ergebnisse für die jüngste Alterskategorie nicht sehr aussagekräftig.

14.3 Body Mass Index (BMI)

Der BMI ist ein einfacher Index von Gewicht für Größe, der häufig für die Klassifizierung von Unter- und Übergewicht bzw. Adipositas bei Erwachsenen verwendet wird. Er wird definiert als Gewicht in Kilogramm dividiert durch Gewicht in Meter zum Quadrat (kg/m^2) (WHO, 2004).

Altersgruppe	BMI (kg/m^2)	
	Untergrenze	Obergrenze
19-24	19	24
25-34	20	25
35-44	21	26
45-54	22	27
55-64	23	28
≥ 65	24	29

Tabelle 6: Einteilung des BMI nach Alter (modifiziert nach National Research Council, 1989)

Wie das Gewicht, neigt auch der BMI in der industrialisierten Bevölkerung dazu, im mittleren Alter zu steigen und nach dem 70.-75. Lebensjahr wieder zu sinken. Der Zusammenhang zwischen BMI, Fett- und Muskelmasse verändert sich mit dem Alter. Der BMI korreliert bei Jüngeren höher mit dem subkutanen Fett, als bei älteren Frauen und Männern und die Muskelmasse korreliert bei Älteren mehr als bei Jüngeren. Das bedeutet, dass eine junge Person mit einem hohen BMI wahrscheinlich mehr subkutanes Fett hat, also jene mit einem relativ niedrigen BMI. Der BMI könnte bei Älteren und jungen Erwachsenen, wegen der Verringerung der Größe mit dem Alter, eine unterschiedliche Bedeutung haben. Es sollte betont werden, dass der BMI mit dem Alter nicht abnimmt. Tatsächlich könnte er ab einem Alter von 70 oder älter höher sein als bei Jüngeren, aufgrund der altersbedingten Veränderungen von Gewicht und Größe. Denn mit dem Alter kommt es zu einer Verringerung der Größe (1-2 cm pro Jahrzehnt). Dies ist vor allem ein Resultat der Kompression der Wirbelkörper, Veränderung der Größe und Form der Bandscheiben, Verlust des Muskeltonus und Veränderungen in der Haltung (durch Osteopenie und verstärkte Krümmung der Wirbelsäule). Diese Veränderungen können die Mobilität, Balance und manchmal auch die Atmung beeinflussen (WHO, 1995).

Bei Erwachsenen im mittleren Alter (50-65 Jahre) ist Übergewicht ein bedeutendes Gesundheitsproblem. Dagegen ist bei über 65-jährigen Personen das Gesundheitsrisiko von Übergewicht unklar. Daten aus der Bevölkerung deuten aber darauf hin, dass moderates Übergewicht bei älteren Personen sogar mit einer geringeren Mortalität assoziiert ist (WHO, 1995). In Tabelle 6 sieht man, dass das Normalgewicht ab einem Alter von 65 bei Frauen und Männern zwischen etwa 24 und 29 kg/m^2 liegt (National Research Council, 1989). Unter denen die über 80 Jahre sind, könnten Schlankheit und der Verlust der fettfreien Körpermasse ein größeres Problem sein, als Übergewicht (WHO, 1995).
Bei einer Studie mit finnischen Frauen (65-79 Jahre) zeigte Übergewicht keine Verringerung der Lebenserwartung. Tatsächlich scheint es, dass mäßiges Übergewicht protektiv gegen den Tod wirkt, denn am Günstigsten war ein BMI von 27-31, also beträchtlich höher als vorher angenommen. Eine „follow-up“ Studie in Finnland mit Frauen und Männern über 85 Jahren zeigte, dass ein geringer BMI ein bedeutenderer Faktor für das Sterberisiko war, als ein hoher BMI. Die höchste 5-Jahres-Mortalität wurde in der Gruppe mit einem BMI <20 und die geringste

Mortalität bei der Gruppe mit einem BMI >30 beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass Übergewicht in dieser Altersgruppe keinen Risikofaktor für den Tod darstellt (WHO, 1995). Bei jüngeren Personen ist ein hoher BMI mit einem erhöhten Risiko für Diabetes, Herzerkrankungen, usw. assoziiert. Umgekehrt ist es bei älteren Personen, wo ein niedriger BMI (<23,6) sehr stark mit dem Mortalitätsrisiko zusammenhängt (Somes et al., 2002).

Es gibt einen beachtlichen Mangel an Wissen über die funktionellen und gesundheitsbezogenen Auswirkungen von anthropometrischen Indikatoren für ältere Personen. Weiters erschwert die Umverteilung von Körperfett, aus den Extremitäten zu den viszeralen Bereichen, die angemessene Schätzung der Körperzusammensetzung bei älteren Menschen, wenn anthropometrische Modelle angewendet werden, die auf Basis von jüngeren Erwachsenen erstellt wurden. Daten aus Magnetresonanztomografie oder Computertomografie decken auf, dass bei älteren Personen nicht nur eine fortschreitende Umverteilung von Fett, sondern auch ein Austausch von Muskelgewebe durch intramuskuläres Fett stattfindet (WHO, 1995).

Der BMI der Probanden von Zeitpunkt T5 war noch nicht verfügbar, weshalb die Werte von T4 betrachtet wurden. Der durchschnittliche BMI bei den Frauen betrug zum Zeitpunkt T4 28,66 kg/m^2 und bei den Männern 27,41 kg/m^2. Dies bedeutet, dass die Probanden im Durchschnitt ein normales Gewicht und kein Übergewicht hatten.

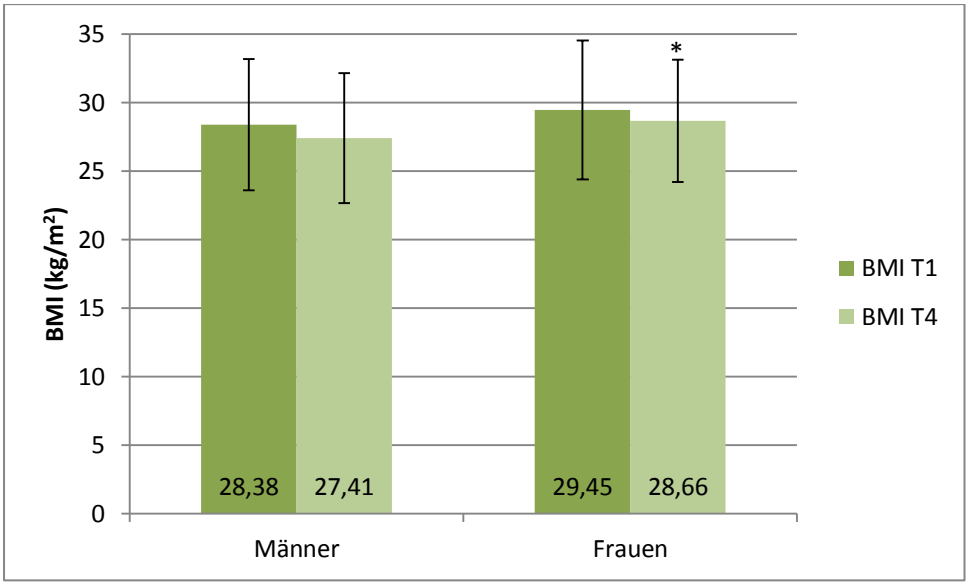

Abbildung 11: BMI bei Frauen und Männern aus allen Interventionsgruppen (T1 und T4)

Der BMI verringerte sich bei den Frauen zwischen Zeitpunkt T1 und Zeitpunkt T4 signifikant von 29,45 auf 28,66 kg/m^2 (p=0,018). Bei den Männern verringerte sich der BMI von 28,38 auf 27,41, jedoch nicht signifikant, da nur sechs männliche Probanden beteiligt waren. Dasselbe gilt für den BMI in den unterschiedlichen Interventionsgruppen. Dieser hat sich bei allen drei Gruppen (auch bei der Gedächtnisgruppe) verringert, allerdings nur bei der Trainingsgruppe signifikant (p=0,011). Bei den anderen Gruppen sind die Werte vermutlich wegen der größeren Standardabweichung nicht signifikant.

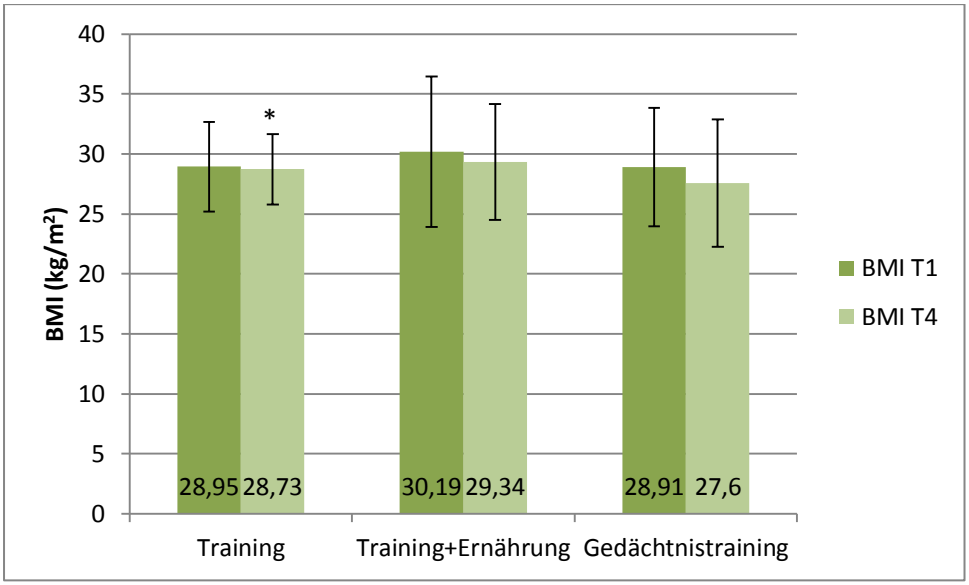

Abbildung 12: BMI der unterschiedlichen Interventionsgruppen (T1 und T4)

14.4 Ergebnisse zum Zeitpunkt T4 (Einfluss einer 12-monatigen Intervention)

14.4.1 DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse, aufgeteilt nach Interventionsgruppen (T4)

Die Behandlung mit Lyse wird durchgeführt, um Einzel- und Doppelstrangbrüche (inkl. alkalilabile Stellen) zu erkennen (Azqueta et al., 2009). Die DNA-Schäden haben sich in allen drei Interventionsgruppen verringert. In der Gedächtnisgruppe um 4,12%, in der Trainingsgruppe um 9,71% und in der Trainings- und Ernährungsgruppe signifikant (p=0,047) um 17,75%. Wie man sieht, haben sich

sowohl in den beiden Gruppen mit Training, wie auch in der Gedächtnisgruppe die Schäden verringert.

