



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Die Mikrokernhäufigkeit bei institutionalisierten
SeniorInnen in Wien“

Verfasser

Klemens Johannes Krejci

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer: Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis	III
II. Tabellenverzeichnis	V
III. Abkürzungsverzeichnis	VI
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht.....	2
2.1 Der Cytokinesis-Block-Micronucleus-Assay (CBMN)	2
2.1.1 Parameter des CBMN-Assay	3
2.2 Einfluss von Alter und Geschlecht auf das Mikrokernvorkommen.....	5
2.3 Mikrokernvorkommen und Krebsrisiko	7
2.4 Einfluss von Mikronährstoffen auf chromosomale Veränderungen	10
2.4.1 Vitamin B12 und Folsäure	10
2.4.2 Antioxidantien	14
2.4.2.1 Vitamin C	15
2.4.2.2 Vitamin E	16
2.4.3 Effekte kombinierter Antioxidantien	17
2.5 Neurodegenerative Krankheiten und DNA-Schäden	19
2.6 Einfluss des Lebensstils auf das Auftreten von Mikrokernen.....	20
2.6.1 Übergewicht und metabolisches Syndrom	20
2.6.2 Mikrokerne und Diabetes	21
2.6.3 Mikrokerne und kardiovaskuläre Erkrankungen	22
2.6.4 Mikrokerne und körperliches Training	22
2.7 Zusammenhang Alter-Krafttraining-Proteinbedarf.....	23
2.7.1 Proteinmetabolismus und Proteinbedarf im Alter	24
2.7.2 Effekte des Krafttrainings im Alter	26
3. Material und Methoden	28
3.1 Studiendesign	28

3.1.1 Rekrutierung der Probanden.....	28
3.1.2 Interventionsphase	30
3.1.3 Trainingsintervention	30
3.1.4 Ernährungsintervention	31
3.2 Der CBMN-Assay	32
3.2.1 Verwendete Reagenzien	32
3.2.2 Verwendete Materialien	33
3.2.3 Probenaufbereitung	33
3.2.4 Zählkriterien	36
3.3 Datenauswertungen	39
4. Ergebnisse	40
4.1 Lineare- Messwiederholung für die 3 Studiengruppen und das Geschlecht ...	40
4.1.1 Trainingsgruppe	41
4.1.2 Gruppe Training& Ernährung	413
4.1.3 Kontrollgruppe (= Kognitionsgruppe).....	45
4.1.4 Interventionsergebnisse Männer	47
4.1.5 Interventionsergebnisse Frauen	49
5. Diskussion der Ergebnisse	51
6. Gruppenvergleiche der CBMN-Assay Parameter zu T2	53
6.1 Vergleich der Gruppe Training mit der Gruppe Training& Ernährung	53
6.2 Vergleich der Gruppe Training& Ernährung mit der Kognitionsgruppe	54
6.3 Vergleich der Trainingsgruppe mit der Kognitionsgruppe.....	55
7. Schlussbetrachtung	56
8. Zusammenfassung	58
9. Summary	60
10. Literaturverzeichnis	62