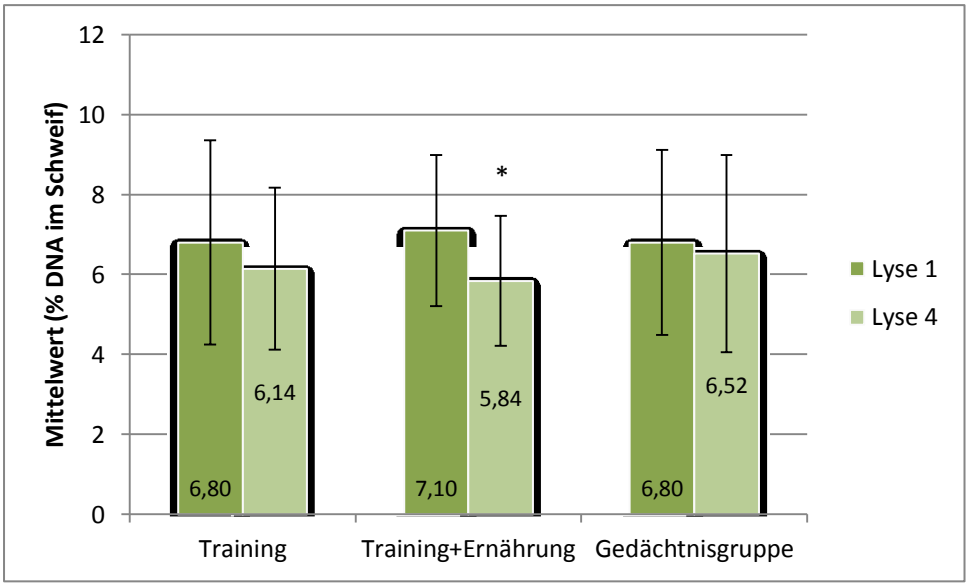

Abbildung 13: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse in allen Interventionsgruppen (T1 und T4)

Mota et al. hatten in einer Studie festgestellt, dass auch mit steigendem Alter regelmäßiges Training zu einer verringerten Bildung von ROS, sowie geringerer Ansammlung an DNA-Schäden und gesteigerter antioxidativer Abwehr führt (Mota et al., 2010). Dass aber auch in der Gedächtnistrainingsgruppe geringere Schäden gemessen wurden, könnte daran liegen, dass eine gesunde Verhaltensweise der Personen (mehr Sport, ausgewogenere Ernährung, usw.) durch die Integration in ein soziales Netzwerk gefördert wurde und dies zu verbesserten Gesundheitsergebnissen bzw. geringeren Schäden der DNA geführt hat. Weiters führt die Unterstützung von nahestehenden Personen zu einem besseren Umgang mit Stress (Cornwell und Waite, 2009), wodurch die negativen Auswirkungen von Stress, wie erhöhte Konzentration von DNA-Schäden, schnellere Oxidation von Lipiden und verringerte Antioxidantien, verhindert bzw. verringert werden können (Gidron et al., 2006).

14.4.2 DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse, aufgeteilt nach Alterskategorien (T4)

Wenn man die DNA-Schäden innerhalb der Gedächtnisgruppe nach Alterskategorien betrachtet, gibt es in den beiden älteren Gruppen einen geringfügigen Abfall der Schäden und bei der jüngsten Gruppe einen geringen Anstieg. In der Gruppe der 75-84-Jährigen sinken die Schäden um 7,06% und in der Ältesten um nur 1,4%. Es wäre auch in der jüngsten Altersgruppe möglich, dass die Werte sinken. Jedoch sind, wie oben angesprochen, in der jüngsten Gruppe nur 2 Personen bei der Berechnung miteinbezogen worden, weshalb das Ergebnis ansonsten möglicherweise auch anders wäre. Der Rückgang der DNA-Schäden könnte an den schon oben genannten Gründen, wie gesündere Lebensweise oder verbesserter Umgang mit Stress liegen (Cornwell und Waite, 2009).

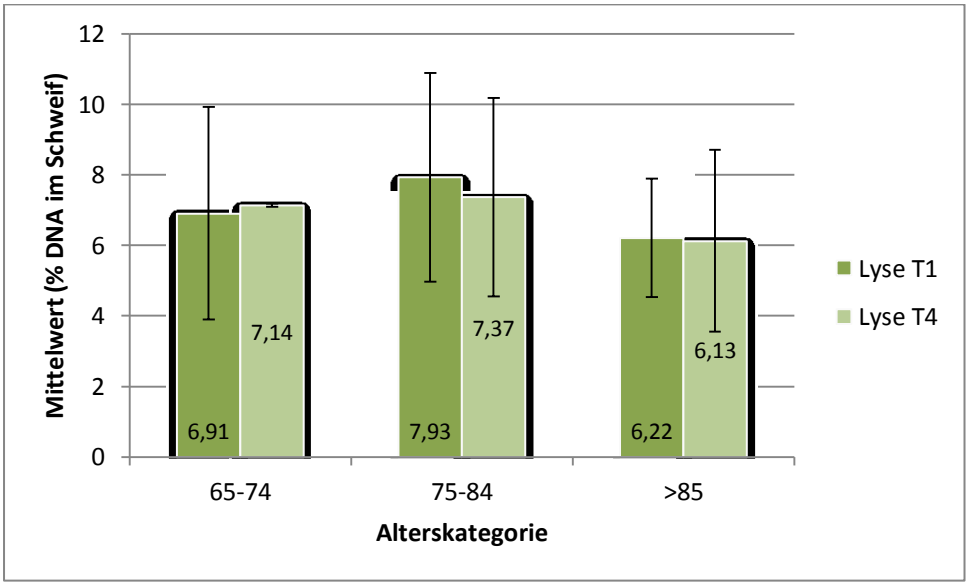

Abbildung 14: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse in der Gedächtnisgruppe (T1 und T4)

14.4.3 DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2, aufgeteilt nach Interventionsgruppen (T4)

Die Behandlung mit H_2O_2 wird durchgeführt, um die Empfindlichkeit der DNA gegenüber exogenen Schäden zu messen (Collins, 2004). Wie in der folgenden Abbildung zu sehen, hat sich die Anzahl der DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2 in allen Gruppen, vom ersten auf den vierten Zeitpunkt, erhöht. In der Trainingsgruppe signifikant (p=0,018) um 13,09%, in der Trainings- und Ernährungsgruppe um 5,05% und in der Gedächtnisgruppe um 7,07%. Das

bedeutet, alle Gruppen sind beim vierten Zeitpunkt empfindlicher gegen exogene Noxen bzw. haben die Zellen einen verringerten antioxidativen Status (Humphreys et al., 2007).

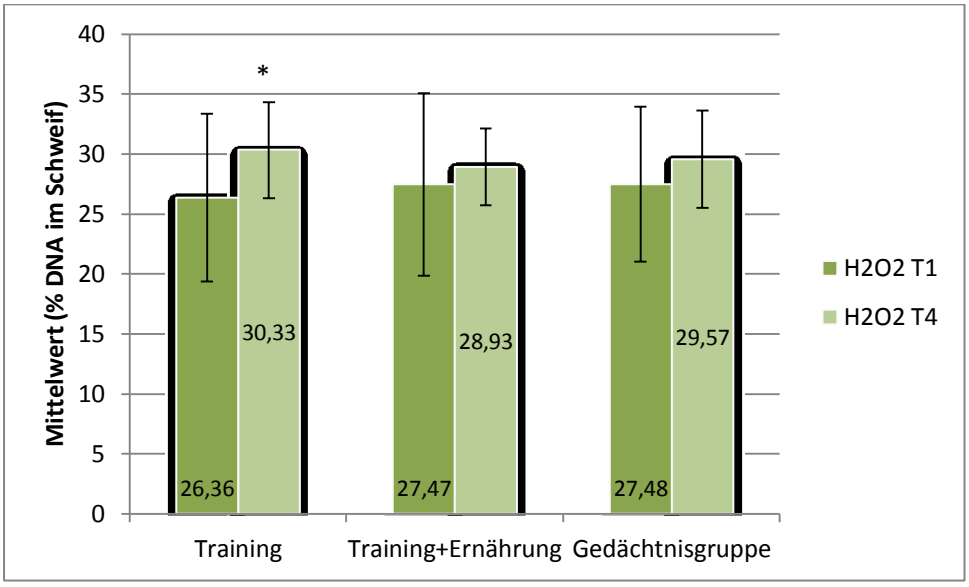

Abbildung 15: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2 in allen Interventionsgruppen (T1 und T4)

In einer Studie von Dimitroglou et al. wurden die DNA-Schäden von chronisch gestressten Personen mittels Comet Assay gemessen. Die chronisch gestressten und besorgten Teilnehmer waren Eltern von Kindern, die an Mukoviszidose litten, während die Kontrollen Eltern von Kindern waren, die nicht an dieser Krankheit litten, und deshalb weniger ängstlich bzw. besorgt waren. Es wurden Lymphozyten aus Blutproben der Teilnehmer extrahiert und anschließend entweder mit Wasserstoffperoxid oder Gamma-Strahlung (beide führen zu Strangbrüchen in der DNA) behandelt. Die Ausgangsmenge der DNA-Schäden beider Gruppen war nicht signifikant unterschiedlich. Dennoch gab es signifikante Abweichungen bei den Reaktionen auf die toxische Behandlung mit H_2O_2 bzw. Gamma-Strahlen. Die chronisch gestressten Teilnehmer litten an erhöhter Anfälligkeit gegenüber den Auswirkungen der externen Herausforderungen, was sich durch größere Mengen an DNA-Schäden manifestierte. Es gab keine Geschlechterunterschiede bei diesem Effekt.

Diese Ergebnisse wurden schon in anderen Studien belegt und legen nahe, dass chronischer Stress die Auswirkungen, von ROS oder Umweltstress, auf die DNA-Integrität verstärken könnten. Allerdings gaben die Forscher nicht an, ob die

beobachteten Unterschiede nach der Kontrolle mit möglichen Effekten von Störfaktoren (z.B. Rauchen, Ernährung) signifikant waren (Gidron et al., 2006).
Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie wäre es möglich, dass auch unsere Probanden durch Probleme in ihrem Leben, mit ihren Kindern, Mitbewohnern usw., unter Stress standen und dies zu einem Anstieg der DNA-Schäden führte. Der Anstieg in den Trainingsgruppen könnte auch durch erhöhten oxidativen Stress, der eventuell durch den Sport entsteht, erklärt werden. Es ist gut dokumentiert, dass regelmäßige moderate körperliche Aktivität mit verschiedenen gesundheitlichen Vorteilen verbunden ist, einschließlich des verringerten Risikos für Krebs, Diabetes und Atherosklerose. Jedoch könnte intensives, aber nicht regelmäßiges, Training durch verstärkte Bildung von ROS und RNS oxidativen Stress induzieren. Die möglichen Mechanismen, die an der Bildung beteiligt sind, sind erhöhter Sauerstoffverbrauch, Autooxidation von Katecholaminen, Aktivierung von Entzündungszellen durch Schädigung von Muskelgewebe, etc. (Wagner et al., 2011).

14.4.4 DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2, aufgeteilt nach Alterskategorien (T4)

Wenn man die Mittelwerte in der Gedächtnisgruppe zwischen den Alterskategorien vergleicht, sieht man unterschiedliche Ergebnisse. In der jüngsten Gruppe verringern sich die Schäden um 12,8%, wohingegen sie bei den beiden älteren Gruppen ansteigen. Bei den 75-84-Jährigen um 6,93% und den >85-Jährigen um 10,57%.

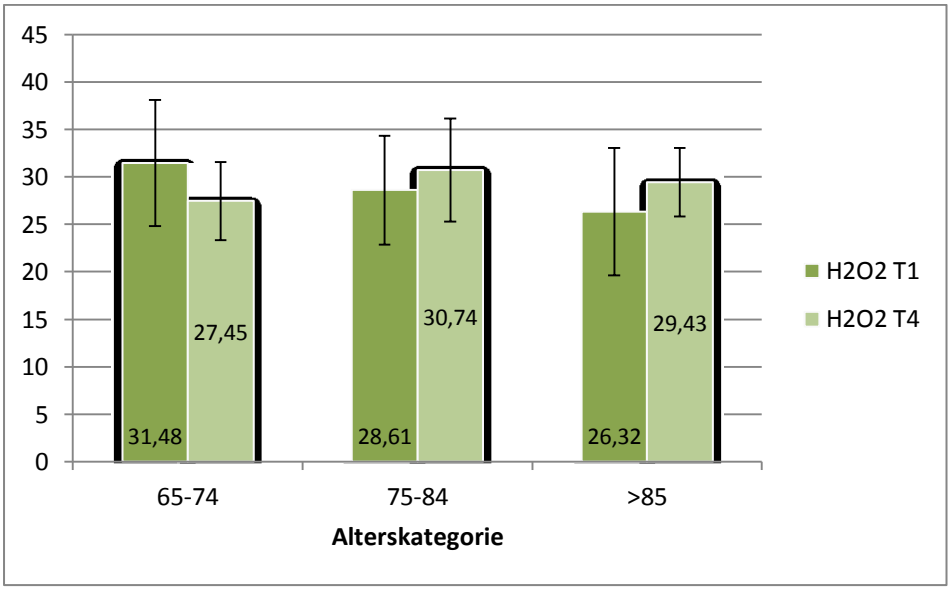

Abbildung 16: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2 in der Gedächtnisgruppe (T1 und T4)

Humphreys et al. führten eine Studie durch, bei der DNA-Brüche und oxidierte Purine in Lymphozyten unterschiedlicher Altersgruppen (20-35, 63-70 bzw. 75-82 Jahre) mit Hilfe des Comet Assay gemessen wurden. Weiters wurden auch durch H_2O_2 induzierte DNA-Brüche gemessen. Diese geben einen Hinweis auf den antioxidativen Status der Zelle. Die Lymphozyten der ältesten Gruppe erlitten signifikant weniger H_2O_2-induzierte Brüche, verglichen mit den jüngeren Altersgruppen. Andere Berichte von Humanstudien ergeben ein sehr unterschiedliches Bild. Eine Studie zeigte keine Veränderung der H_2O_2-Resistenz mit dem Alter (Humphreys et al., 2007).
Eine Studie von Mutlu-Türkoğlu et al. ergab bei älteren Personen (61-85) eine signifikante Korrelation zwischen Alter und endogenen DNA und H_2O_2-induzierten Schäden (Mutlu-Türkoğlu et al., 2003). Diese erhöhten H_2O_2-induzierten Schäden könnten durch unzureichende Ernährung bei älteren Personen verursacht werden. Manche Forscher haben auch von einem verringerten totalen antioxidativen Status im Plasma bei älteren Personen berichtet (Aejmelaeus et al., 1997).
Anhand unserer Daten kann man die Studie von Humphreys et al. nicht belegen, da die Werte im Alter steigen. Die erhöhten Schäden könnten am verringerten antioxidativen Status oder auch der inadequaten Ernährung bei älteren Personen liegen (Mutlu-Türkoğlu et al., 2003). Die Werte der jüngsten Gruppe sind wegen der geringen Probandenanzahl nicht sehr aussagekräftig.

14.4.5 DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG, aufgeteilt nach Interventionsgruppen (T4)

Durch die Untersuchung mit FPG wird der Comet Assay sensitiver und spezifischer. Dabei werden bestimmte Arten von Schäden erkannt und Brüche erzeugt, wodurch man dann 8-Oxoguanin bzw. andere oxidierte Purine nachweisen kann (Collins, 2004). Wie in Abbildung 17 ersichtlich, sind die DNA-Schäden in allen Interventionsgruppen zwischen Zeitpunkt T1 und T4 gestiegen. In der Trainingsgruppe um 16,42%, in der Gedächtnisgruppe um 15,96% und in der Trainings- und Ernährungsgruppe nur sehr geringfügig.

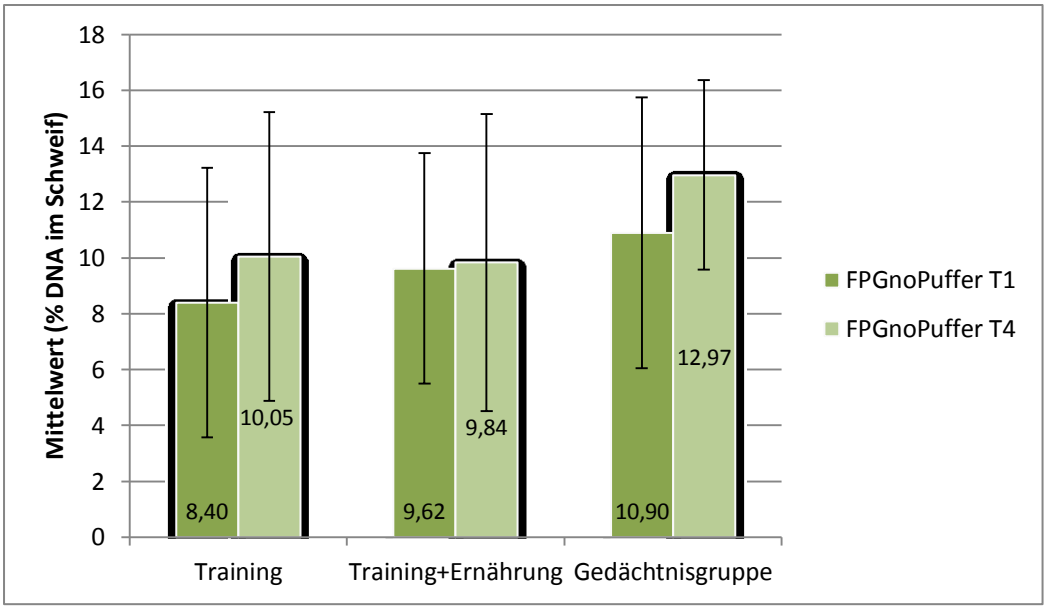

Abbildung 17: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG in allen Interventionsgruppen (T1 und T4)

Ein paar Studien untersuchten die Beziehung zwischen der subjektiven Beurteilung von Stress und der DNA-Integrität. Irie et al. gaben japanischen Arbeitern, während ihrer üblichen Arbeitsbelastung bei gemäßigter Auslastung, Fragebögen. Im Laufe der Woche wurden in der Früh, für die Bestimmung der 8-OHdG Konzentration in peripheren Blutleukozyten, Blutproben genommen.

Obwohl Frauen durchschnittlich etwa 40 Minuten weniger pro Tag arbeiteten als Männer, wurden bei den Frauen die sich unter hohem psychischen Stress fühlten (primäre Bewertung), signifikant höhere Werte an 8-OHdG beobachtet, als bei Frauen unter moderatem oder leichtem Stress. Zudem litten jene, die fühlten, dass dieser Stress unmöglich zu bewältigen war (sekundäre Bewertung), wahrscheinlicher an verhältnismäßig höheren DNA-Schäden. Bei den Männern waren die psychologischen Faktoren ohne Beziehung zu DNA-Schäden (Irie et al., 2001b).

In diesen Fragebögen wurden die Teilnehmer nicht über die häusliche Situation befragt und unter Umständen könnten die oxidativen DNA-Schäden bei Frauen durch die Verpflichtung mit Haushalt und Kinderbetreuung oder der Konflikt mit der Arbeit beeinflusst werden. Diese Studie kontrollierte auch verschiedene Störfaktoren durch Beschränkung von Teilnehmern die rauchten oder Alkohol konsumierten, oder die eine eigene oder familiäre Vergangenheit mit Krebs hatten (Gidron et al., 2006). Wie schon weiter oben erwähnt, könnten vermehrtes körperliches Training oder Probleme und Stress zu erhöhtem oxidativen Stress bzw. DNA-Schäden geführt haben (Wagner et al., 2011).

14.4.6 DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG, aufgeteilt nach Alterskategorien (T4)

Wie in Abbildung 18 sichtbar, sind die Werte in den beiden älteren Gruppen vom ersten auf den vierten Zeitpunkt angestiegen. In der mittleren um 17,76% und in der Altersgruppe >85 sogar signifikant (p=0,033) um 20,96%. In der jüngsten Gruppe sind die Schäden dagegen um 19,79% gesunken.

Bei der oben erwähnten Studie von Humphreys et al. wurden auch geschädigte Basen (insbesondere 8-Oxoguanin) mit Hilfe von FPG gemessen. Es hat sich gezeigt, dass die beiden jüngeren Altersgruppen die gleichen Mittelwerte an Schäden hatten, wohingegen die älteste Gruppe signifikant höhere Schäden aufwies. Dies könnte auf den Anstieg der ROS bzw. das Alter der Mitochondrien, mit zunehmendem Alter, zurückzuführen sein (Humphreys et al., 2007).