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Zusammenhang zwischen Mikrokernvorkommen und Alter [WOJDA et al., 2007].....	6
Abbildung 2: Möglichkeit des krebsfreien Überlebens je nach Mikrokernhäufigkeit [BONASSI et al., 2007].....	9
Abbildung 3: Der Folsäuremetabolismus. SAM, S-Adenosylmethionin; MTRR, Methionin Synthase Reduktase; MTR, Methionin Synthase; SHMT, Serin-Hydromethyltransferase; THF, Tetrahydrofolat; DHF, Dihydrofolat; FTL, Format-Tetrahydrofolat Ligase; dUMP, deoxyuridin Monophosphat; dTMP, deoxythymidin Monophosphat; Cob(I), reduzierte Form von Vitamin B12; Cob(III), oxidierte Form von Vitamin B12 [THOMAS et al., 2011].....	12
Abbildung 4: Trainingsgruppe: Differenz des Mittelwertes der Gesamtzellzahl und der Zweikernzellzahl zwischen T1 und T2. Zellzahl, Gesamtzellzahl; Zweikernzellen, Zweikernzellzahl.....	41
Abbildung 5: Trainingsgruppe: Differenz des Mittelwertes der Mikrokernzellen, Gesamtzahl an Mikrokernen, der nucleoplasmic Bridges (NPBS) und nucleoplasmic Buds (NBUDs) von T1 zu T2. MN, Mikrokernzellen; MNi, Gesamtzahl Mikrokerne; Bridges, NPBs; Buds, NBUDs.....	42
Abbildung 6: Gruppe Training& Ernährung: Differenz des Mittelwertes der Gesamtzellzahl und der Zweikernzellzahl zwischen T1 und T2. Zellzahl, Gesamtzellzahl; Zweikernzellen, Zweikernzellzahl.....	43
Abbildung 7: Gruppe Training& Ernährung: Differenz des Mittelwertes der Mikrokernzellen, Gesamtzahl an Mikrokernen, der nucleoplasmic Bridges (NPBS) und nucleoplasmic Buds (NBUDs) von T1 zu T2. MN, Mikrokernzellen; MNi, Gesamtzahl Mikrokerne; Bridges, NPBs; Buds, NBUDs.....	44
Abbildung 8: Kognitionsgruppe: Differenz des Mittelwertes der Gesamtzellzahl und der Zweikernzellzahl zwischen T1 und T2. Zellzahl, Gesamtzellzahl; Zweikernzellen, Zweikernzellzahl.....	45
Abbildung 9: Kognitionsgruppe: Differenz des Mittelwertes der Mikrokernzellen, Gesamtzahl an Mikrokernen, der nucleoplasmic Bridges (NPBS) und nucleoplasmic Buds (NBUDs) von T1 zu T2. MN, Mikrokernzellen; MNi, Gesamtzahl Mikrokerne; Bridges, NPBs; Buds, NBUDs.....	46
Abbildung 10: Männer: Differenz des Mittelwertes der Gesamtzellzahl und der Zweikernzellzahl zwischen T1 und T2. Zellzahl, Gesamtzellzahl; Zweikernzellen, Zweikernzellzahl.....	47

Abbildung 11: Männer: Differenz des Mittelwertes der Mikrokernzellen, Gesamtzahl an Mikrokernen, der nucleoplasmic Bridges (NPBS) und nucleoplasmic Buds (NBUDs) von T1 zu T2. MN, Mikrokernzellen; MNi, Gesamtzahl Mikrokerne; Bridges, NPBs; Buds, NBUDs.....48

Abbildung 12: Frauen: Differenz des Mittelwertes der Gesamtzellzahl und der Zweikernzellzahl zwischen T1 und T2. Zellzahl, Gesamtzellzahl; Zweikernzellen, Zweikernzellzahl.....49

Abbildung 13: Frauen: Differenz des Mittelwertes der Mikrokernzellen, Gesamtzahl an Mikrokernen, der nucleoplasmic Bridges (NPBS) und nucleoplasmic Buds (NBUDs) von T1 zu T2. MN, Mikrokernzellen; MNi, Gesamtzahl Mikrokerne; Bridges, NPBs; Buds, NBUDs.....50

II. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Rolle und Effekte spezifischer Mikronährstoffe auf DNA-Stabilität. dTMP, deoxythimidin Monophosphat; dUMO, deoxyuridin Monophosphat; PARP, Poly (ADP-Ribose)-Polymerase [FENECH et al., 2010]	13
Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Studienpopulation [GAZIEV et al., 1996]	17
Tabelle 3: Zusammensetzung FortiFit.....	32
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien des CBMN-Assay	32
Tabelle 5: Verwendete Materialien des CBMN-Assay.....	33
Tabelle 6: Vergleich der Parameter zu T2 zwischen der Trainingsgruppe und der Gruppe Training & Ernährung. N, Anzahl der Probanden	53
Tabelle 7: Vergleich der Parameter zu T2 zwischen der Gruppe Training & Ernährung und der Kognitionsgruppe. N, Anzahl der Probanden	54
Tabelle 8: Vergleich der Parameter zu T2 zwischen der Trainingsgruppe und der Kognitionsgruppe	55