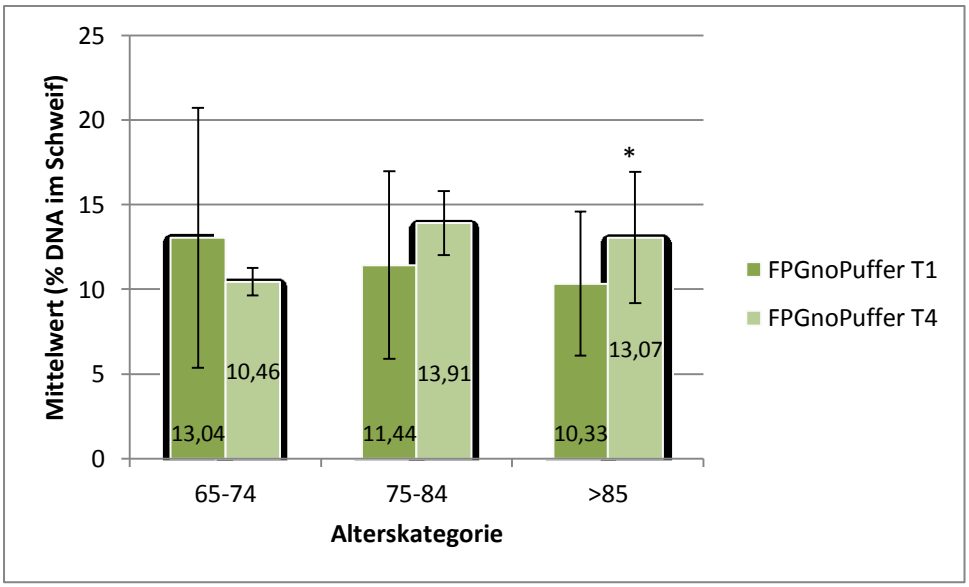

Abbildung 18: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG in der Gedächtnisgruppe (T1 und T4)

Der Großteil der veröffentlichen Berichte über die DNA-Reparatur bei Menschen, in Abhängigkeit vom Alter, befassen sich mit der Wiederverknüpfung von Strangbrüchen, die in Lymphozyten durch Behandlung mit H_2O_2 induziert werden. Turner et al. zeigten keine Unterschiede bei der Reparatur-Kinetik über einen Altersbereich von 0-89 Jahren (Turner et al., 1982). Barnett und King berichteten von einer langsameren Reparatur der Strangbrüche bei 65-69-Jährigen im Vergleich zu 35-39-Jährigen (Barnett und King, 1995).

Während Strangbrüche relativ schnell durch Ligation repariert werden, können beschädigte Basen nur langsam durch Basenexzision wieder in Stand gesetzt werden. Der kritische Schritt hierbei ist die Erkennung und Entfernung der beschädigten Base durch eine spezifische Glykosylase, im Fall von 8-Oxoguanin ist das die 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase (OGG1). Humphreys et al. fanden in ihrer Studie einen signifikanten Anstieg der Enzymaktivität mit dem Alter, d.h. die älteste Gruppe hatte die höchste OGG1-Aktivität (Humphreys et al., 2007).
Die Hypothese, die dieser Studie zugrunde liegt, ist die steigende genetische Instabilität mit dem Alter (insbesondere Instabilität, die oxidativen Stress reflektiert) und daher höhere Level an DNA-Schäden, geringere Level an antioxidativem Schutz und/oder eine geringere Kapazität für die DNA-Reparatur bei älteren Personen. Sie fanden deutlich mehr oxidierte Basen in der Lymphozyten-DNA bei der ältesten Gruppe. Dies ergibt sich vermutlich aus einem Anstieg der ROS sowie dem Mitochondrienalter (Humphreys et al., 2007).
Paradoxerweise war die Resistenz gegen oxidative Schäden in vitro und die Reparatur von 8-Oxoguanin in der ältesten Gruppe am höchsten. Zunächst ist es möglich, dass es im Alter zu einer Anregung der antioxidativen Abwehr und DNA-Reparatur kommt, als Reaktion auf vermehrten oxidativen Stress (mehr ROS), da die Mitochondrien immer undichter werden und so mehr reaktiven Sauerstoff freigeben. Bei 17-Monate alten Ratten fand man, im Gegensatz zu 1-Monat alten Ratten, eine Erhöhung der meisten antioxidativen Enzymaktivitäten in verschiedenen Organen (Humphreys et al., 2007). Bei Humanstudien gibt es sehr unterschiedliche Ergebnisse, aber es wurden eher verringerte Aktivitäten der Enzyme mit steigendem Alter festgestellt (Ceballos-Picot et al., 1992). Eine zweite Möglichkeit wäre, dass die Personen der ältesten Gruppe schon früher in ihrem Leben eine relativ hohe antioxidative Abwehr und DNA-Reparatur hatten, verglichen mit denen, die dieses Alter nicht erreichten (Humphreys et al., 2007).

14.4.7 Korrekturfaktoren

Da es in dem Zeitraum von Oktober 2011 bis August 2012 zu einer signifikanten Abnahme der Enzymtätigkeit von FPG kam, wurde anhand der mitgeführten Kontrollprobe ein Korrekturfaktor von 2,09 berechnet.

14.5 Ergebnisse zum Zeitpunkt T5 (Einfluss einer 18-monatigen Intervention)

14.5.1 DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse, aufgeteilt nach Interventionsgruppen (T5)

In der Gedächtnisgruppe kam es zwischen T1 und T5 zu einer Verringerung der Schäden um 3,53% und von T4 auf T5 blieben die Werte gleich. Bei der Trainingsgruppe veränderte sie sich zwischen T1 und T5 um nur 3,4% und zwischen T4 und T5 stiegen die Schäden um 6,54%. Hingegen erhöhten sich die Schäden in der Trainings- und Ernährungsgruppe von T4 auf T5 um 26,17% an (p=0,055) und von T1 auf T5 um 10,24%. Letztendlich waren nur die Werte der Trainings- und Ernährungsgruppe bei der letzten Messung höher als zu Beginn der Studie. Bei den beiden anderen beiden Gruppen änderten sie sich nicht wesentlich.

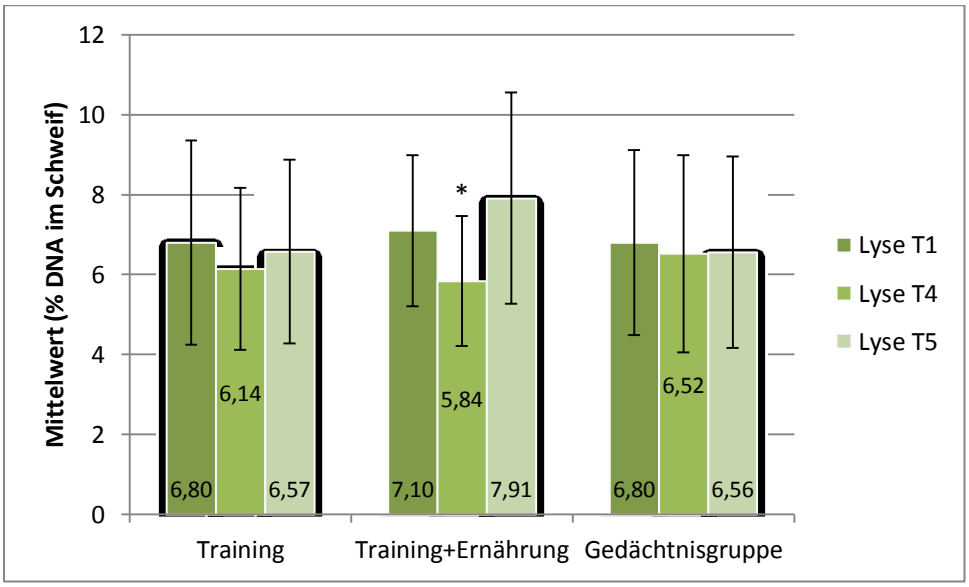

Abbildung 19: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse in allen Interventionsgruppen (T1, T4 und T5)

Manche Studien haben gezeigt, dass sich die Konzentrationen von diätetischen Antioxidantien bei den älteren Personen verringern, da die Adsorptionsrate sinkt und sie auch über die Nahrung weniger aufnehmen. In einer Studie waren Plasma Carotinoide bei der ältesten Gruppe am geringsten, und auch die Plasmakonzentration von Vitamin C ist durch eine verminderte Adsorption und Verwertung verringert. Wohingegen Tocopherole und Retinol in der Studie von

Humphreys et al. mit dem Alter anstiegen. Es wurde auch gezeigt, dass sich eine Supplementierung nicht signifikant auf DNA-Schäden, DNA-Reparatur oder H_2O_2-Resistenz auswirkte (Humphreys et al., 2007).

14.5.2 DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse, aufgeteilt nach Alterskategorien (T5)

Betrachtet man die Schäden in der Gedächtnisgruppe, aufgeteilt nach Alterskategorien, sieht man, dass sich die Schäden in der jüngsten Altersgruppe (65-74 Jahre) zwischen T1 und T5 um 40,23% und von T4 auf T5 sogar um 42,16% verringert haben. Hierbei gab es also einen deutlichen Unterschied zwischen Beginn und Ende der Studie, wobei aber wieder zu beachten ist, dass nur 2 Probanden in die Berechnung einbezogen wurden. Bei der mittleren Altersgruppe (75-84 Jahre) kam es allerdings zu einem Abfall der Schäden von T1 auf T5 um 3,15% und von T4 auf T5 stiegen sie um 4,04%. In der Gruppe der über 85-Jährigen erhöhten sich die Werte von T1 auf T5 um 3,72% und von T4 auf T5 um 5,11%. Keine der Veränderungen war signifikant.

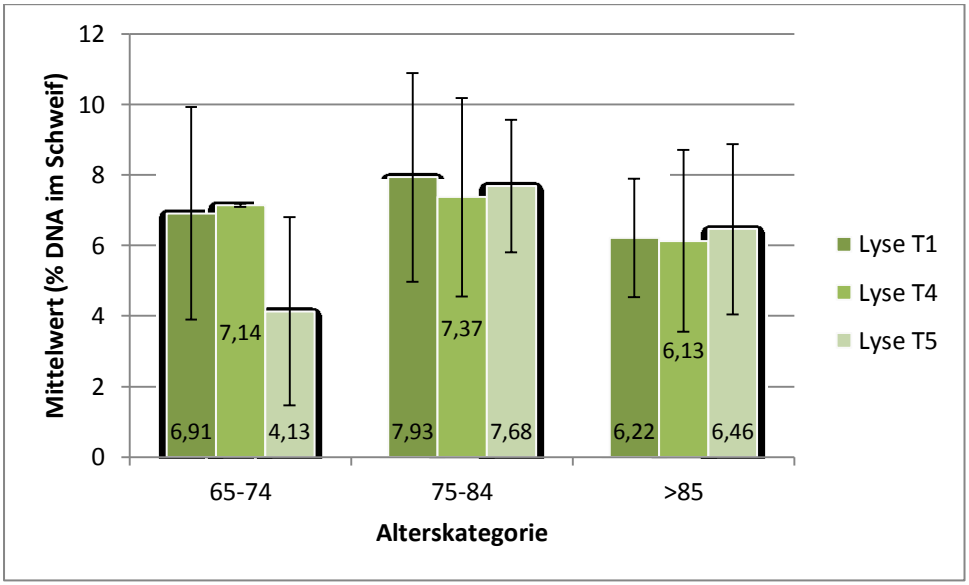

Abbildung 20: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit Lyse in der Gedächtnisgruppe (T1, T4 und T5)

In Abbildung 20 kann erkannt werden, dass die Schäden der ältesten Gruppe im Durchschnitt geringer sind, als die der mittleren Gruppe. Dies könnte wie schon oben erwähnt daran liegen, dass diese Personen, als sie jung waren, eventuell höhere

antioxidative Abwehr und bessere DNA-Reparatur hatten und das diese im Alter, durch hohe Level an ROS, wieder angeregt wurden (Humphreys et al., 2007).