III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP	Alzheimer Patienten
Al	Aluminium
BNC	Binucleated Cell
BNCs	Binucleated Cells
BZ	Bizygot
CBMN	Cytokinesis Block Micronucleus Assay
CVD	Cardiovascular Diseases
d	Tag
DM 1	Diabetes Mellitus Typ 1
DM 2	Diabetes Mellitus Typ 2
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dTMP	deoxythimidin Monophosphat
dUMP	deoxyuridin Monophosphat
EAA s	Essentielle Aminosäuren
FBS	Fatal Bovine Serum
FFQ	Food Frequency Questionnaire
GF	Griseofulvin
Hcy	Homocystein
HUMN	Human Micronucleus
KG	Körpergewicht
KP	Kontrollpaare
MN	Micronucleus
MNi	Micronuclei
MSy	Metabolisches Syndrom

MTHFR	Methylen-Tetra-Hydro-Folat-Reduktase
MZ	Monozygot
NBUD	Nucleoplasmic Bud
NBUDs	Nucleoplasmic Buds
NDCI	Nuclear Division Cytotoxicity Index
NDI	Nuclear Division Index
NPB	Nucleoplasmic Bridge
NPBs	Nucleoplasmic Bridges
PHA	Phytohaemagglutinin
PBL	Periphere Blut Lymphozyten
PBS	Phosphat Buffered Saline
RDI	Recommended Daily Intake
SPBB	Short Physical Performance Battery
VA	Vererbte Alzheimer

1. EINLEITUNG

Die durchschnittliche Lebenserwartung unserer Bevölkerung steigt stetig an, mit ganz unterschiedlichen Auswirkungen auf die Lebensqualität der einzelnen Personen [STATISTIK AUSTRIA, 2012]. Eines der Hauptprobleme im Alter ist Muskelschwund (Sarkopenie) und damit einhergehend eine Einschränkung der körperlichen Aktivität, die im Allgemeinen zu wenig Beachtung findet. Krafttraining und eine, dem Alter angepasste Proteinaufnahme sind die wichtigsten Maßnahmen, um Sarkopenie entgegen zu wirken [LOENEKKE UND PUJOL, 2011]. Des Weiteren können die, für ein höheres Alter spezifischen Risikonährstoffe, die Lebensqualität und körperliche Verfassung maßgeblich beeinflussen. Beispiele für solche Nährstoffe sind Folsäure, Vitamin B12, Vitamin C und lösliche Ballaststoffe [BIESALSKI et al., 2010].

Das Altern eines Menschen beeinflusst auch die Zellbiologie, vor allem auch durch eine gesteigerte Mikrokern (MN)-Bildung. Es existieren viele Studien, die die positive Korrelation zwischen dem Alter und dem MN-Vorkommen zeigen [FENECH UND BONASSI, 2011]. Mikrokerne (MNI) werden als Krebsmarker herangezogen. Diverse Untersuchungen zeigten einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Krebsrisiko und dem Auftreten von MNI, vor allem in Blutlymphozyten (PBL) [BONASSI et al., 2007]. Die Untersuchung auf MNI-Frequenz und weitere Parameter für Desoxyribonucleinsäure (DNA)-Schäden wird mit dem Cytokinesis-Block Micronucleus –Assay (CBMN) durchgeführt, der sich als die effektivste und verlässlichste Methode erwiesen hat [FENECH, 2007].

Mehrere Studien untersuchten den Einfluss von Ernährung auf die Häufigkeit von MNI. Vor allem die Nahrungsergänzung mit Folsäure, Vitamin B12 und Vitamin E brachte sehr gute und klare Studienergebnisse. Die einflussreichsten Nährstoffe auf MNI scheinen Vitamin B12 und die Folsäure zu sein. Die genannten Nährstoffe beeinflussen zusätzlich den Homocystein (HCy)-Stoffwechsel, mit dem es oft einen negativen Zusammenhang mit der MNI-Häufigkeit gibt [FENECH, 1997; THOMAS et al. 2011].