14.5.3 DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2, aufgeteilt nach Interventionsgruppen (T5)

Nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid erhöhten sich die Werte in der Gedächtnisgruppe zwischen T1 und T5 um 4,85% und sanken von T4 auf T5 um 2,33%. In der Trainingsgruppe war es genauso, dass sich die Schäden von T1 auf T5 erhöhten (7,86%) und von T4 auf T5 wieder verringerten (5,67%). In der Trainings- und Ernährungsgruppe kam es jeweils zu einem geringen Anstieg der Schäden. In der folgenden Abbildung ist ersichtlich, dass es in der Gedächtnisgruppe zwischen Beginn und Ende der Studie einen geringen, nicht signifikanten Anstieg der Schäden gibt.

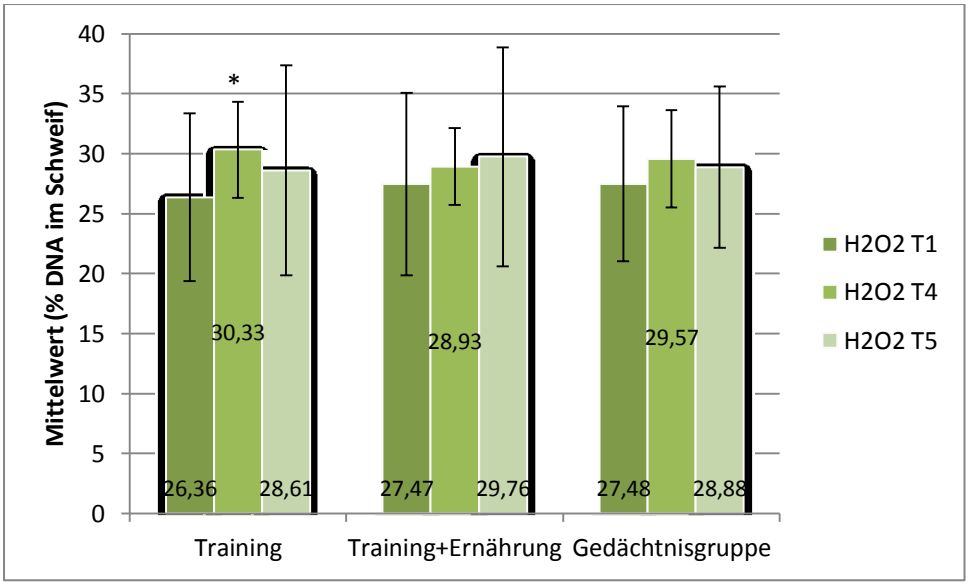

Abbildung 21: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2 in allen Interventionsgruppen (T1, T4 und T5)

Es wäre möglich, dass unsere Probanden unter Stress litten. Denn Cortisol erhöht sich als Reaktion auf akuten und chronischen Stress. Cortisol steigert kurzfristig die Kapazität für effiziente Reaktionen auf Stress, während es langfristig die Anfälligkeit für altersbedingte Krankheiten erhöht (Aschbacher et al., 2013). Kombinierte Effekte von Cortisol führen zu erhöhtem oxidativen Stress, wodurch die mitochondriale

Produktion von ROS das antioxidative Potential übersteigt und zu Schäden an Lipiden, DNA usw. führt.
Eine in vitro Studie mit Fibroblasten von Mäusen zeigte, dass Corticosteroide DNA-Schäden induzieren, DNA-Reparatur verringern und die Expression von einigen Genen regulieren, die mit der Reaktion auf DNA-Schäden verbunden sind. Die Behandlung mit Corticosteroiden und chronischem Stress zeigte eine reduzierte antioxidative Abwehr in Gehirn, Leber und Herz von Ratten. Die langfristige Behandlung beeinflusste verschiedene Messungen der mitochondrialen Funktion negativ (Oxidation, Membranpotential), wodurch das vermehrte Austreten von ROS während der mitochondrialen Atmung vermutet werden könnte. Das Resultat daraus ist eine Erhöhung der oxidativen Schäden an DNA und RNA (Joergensen et al., 2011). Der Abfall der Schäden in der Trainingsgruppe zwischen T4 und T5 könnte daran liegen, dass sich die Gruppe, da sie nicht mehr betreut wurden, weniger körperlich bewegt hat, wodurch auch die Belastung mit oxidativen Stress verringert wurde.

14.5.4 DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2, aufgeteilt nach Alterskategorien (T5)

Nach Aufteilung der Gedächtnisgruppe in Alterskategorien kam es zu deutlicheren Veränderungen. Bei den 65-74-Jährigen sanken die DNA-Schäden zuerst um 8,26% von T1 auf T5) und stiegen dann wieder von T4 auf T5 um 4,95%. In der mittleren Altersgruppe kam es jeweils zu einer Verringerung der Schäden. Zuerst um 11,85% (T1-T5) und dann sogar von 17,96% (T4-T5). In der Gruppe der über 85-Jährigen kam es von T1 auf T5 zu einer Erhöhung von 16,44% und zwischen T4 und T5 auch zu einer Zunahme der Schäden von 6,57%. Es gab also bei jeder Altersgruppe eine Veränderung zwischen der ersten und letzten Messung, jedoch war keine signifikant.

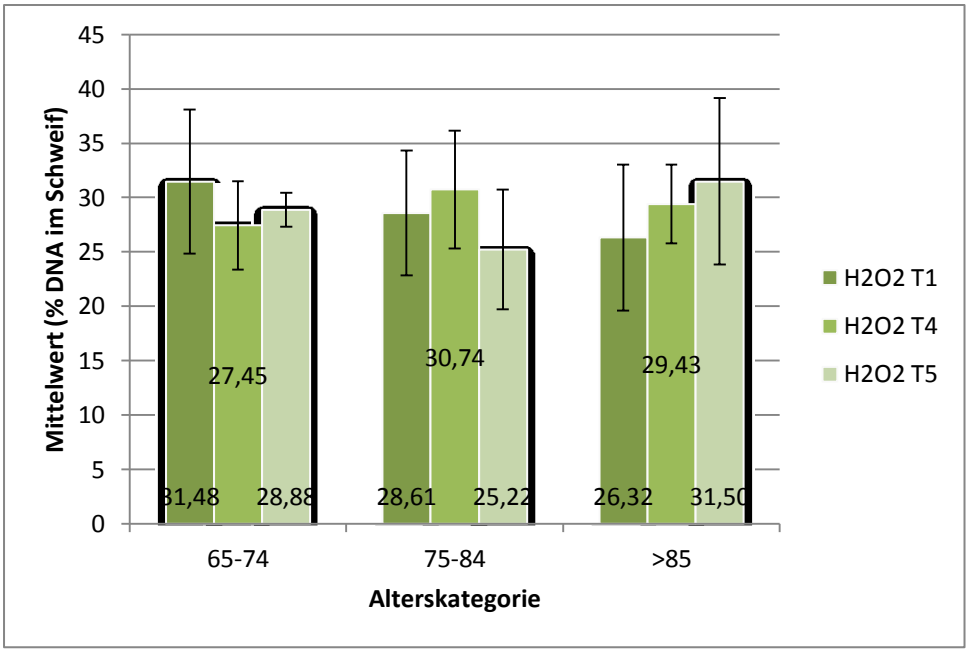

Abbildung 22: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit H_2O_2 in der Gedächtnisgruppe (T1, T4 und T5)

Eine Begründung für den Anstieg in der ältesten Gruppe wäre, dass es mit steigendem Alter zu einer verringerten Konzentration an Antioxidantien kommt. Die Adsorptionsrate verringert sich mit dem Alter und Lebensstilfaktoren führen dazu, dass die Personen allgemein weniger (gesunde) Nahrungsmittel zu sich nehmen. Es gab auch eine Studie über die DNA-Reparatur, wo gezeigt wurde, dass 65-69-Jährige eine langsamere Reparatur von Strangbrüchen aufwiesen als 35-39-Jährige. Dies könnte auch ein Grund für den Anstieg der DNA-Schäden in der ältesten Gruppe sein (Humphreys et al., 2007).

14.5.5 DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG, aufgeteilt nach Interventionsgruppen (T5)

Nach der Behandlung mit FPG kam es, außer in der Gedächtnisgruppe, zu einem Anstieg der Schäden, jedoch waren die Veränderungen in keiner Gruppe signifikant. In der Trainingsgruppe stiegen die Werte von T1 auf T5 um 20,15% und von T4 auf T5 nur sehr geringfügig. Ebenso war in der Trainings- und Ernährungsgruppe jeweils nur ein geringer Anstieg zu messen. In der Gedächtnisgruppe kam es von T1 auf T5 ebenfalls zu einer Verringerung um 15,23%, und von T4 auf T5 sogar um 28,76%. Anhand der folgenden Abbildung sieht man auch, dass sich die Schäden der Gedächtnisgruppe zwischen der ersten und vierten Messung erhöhten. Aber im

Gegensatz zu den beiden anderen Gruppen, kam es von T1 auf T5 bzw. T4 auf T5 jeweils zu einem Rückgang der Schäden.

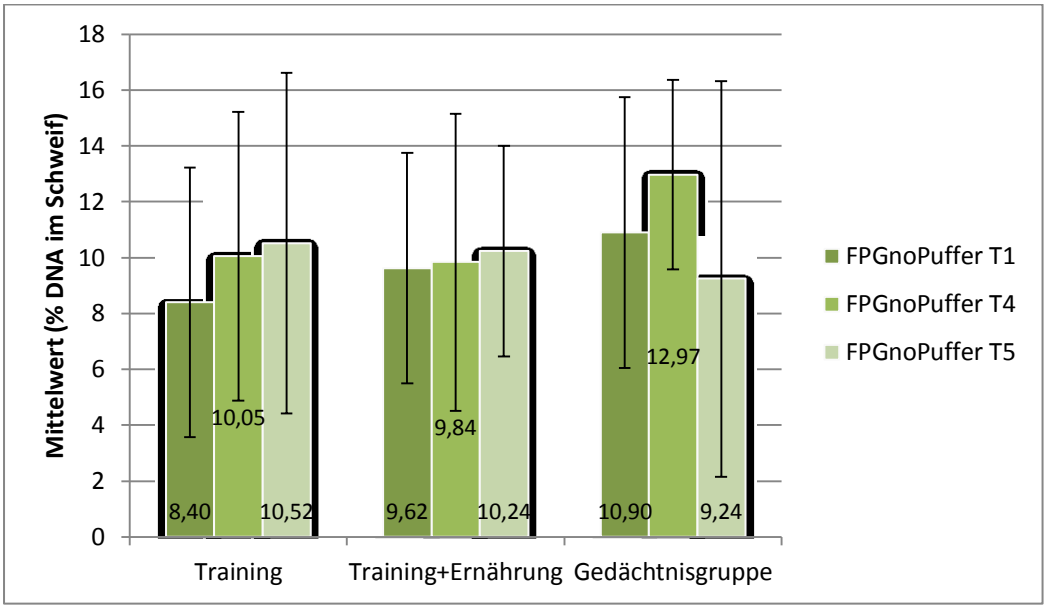

Abbildung 23: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG in allen Interventionsgruppen (T1, T4 und T5)

Vorangegangene Forschungen haben eine Vielzahl an Indikatoren für soziale Isolation identifiziert, die Gesundheitsrisiken darstellen, beispielsweise allein lebend, ein kleines soziales Netzwerk, seltene Teilnahme an sozialen Aktivitäten und Gefühle der Einsamkeit (Berkman und Syme, 1979; Dean et al., 1992; Hawkley et al., 2006; Krause, 1987; Thoits und Hewitt, 2001). Es gab eine Studie, bei der Gesundheitsrisiken, wie Zigaretten rauchen und Übergewicht, in Verbindung mit sozialer Isolation, verglichen wurden. Personen, denen soziale Bindungen fehlten oder sich häufig einsam fühlten, litten an einer höheren Morbidität und Mortalität, sowie Infektionen, Depression und einer Verringerung der kognitiven Fähigkeiten. Jedoch weiß man im Gegensatz zu den genannten Risiken nicht, wie und warum die soziale Isolation die Gesundheit beeinflusst (Cornwell und Waite, 2009).

Es wäre möglich, dass die Personen der Gedächtnisgruppe eventuell mehr in die soziale Gesellschaft eingebunden waren bzw. durch die regelmäßigen Treffen mit der Gruppe, die sie vielleicht auch nach der Intervention weitergeführt haben, mehr Unterstützung bei der Bewältigung von Problemen bzw. Stress bekamen (Cornwell und Waite, 2009). Der Anstieg in den anderen Gruppen könnte auch daran liegen, dass sie ihre Trainingseinheiten unregelmäßiger durchführten.

14.5.6 DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG, aufgeteilt nach Alterskategorien (T5)

Bei der Aufteilung der Gedächtnisgruppe nach Alterskategorien kam es bei der jüngsten Gruppe zu einem Anstieg der DNA-Schäden und bei den Älteren zu einem Rückgang. Bei den 65-74 Jährigen stiegen die Schäden von T1 auf T5 um 15,05% und von T4 auf T5 um 31,86%. Hier ist wieder zu erwähnen, dass bei T5 nur zwei Probanden miteinbezogen werden. In der Gruppe der 75-84-Jährigen sinken die Werte zwischen T1 und T5 um 11,63% und von T4 auf T5 um 27,32%. In der ältesten Gruppe verringern sich die Schäden zwischen T1 und T5 um 33,40% und von T4 auf T5 sogar signifikant (p=0,043) um 47,36%. Bei den 75-84- bzw. >85-Jährigen waren die Schäden bei der letzten Messung niedriger als zu Beginn der Studie.

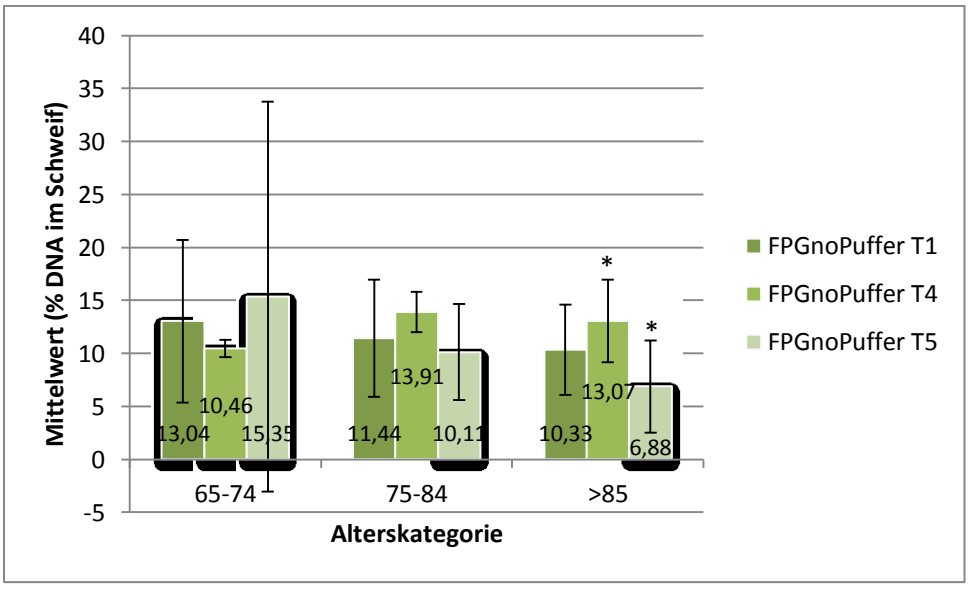

Abbildung 24: Mittelwerte der DNA-Schäden nach Behandlung mit FPG in der Gedächtnisgruppe (T1, T4 und T5)

In der bereits oben erwähnten Studie von Humphreys et al. wurde in der ältesten Gruppe (75-82 Jahre) die höchste Aktivität von OGG1 gefunden, wodurch vermutlich auch die vorher entstandenen Schäden in der Gruppe 75-84 und >85 wieder repariert werden konnten (von T4 auf T5). Weiters könnten diese Personen eventuell schon, als sie noch jung waren, eine höhere antioxidative Abwehr und bessere DNA-Reparatur gehabt haben und diese wurden durch hohe Konzentrationen an ROS im Alter wieder angeregt (Humphreys et al., 2007).

14.6 Zusammenfassung der Ergebnisse (T1, T4 und T5)

	Training	Training+Ernährung	Gedächtnistraining
Lyse T1	6,8 ± 2,56	7,10 ± 1,89	6,80 ± 2,31
Lyse T4	6,14 ± 2,03	5,84 ± 1,62 *	6,52 ± 2,46
Lyse T5	6,57 ± 2,30	7,91 ± 2,64 **	6,56 ± 2,39
H_2O_2 T1	26,36 ± 7,00	27,47 ± 7,59	27,48 ± 6,45
H_2O_2 T4	30,33 ± 4,01 *	28,93 ± 3,20	29,57 ± 4,05
H_2O_2 T5	28,61 ± 8,77	29,76 ± 9,12	28,88 ± 6,74
FPGnoPuffer T1	8,40 ± 4,82	9,62 ± 4,13	10,90 ± 4,84
FPGnoPuffer T4	10,05 ± 5,16	9,84 ± 5,33	12,97 ± 3,40
FPGnoPuffer T5	10,52 ± 6,10	10,24 ± 3,77	9,24 ± 7,10

Tabelle 7: Mittelwerte der DNA-Schäden in allen Gruppen zu den Zeitpunkten T1, T4 und T5 (* = T1-T4, ** = T4-T5)

In Tabelle 7 sieht man nochmals alle Werte der Interventionsgruppen auf einen Blick. Dabei kann man feststellen, dass sich die Mittelwerte aller Gruppen nicht wesentlich voneinander unterscheiden und es teilweise hohe Standardabweichungen gibt.
In Tabelle 8 sieht man die Mittelwerte der Alterskategorien in der Gedächtnisgruppe. Meistens sind die Werte zwischen den Zeitpunkten T1 und T4 gestiegen und dann auf den Zeitpunkt T5 wieder gesunken, manchmal auch unter den Ausgangswert, jedoch ohne Signifikanz. Vor allem bei der FPG-Behandlung in der Gruppe der >85-Jährigen war der Anstieg von T1 auf T4 und das Absinken der DNA-Schäden von T4 auf T5 signifikant. Die Bewertung ist aber schwierig, da in der jüngsten Gruppe nur zwei Personen, bei den 75-84-Jährigen fünf und den über 85-Jährigen sieben Personen beteiligt waren.

	65 - 74	75 - 84	> 85
Lyse T1	6,91 ± 3,01	7,26 ± 2,20	6,22 ± 1,68
Lyse T4	7,14 ± 0,04	5,98 ± 0,61	5,47 ± 1,28
Lyse T5	4,13 ± 2,67	7,68 ± 1,88	5,78 ± 1,75
H_2O_2 T1	31,48 ± 6,64	28,61 ± 5,75	26,32 ± 6,72
H_2O_2 T4	27,45 ± 4,08	30,74 ± 5,43	29,43 ± 3,63
H_2O_2 T5	28,88 ± 1,56	25,22 ± 5,51	31,50 ± 7,65
FPGnoPuffer T1	13,04 ± 7,68	11,44 ± 5,53	10,33 ± 4,25
FPGnoPuffer T4	10,46 ± 0,81	13,91 ± 1,88	13,07 ± 3,88 *
FPGnoPuffer T5	15,35 ± 18,41	10,11 ± 4,53	6,88 ± 4,34 **

Tabelle 8: Mittelwerte der DNA-Schäden in den Alterskategorien in der Gedächtnisgruppe zu den Zeitpunkten T1, T4 und T5 (* = T1-T4, ** = T4-T5)

15. Schlussbetrachtung

Die genannten Studien zu DNA-Schäden im höheren Alter zeigen alle sehr unterschiedliche Ergebnisse. Die meisten bestätigen, dass die Menge an DNA-Schäden mit dem Alter ansteigt, hingegen zeigen manche Studien das Gegenteil bzw. eine erhöhte Aktivität von Enzymen (Humphreys et al., 2007). Diese widersprüchlichen Ergebnisse spiegeln sich auch in der vorliegenden Arbeit wieder. Zum Zeitpunkt vier verringerten sich die Schäden bei Behandlung mit Lyse in allen drei Interventionsgruppen, jedoch sind sie bei Behandlung mit FPG und H_2O_2 angestiegen. Anhand der Zusammenfassung der Ergebnisse kann man sehen, dass die Werte beim letzten Zeitpunkt nicht signifikant höher waren, als zu Beginn der Studie. Eine Ausnahme war dagegen die Gedächtnisgruppe bei Behandlung mit FPG. Denn hier sanken die Werte von T4 auf T5 um 28,74% bzw. auch von T1 auf T5 um 15,23%. Im Gegensatz dazu stiegen die Schäden der Trainingsgruppe von T1 auf T5, um 20,15%.
Der Vergleich zwischen den Alterskategorien in der Gedächtnisgruppe zeigt eine unterschiedliche Anzahl an DNA-Schäden. Manchmal haben die jüngeren Personen weniger Schäden, manchmal die Älteren. Wie aber schon bei Punkt 14.6 erwähnt, waren nicht so viele Personen in den Gruppen vorhanden, wodurch die Interpretation noch schwieriger wird. Signifikant war aber die Verringerung der DNA-Schäden nach FPG-Behandlung bei der Gruppe über 85 Jahre, die Schäden sanken von T4 auf T5 um 47,4%. In der mittleren Altersgruppe sanken die Werte um 27,3%, wohingegen sie in der jüngsten Gruppe um 31,9% stiegen.