Der Einfluss von sportlicher Aktivität auf die MNi-Häufigkeit wurde bisher nur wenig untersucht und zeigte sehr unterschiedliche Ergebnisse.

Diese Diplomarbeit wurde im Rahmen der Plattform Active Ageing erarbeitet. Die Plattform untersucht die Auswirkungen eines progressiven Krafttrainings und einer optimierten Ernährung, in Form eines Nahrungsergänzungsmittels, auf die körperliche Leistungsfähigkeit, die Gesundheit und das Wohlbefinden älterer Menschen in Pensionisten-Wohnhäusern. Fokus dieser Diplomarbeit sind die Auswirkungen dieses Trainings und der Ernährungsoptimierung auf die Parameter des CBMN-Assay, wobei das Hauptaugenmerk auf die MNi-Häufigkeit gelegt wurde. Es wurden die Effekte der Interventionen in 3 Gruppen untersucht: Gruppe Training & Ernährung, Trainingsgruppe und Kontrollgruppe (Kognitionsgruppe). Bei den untersuchten Parametern handelt es sich neben den MNi um nucleoplasmic Bridges (NPBs), nucleoplasmic Buds (NBUDs), Apoptosen und Nekrosen.

Die Probenauswertung, das Erarbeiten der Literatur und des Kapitels Material- und Methoden sind in Zusammenarbeit mit meiner Kollegin Heidemarie Peherstorfer entstanden.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Der CBMN-Assay

Beim CBMN-Assay handelt es sich um eine Methode, mit der Chromosomenschäden, Zytostase und Zytotoxizität sehr genau bestimmt werden können. Mit diesem Test ist es auch möglich, DNA-Schäden in Abhängigkeit vom Mikronährstoffstatus zu bestimmen. Des Weiteren sind Messungen der Genotoxizität und der Strahlenempfindlichkeit von Geweben möglich [FENECH, 2007].

Die Grundlage der Methode ist der Stopp der Zellteilung nach der ersten Teilung mittels Cytochalasin B. Nach diesem Vorgang lassen sich zytotoxische (Verhältnis von apoptotischen zu nekrotischen Zellen), zytostatische (Verhältnis von Einkernzellen zu

Zweikernzellen (BNCs) zu Mehrkernzellen, Nuclear division index (NDI)) und genotoxische (MNi, Nuclear Buds (NBUDs), Nucleoplasmic Bridges (NPBs)) Parameter in Zweikernzellen (BNCs) bestimmen [FENECH, 2007].

2.1.1 Parameter des CBMN-Assay

MNi: Mni sind Biomarker für Chromosomenbrüche und /oder Chromosomenverluste Sie entstehen aus Chromosomenfragmenten oder aus ganzen Chromosomen, die während der Zellteilung hinter der Anaphase zurück bleiben. MNi werden unter anderem in BNCs gebildet, weshalb sich die Methode des CBMN auf die BNCs konzentriert. Dies ermöglicht es, negative Effekte durch ungünstige oder gesteigerte Zellteilung auszuschließen [FENECH, 2007].

NPBs: Bei NPBs handelt es sich um Biomarker dizentrischer Zellen, die durch DNA-Fehlreparatur von Strangbrüchen und /oder durch Fusion von Telomer-Enden entstehen. Sie treten während der Anaphase auf, wenn die Zentromere von dizentrischen Chromosomen zu den gegenüberliegenden Polen der Zelle gezogen werden. NPBs werden mittels des CBMN gezählt, da sie ein Maß für Chromosomenwiedervereinigungen darstellen [FENECH, 2007].