Die Interpretation der Daten ist sehr schwierig, da viele andere Faktoren ebenfalls Einfluss auf die Entstehung von oxidativen DNA-Schäden haben. Es wäre möglich, dass die Probanden ohne Gruppe nicht mehr so fleißig bzw. unregelmäßiger trainierten. Da auch chronischer Stress zu Schäden führen kann (Gidron et al., 2006), könnte psychischer Stress der Probanden, durch uns unbekannte Faktoren wie Familienprobleme oder die Belastung durch eine Erkrankung, zu vermehrten oxidativen Schäden führen. Ein Grund dafür könnte das Stresshormon Cortisol sein. In Zellkulturmodellen zeigte eine kurzzeitige Verabreichung von hochdosiertem Cortisol eine verbesserte mitochondriale Funktion und neuroprotektive Wirkung, wohingegen eine langfristige Gabe von hochdosiertem Cortisol eine dramatische

Verringerung der mitochondrialen Funktion und den Zelltod fördert (Aschbacher et al., 2013).

Für die Interpretation wäre es hilfreich, etwas über die Vergangenheit der Bewohner zu wissen. Wie haben sie gelebt, haben sie Sport betrieben, wie haben sie sich ernährt, würden sie ihr (Berufs-) Leben als stressig empfinden, etc. Denn all diese (Umwelt-) Einflüsse, sowie Alter, Geschlecht und genetische Prädisposition haben Einfluss auf die neurohormonelle Stressverarbeitung, wodurch es zu großen interindividuellen Schwankungen der Stressempfindlichkeit bzw. Widerstandsfähigkeit der Zellen bzw. der DNA kommt (Jørgensen, 2013).
Bestimmten Arten von physiologischem Stress, wie regelmäßiges Training, sind dafür bekannt, dass sie langfristig die Verringerung der zirkulierenden Indikatoren für oxidative Schäden fördern, offensichtlich infolge der Hochregulierung von Antioxidantien und anderen zellschützenden Mechanismen. Rein spekulativ wäre es vorstellbar, dass geringer bis mäßiger episodischer psychischer Stress die psychobiologische Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativen Schäden, auf ähnliche Weise wie Training, verbessern könnte (Aschbacher et al., 2013).
Die Aspekte von sozialer Verbundenheit, wie die Integration in ein soziales Netzwerk, können auch gesunde Verhaltensweisen fördern, was wiederum zu besseren Gesundheitsergebnissen führt. Von Personen wahrgenommene soziale Vereinsamung könnte, durch seinen Einfluss auf die psychische Gesundheit, auch die körperliche Gesundheit beeinflussen (Cornwell und Waite, 2009).

16. Zusammenfassung

Mit zunehmender Evidenz wird gezeigt, dass sich DNA-Schäden und Mutationen mit dem Alter im Körper vermehren. Dies könnte daran liegen, dass die genetische Instabilität mit dem Alter steigt, was wiederum zu einem höheren Level an DNA-Schäden, einer geringeren Konzentration an antioxidativem Schutz und/oder einer geringeren Kapazität für die DNA-Reparatur führt. Ältere Personen haben deutlich mehr oxidierte Basen in der Lymphozyten-DNA. Dies könnte sich aus dem steigenden Alter der Mitochondrien sowie einem Anstieg an ROS ergeben. Die DNA-Reparaturwege sind wichtig für ein langes Leben und Fehler oder Schäden an diesen Wegen haben das Potential, frühzeitige Alterung zu verursachen. Aufgrund dessen können DNA-Schäden und Mutationen den Alterungsprozess, entweder direkt oder möglicherweise indirekt durch Induktion von Apoptose oder Zellalterung, stark beeinflussen.

Mit Hilfe des Comet Assay wurden DNA-Schäden von institutionalisierten Pensionisten, nach Behandlung mit Lyse, FPG und H_2O_2 gemessen. Aufgeteilt wurden die Personen in folgende Gruppen: Training, Training und Ernährung bzw. Gedächtnistraining. Die Studie erstreckte sich über einen Zeitraum von 18 Monaten und es wurden zu Beginn (T1), nach 3 (T2), 6 (T3), 12 (T4) und 18 (T5) Monaten verschiedene Untersuchungen durchgeführt.
Wie schon in der Literatur zu sehen, waren auch die Ergebnisse dieser Arbeit sehr heterogen. Der Vergleich zwischen den Gruppen zeigte keine großen Unterschiede und wenn man die Anfangs- und Endwerte gegenüberstellt, sieht man meist einen nicht signifikanten Anstieg der DNA-Schäden. Eine Ausnahme sind die Werte nach FPG-Behandlung in der Gedächtnistrainingsgruppe, denn hier sanken die Werte von der ersten Messung (T1) auf die letzte Messung (T5) und von der vorletzten Messung (T4) auf die Letzte (T5). Auch nach Aufteilung der Gedächtnistrainingsgruppe in Alterskategorien sind die Schäden (nach Behandlung mit FPG) bei der Gruppe >85 Jahre niedriger, als bei den jüngeren Personen.
Mögliche Gründe sind ein besserer Umgang mit Stress, durch die Einbindung in ein soziales Netzwerk oder höhere Enzymaktivität mit steigendem Alter. Es sind auf jeden Fall weitere Studien erforderlich, die auf die genauen Mechanismen eingehen, wie sich kognitives Training, soziale Strukturen und Stress, auf die DNA auswirken können.

17. Abstract

Increasing evidence shows, that DNA damage and mutations accumulate with age. This could be due to the genetic instability which increases with age, which in turn leads to a higher level of DNA damage, lower antioxidative protection and/or a lower capacity for DNA repair. Older people have much more oxidized bases in the DNA of lymphocytes. This could result from the increasing age of the mitochondria and an increase in ROS. The DNA repair pathways are important for a long life but damage in these pathways have the potential to induce premature aging. Therefore, DNA damage and mutations can strongly influnce the aging process, either directly or indirectly, possibly by induction of apoptosis or cell aging.

Using the Comet assay, DNA damage of institutionalized pensioners was measured after treatment with lysis, FPG and H_2O_2. The subjects were divided into the following groups: training, training and nutrition and memory training. The study extended over a period of 18 months and there were at the beginning (T1), after 3 (T2), 6 (T3), 12 (T4) and 18 (T5) months various examinations implemented.
Similar to literature, the results of the presented work were inconsistent. Comparison between the groups showed no significant differences between initial and final values. Exceptions are the values after FPG treatment in the memory training group, because here the values decreased from the first measurement (T1) to the last measurement (T5) and from the second last measurement (T4) to the last (T5), but not significantly.
Even after dividing the memory training group in age categories, the damage (after FPG treatment) in the group >85 years is lower than in younger people. Possible reasons are a better handling of stress, by beeing engaged in a social network or higher enzyme activity with age. There are definitely more studies needed, that address the exact mechanisms such as cognitive training, social structures and stress, and their effects on the DNA.

18. Literaturverzeichnis

Aejmelaeus R.T., Holm P., Kaukinen U., Metsa-Ketela T.J.A., Laippala P., Hervonen A.L., Alho H.E.R. Age-related changes in the peroxyl radical scavenging capacity of human plasma. *Free Radical Biology & Medicine 1997*; 23: 69-75.

Adachi S., Zeisig M., Möller L. Improvements in the analytical method for 8 hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA. *Carcinogenesis 1995*; 16 (2): 253-8.

Al-Gubory K. H., Fowler P. A., Garrel C. Review: The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2010; 42*: 1634-1650.

Arbeitsgemeinschaft des Mindwell-Projekts: Verbesserung der Lernfähigkeit und mentalen Gesundheit älterer Menschen. Handbuch für das Gedächtnistraining älterer Menschen 2010.

Aschbacher K., O'Donovan A., Wolkowitz O. M., Dhabhar F. S., Su Y., Epel E. Good stress, bad stress and oxidative stress: Insights from anticipatory cortisol reactivity. *Psychoneuroendocrinology 2013; 38*: 1698-1708.

Atanackovic D., Brunner-Weinzierl M.C., Kröger H., Serke S., Deter H.C. Acute psychological stress simultaneously alters hormone levels, recruitment of lymphocyte subsets, and production of reactive oxygen species. *Immunology Investigations 2002*; 31 (2): 73-91.

Azqueta A., Shaposhnikov S., Collins A. R. Minireview: DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research 2009; 674*: 101-108.

Bandyopadhyay U., Das D., Banerjee R. K. Review article: Reactive oxygen species: Oxidative damage and pathogenesis. *Current Science 1999; 77 (5)*: 658-666.

Barnett Y.A., King C.M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutation Research 1995*; 338: 115-28.

Barzilai A., Yamamoto K.-I. Review: DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair 2004; 3*: 1109-1115.

Berkman L. F., Syme L. Social Networks, Host Resistance, and Mortality: A Nine-Year Follow-Up Study of Alameda County Residents. *American Journal of Epidemiology 1979;* 109: 186-204.

Biermann H., Weißmantel H. Regelkatalog SENSI-Geräte- Altersbedingte Beeinträchtigungen. Internet: http://www.emk.tu-darmstadt.de/~weissmantel/sensi/sensi.html (Stand: 25. September 2013).

Birben E., Sahiner U. M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. Review: Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal 2012; 5*: 9-19.

Buonocore G., Perrone S., Tataranno M. L. Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine 2010; 15*: 186-190.

Burton G. J., Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology 2011; 25*: 287-299.

Ceballos-Picot I., Trlvier J.-M., Nicole A., Sinet P.-M., Thevenin M. Age-Correlated Modifications of Copper-Zinc Superoxide Dismutase and Glutathione-Related Enzyme Activities in Human Erythrocytes. *Clinical Chemistry 1992*; 38 (1): 66 70.

Collins A. R. Review: The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Molecural Biotechnology 2004; 26 (3):* 249-261.

Collins A. R., Dobson V. L., Dušinská M., Kennedy G., Štětina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutation Research 1997; 375*: 183-193.

Cornwell E. Y., Waite L. J. Social Disconnectedness, Perceived Isolation, and Health among Older Adults. *Journal of Health and Social Behavior 2009; 50*: 31-48.

Cruz-Jentoft A. J., Baeyens J. P., Bauer J. M., Boirie Y., Cederholm T., Landi F., Martin F. C., Michel J-P., Rolland Y., Schneider S. M., Topinkova E., Vandewoude M., Zamboni M. Report: Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. *Age and Ageing 2010; 39*: 412-423.

Dean A., Kolody B., Wood P., Matt G.E. The Influence of Living Alone on Depression in Elderly Persons. *Journal of Aging and Health 1992;* 4: 3-18.

Dickerson S.S., Kemeny M.E. 2004. Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychological Bulletin 2004*; 130: 355-391.

Fairbairn D. W., Olive P. L., O'Neill K. L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/ Reviews in Genetic Toxicology 1995; 339*: 37-59.

Gidron Y., Russ K., Tissarchondou H., Warner J. The relation between psychological factors and DNA-damage: A critical review. *Biological Psychology 2006; 72*: 291-304.