NBUDs: NBUDs sind Hinweise für Verluste amplifizierter DNA und/oder von DNA-Reparaturmechanismen. Als „nuclear budding“ wird ein weiterer Mechanismus der MN-Bildung bezeichnet, der in Kulturen beobachtet wurde, die unter selektiven Bedingungen gewachsen sind, z.B. die Gen- Amplifikation auslösten oder Bedingung eines moderaten Folsäuremangels. Der „budding“ Prozess findet während der S-Phase statt. Die Morphologie eines NBUDs gleicht der eines MN, mit dem Unterschied, dass NBUDs durch einen schmalen oder breiten Stiel mit dem Zellkern verbunden sind. Die Dauer des „budding“ Prozess und die Abschnürung des entstandenen MN von der Zelle sind weitestgehend unbekannte Prozesse [FENECH, 2007].

Apoptosen: Apoptosen bzw. apoptotische Zellen resultieren aus dem programmierten Zelltod. Sie werden für die gezielte Elimination von Zellen benötigt und sind des

Weiteren an Regulationsmechanismen der Proliferation beteiligt. Auslöser von Apoptosen sind vor allem DNA-Schäden und oxidativer Stress. Die Apoptose führt zum Schrumpfen der Zelle und die Zellmembran wird aufgelöst. Es kommt zu einer Fragmentierung der DNA [LÖFFLER, 2003].

Nekrosen: Hauptauslöser nekrotischer Zellen sind vor allem exogene Faktoren und treten zusammen mit Entzündungen auf [LÖFFLER, 2003].

NDI: Der NDI misst den Proliferationsstatus lebender Zellen. Er ist ein Indikator zytostatischer Effekte und mitogenetischer Antwort. Es werden 500 lebende Zellen gezählt und die Häufigkeit von Zellen mit 1,2,3, und 4 Kernen festgestellt und der NDI wie folgt berechnet:

NDI=(M1+2xM2+3xM3+4xM4)/N, wobei M1-M4 Zellen mit 1-4 Kernen sind und N die gesamten lebenden Zellen, außer Apoptosen und Nekrosen [FENECH, 2007].

NDCI: Der NDCI ist ein Indikator für zytotoxische Effekte. Der NDCI wird wie folgt berechnet:

NDCI=(Apoptosen+Nekrosen+M1+2xM2+3xM3+4xM4)/N, wobei M1-M4 wiederum Zellen mit 1-4 Kernen sind und N die Summe aller gezählten Zellen.

Da bei den Auszählungen im Rahmen dieser Diplomarbeit Zellen mit 3 oder mehr Kernen als Mehrkernzellen gewertet wurden, wurde die Variable 3xM3 weggelassen. Die Variable 4xM4 wurde für Mehrkernzellen herangezogen.

2.2 Einfluss von Alter und Geschlecht auf das Mikrokernvorkommen

Es konnte schon sehr früh gezeigt werden, dass zwischen dem Auftreten von MNi und dem Alter und dem Geschlecht eine enge Beziehung besteht [FENECH et al., 1986; 1994].

Die Erkenntnisse, dass das Vorkommen von MNi mit dem Alter steigt und bei Frauen größer ist, wurden durch das Human Micronucleus (HUMN)- Projekt statistisch belegt [BONASSI et al., 2001]

Der Alterseffekt ist auf strukturelle Chromosomenveränderungen durch endogene Toxine, Umwelteinflüsse, ungünstigen Lebensstil und ungünstige Ernährung zurückzuführen. Des Weiteren spielen Chromosomenverluste und die Veränderung von Genen, die an der DNA- Reparatur beteiligt sind, eine Rolle [WOJDA et al., 2006].

Die höhere MNi-Rate bei Frauen ist durch den häufigeren Verlust des X- Chromosoms als MN gegeben. Frauen besitzen gegenüber Männern 2 X-Chromosomen [NORPPA et al., 2003].

In einer weiteren Studie wurde der Zusammenhang zwischen der altersbedingten Chromosomenabnahme und dem Auftreten von MNi untersucht. Hierfür wurden Blutproben von 53 Hundertjährigen (100-108 Jahren), 20 Personen im Alter von 69-78, 14 Personen im Alter von 60-68, 20 40-50-jährigen und einer Gruppe von 20 21-30-jährigen untersucht. Auch hier war die MNi-Häufigkeit bei Frauen höher, wobei beim Vergleich der 20-50-jährigen der Unterschied signifikanter war als bei den Probanden ab 60 Jahren. Sowohl bei Männern als auch bei Frauen konnte ein altersbedingter Anstieg an MNi nachgewiesen werden. Interessant ist, dass dieser Trend nur in der Altersgruppe von 20-68 Jahren, mit Höchstwerten im Alter von 60-68, gegeben war, es jedoch in der Gruppe der 60-110-jährigen zu einer Abnahme der Häufigkeit kam. Eine mögliche Erklärung ist, dass Zellen mit MNi bevorzugt einer Apoptose unterzogen werden [WOJDA et al., 2007].

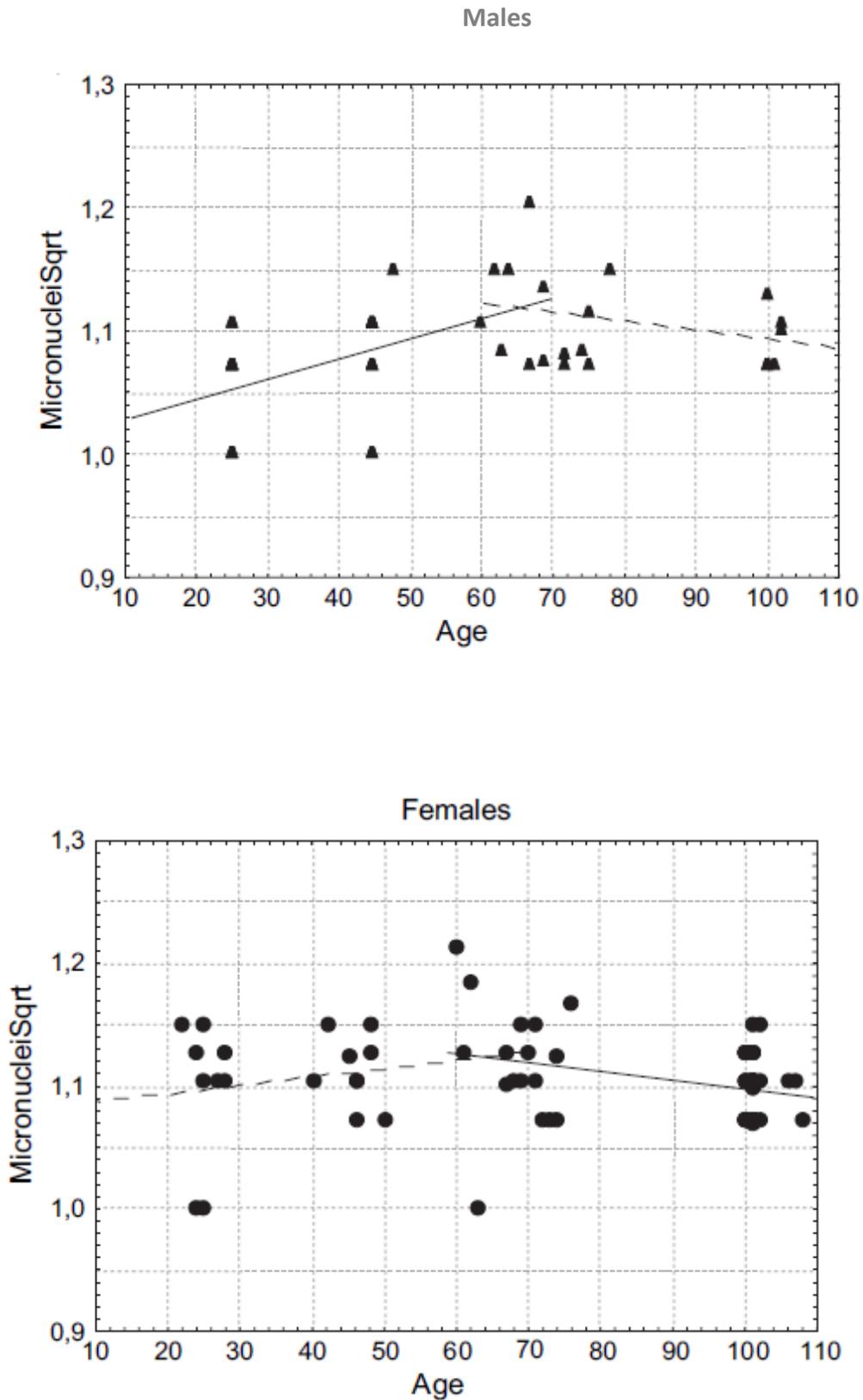


Abbildung 1: Zusammenhang zwischen MN-Häufigkeit und Alter. Durchgehende Linien stehen für eine signifikante Korrelation [WOJDA et al., 2007].

Ähnliche Ergebnisse konnten durch eine Auswertung einer Datenbank von Biomonitoring-Ergebnissen erzielt werden. Hier wurden die altersabhängigen Entwicklungen von MNI, sister chromatid exchange und Chromosomen-Anomalien in menschlichen Lymphozyten beurteilt. Bei allen drei Variablen kam es zu einem altersbedingten Anstieg des Vorkommens, v.a. in der Altersgruppe von 30-59. Den größte Anstieg der MNI-Häufigkeit gab es in der Gruppe der 50-59 jährigen zu verzeichnen. [BOLOGNESI et al., 1997].

In einer japanischen Studie wurde ebenfalls der Einfluss von Alter, Geschlecht und Lebensstil auf die MNI- Häufigkeit in 71 Personen untersucht. Auch hier konnte der Alterseffekt nachgewiesen werden, v.a. bei Personen ab 40 Jahren und speziell bei männlichen Rauchern die älter als 40 Jahre waren [HITOSHI et al., 2003].