Hagen T.M., Huang S., Curnutte J., Fowler P., Martinez V., Wehr C.M., Ames B.N., Chisari F.V. Extensive oxidative DNA damage in hepatocytes of transgenic mice with chronic active hepatitis destined to develop hepatocellular carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A. 1994*; 91 (26): 12808-12.

Halliwell B. Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of life science 2001*.

Han L., Mitchell J. R., Hasty P. DNA Double-Strand Breaks: A Potential Causative Factor for Mammalian Aging? *Mech Ageing Dev. 2008; 129:* 416-424.

Harris S. E., Deary I. J., MacIntyre A., Lamb K. J., Radhakrishnan K., Starr J. M., Whalley L. J., Shiels P. G. The association between telomere length, physical health, cognitive ageing, and mortality in non-demented older people. *Neuroscience Letters 2006; 406*: 260-264.

Hawkley L.C., Masi C.M., Berry J.D., Cacioppo J.T. Loneliness is a Unique Predictor of Age-Related Differences in Systolic Blood Pressure. *Psychology and Aging 2006;* 21: 152-64.

Humphreys V., Martin R. M., Ratcliffe B., Duthie S., Wood S., Gunnell D., Collins A. R. Age-related increases in DNA repair and antioxidant protection: A comparison of the Boyd Orr Cohort of elderly subjects with a younger population sample. *Age and Ageing 2007;36*: 521-526.

Irie M., Asami S., Nagata S., Miyata M., Kasai H. Psychological mediation of a type of oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in peripheral blood

leukocytes of non-smoking and non-drinking workers. *Psychotherapy and Psychosomatics 2002*; 71 (2): 90-6.

Irie M., Asami S., Nagata S., Ikeda M., Miyata M., Kasai H. Psychosocial factors as a potential trigger of oxidative DNA damage in human leukocytes. *Japanese Journal of Cancer Research 2001a*; 92 (3): 367-76.

Irie M., Asami S., Nagata S., Miyata M., Kasai H. Relationships between perceived workload, stress and oxidative DNA damage. *International Archives Occupational Environmental Health 2001b*; 74: 153-157.

Jacob R. A., Burri B. J. Oxidative damage and defense. The *American Journal of Clinical Nutrition 1996; 63*: 985S-990S.

Jaruga P., Zastawny T.H., Skokowski J., Dizdaroglu M., Olinski R. Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme activities in human lung cancer. *FEBS Letters 1994*; 341 (1): 59-64.

Joergensen A., Broedbaek K., Weimann A., Semba R. D., Ferrucci L., Joergensen M. B., Poulsen H. E. Association between Urinary Excretion of Cortisol and Markers of Oxidatively Damaged DNA and RNA in Humans. *PLoS ONE 2011; 6 (6): e20795*.

Jørgensen A. Oxidatively generated DNA/RNA damage in psychological stress states. *Danish Medical Journal 2013; 60 (7): B4685*.

Jorgensen A., Maigaard K., Wörtwein G., Hageman I., Henriksen T., Weimann A., Møller P., Loft S., Hau J., Poulsen H. E., Jorgensen M. B. Chronic restraint stress in rats causes sustained increase in urinary corticosterone excretion without affecting cerebral or systemic oxidatively generated DNA/RNA damage. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry 2013; 40*: 30-37.

Kempa S. M. *lifeline*. Internet: http://www.lifeline.de/ernaehrung-fitness/mentale-fitness/intelligenz-ist-beeinflussbar-id35506.html (Stand: 5. Dezember 2013)

Kirschbaum C., Pirke K.M., Hellhammer D.H. The 'Trier Social Stress Test'- a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology 1993*; 28: 76-81.

Kliegel M., Altgassen M., Martin M., Kruse A. Lernen im Alter: Die Bedeutung der selbstständigen Strukturierung des Lernmaterials. *Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie 2003; 36 (6)*: 421-428.

Krause N. Satisfaction with Social Support and Self-Rated Health in Older Adults. *The Gerontologist 1987;* 27: 301-08.

Lamy E. *Das Biotechnologie und Life Sciences Portal Baden-Württemberg*. Internet: http://www.bio-pro.de/magazin/wissenschaft/archiv_2008/index.html?lang=de&artikelid=/artikel/00366/index.html (Stand: 4. Dezember 2013)

Malins D.C., Haimanot R. Major alterations in the nucleotide structure of DNA in cancer of the female breast. *Cancer Research 1991*; 51 (19): 5430-2.

Miyamae Y., Zaizen K., Ohara K., Mine Y., Sasaki Y. F. Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutation Research 1997; 393*: 99-106.

Morley J. E., Argiles J. M., Evans W. J., Bhasin S., Cella D., Deutz N. E., Doehner W., Fearon K. C., Ferrucci L., Hellerstein M. K., Kalantar-Zadeh K., Lochs H., MacDonald N., Mulligan K., Muscaritoli M., Ponikowski P., Posthauer M. E., Rossi Fanelli F., Schambelan M., Schols A. M., Schuster M. W., Anker S. D. Nutritional recommendations for the management of sarcopenia. Journal of the *American Medical Directors Association 2010; 11* (6) 391-396.

Mota M. P., Peixoto F. M., Soares J. F., Figueiredo P. A., Leitão J. C., Gaivão I., Duarte J. A. Influence of aerobic fitness on age-related lymphocyte DNA damage in humans: relationship with mitochondria respiratory chain and hydrogen peroxide production. *AGE 2010; 32 (3):* 337-346.

Mutlu-Türkoğlu Ü., Ilhan E., Öztezcan S., Kuru A., Aykaç-Toker G., Uysal M. Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects. *Clinical Biochemistry 2003; 36*: 397-400.

National Research Council (USA): Diet and Health. Implications for Reducing Chronic Disease Risk. Washington DC. *National Academy Press 1989.*

Nutricia- FortiFit. Internet: http://www.fortifit.nutricia.at/index.php/home/produkte/fortifit/uebersicht (Stand: 17. Oktober 2013)

Oswald W. D. Frühdiagnose bei Demenzen: Normales versus pathologisches Altern - eine Schimäre? *neuro aktuell 2010; 8*: 24-28.

Prang E. *Österreichische Gesellschaft für Aktivierung und Gedächtnistraining*. Internet: http://www.aktivvernetzt.at/2012/12/20/man-lernt-nie-aus-ganzheitliches-gedachtnistraining-mit-heimbewohnerinnen/ (Stand: 28. Oktober 2013)

Rahman K. Review: Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging 2007; 2 (2)*: 219-236.

Roland A. *Gedächtnistraining in Münster*. Internet: http://www.gedaechtnistraining-muenster.de/konzentrations-training-kursangebote.php (Stand: 17. Oktober 2013)

Rollnik J.D., Karst M., Piepenbrock S., Gehrke A., Dengler R., Fink M. Gender differences in coping with tension-type headaches. *European Neurology 2003*; 50: 73–77.

Salmon A. B., Richardson A. Pérez V. I. Update on the oxidative stress theory of aging: Does oxidative stress play a role in aging or healthy aging? *Free Radical Biology & Medicine 2010; 48*: 642-655.

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology 1997; 82*: 291-295.

Sohal R. S. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology & Medicine 2002; 33*: 37-44.

Somes G. W., Kritchevsky S. B., Shorr R. I., Pahor M., Applegate W. B. Body Mass Index, Weight Change, and Death in Older Adults- The Systolic Hypertension

in the Elderly Program. *American Journal of Epidemiology 2002; 156*: 132-138.

Stahl W., Sies H. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine 2003; 24*: 345-351.

Statistik Austria- Die Informationsmanager. 2014a Internet: http://www.statistik.at/web_de/statistiken/bevoelkerung/index.html (Stand: 13. Jänner 2014)

Statistik Austria - Die Informationsmanager. 2013 Internet: http://www.statistik.at/web_de/statistiken/bevoelkerung/bevoelkerungsstruktur/bevoelkerung_nach_alter_geschlecht/ (Stand: 13. Jänner 2014)

Statistik Austria- Die Informationsmanager. 2014b Internet: http://www.statistik.at/web_de/statistiken/soziales/gender-statistik/demographie/043902.html (Stand: 11. April 2014)

Thoits P.A., Hewitt L.N. Volunteer Work and Well-Being. *Journal of Health and Social Behavior 2001* 42: 115-31.

Tice R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., Sasaki Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis 2000; 35*: 206-221.

Turner D.R., Griffith V.C., Morley A.A. Ageing in vivo does not alter the kinetics of DNA strand break repair. *Mechanisms of Ageing and Development 1982*; 19: 325–31.

Wagner K.-H., Reichhold S., Neubauer O. Impact of endurance and ultraendurance exercise on DNA damage. *Annals of the New York Academy of Sciences 2011; 1229:* 115-123.

Waters D. J., Shen S., Xu H., Kengeri S. S., Cooley D. M., Chiang E. C., Chen Y., Schlittler D., Oteham C., Combs G. F., Glickman L. T., Morris J. S., Bostwick D. G. Noninvasive Prediction of Prostatic DNA Damage by Oxidative Stress Challenge of Peripheral Blood Lymphocytes. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 2007; 16 (9):* 1906-1910.

WHO. *Physical status: the use and interpretation of anthropometry.* Report of a WHO Expert Commitee. WHO technical report series 854. Geneva 1995.

WHO. *World Health Organization 2004*. Internet: http://apps.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html (Stand: 9. Jänner 2014)

Wiseman H., Halliwell B. Review Article: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species : role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal 1996; 313*: 17-29.

Yamaguchi T., Shioji I., Sugimoto A., Yamaoka M. Psychological stress increases bilirubin metabolites in human urine. Biochemistry, *Biophysics Research Communications 2002*; 293: 517-520.

Wallner Marie-Luise, Bakk.

Schulbildung

seit 2011	Masterstudium Ernährungswissenschaften, Spezialisierung Lebensmittelqualität und -sicherheit, an der Universität Wien
2007 - 2011	Bakkalaureatsstudium Ernährungswissenschaften an der Universität Wien
2005 - 2007	Berufsreifeprüfung am BFI
2002 - 2005	Fachschule für Sozialberufe in Graz
1998 - 2002	Hauptschule in Krottendorf-Gaisfeld
1994 - 1998	Volksschule in St. Johann ob Hohenburg

Praktika und berufliche Praxis

seit August 2008	Geringfügige Beschäftigung bei der Firma Wallner
seit April 2013	Praktischer Teil der Masterarbeit im Labor • Comet Assay
Februar 2012	Institut für Ernährungswissenschaften • Auswertung von Gaschromatogrammen • Blutaufarbeitung
Juni/Juli 2010	AGES Graz • Lebensmittelmikrobiologie • HPLC • Bestimmung von Casein, Fett, etc.
Februar-März 2008	3 Wochen am Institut für Ernährungswissenschaften • Blutaufarbeitung

Kenntnisse

EDV- Kenntnisse

SPSS- Kenntnisse

Englisch (Maturaniveau)

Führerschein Klasse B