2.3 Mikrokernvorkommen und Krebsrisiko

Schäden an Chromosomen werden mit einem erhöhten Krebsrisiko in Verbindung gebracht und die Häufigkeit von MNI wird als Zeichen für ein erhöhtes Krebsrisiko gewertet. Viele Studien und Publikationen bestätigen diesen Zusammenhang, wobei mit der Entwicklung des CBMN-Assay ein wichtiger Fortschritt in der Beurteilung der Zusammenhänge gelang [BONASSI et al, 2007, 2011]. Dies konnte in einer Lungenkrebsstudie von EL- Zein et al. bestätigt werden, in der es durch ein Tabakkarzinogen zu einem vermehrten Auftreten der mit dieser Methode gemessenen Parameter (MNI, NBUDs, NPBs, Apoptose, Nekrose) kam [EL ZAIN et al., 2006].

Ein Vergleich der MNI-Häufigkeit in Lymphozyten zwischen 198 gesunden Personen und 70 unbehandelten Krebspatienten ergab einen signifikanten Unterschied in Bezug auf die MNI-Häufigkeit. In der Gruppe der Gesunden beeinflusste Tabakkonsum die Anzahl der MNI signifikant, bei den Krebspatienten war das Alter die signifikante Einflussgröße. Der direkte Vergleich von 54 Personenpaaren gleichen Alters und Geschlechts ergab ebenfalls einen signifikanten Unterschied in der MNI-Häufigkeit bei Krebspatienten. Der signifikante Unterschied der MNI-Frequenz bei Krebspatienten

könnte auf eine vorangehende Exposition mit genotoxischen oder mutagenen Substanzen, dem pathologischen Status oder genetische Voraussetzungen zurückzuführen sein [DUFFAUD et al., 1997].

Vor allem das Vorkommen von MNi in PBL wird als Indikator für chromosomale Schäden und Genomstabilität herangezogen [BONASSI et al., 2007].

In einer groß angelegten Studie wurden über 2 Jahrzehnte in 10 Ländern 6718 krebsfreie Personen in ad hoc Studien und Routineuntersuchungen auf deren MNi-Häufigkeit untersucht. Die Einteilung der Testpersonen erfolgte je nach MN-Status in niedrig, mittel und hoch. Ergebnis war ein signifikanter Anstieg des relativen Krebsrisikos in den Gruppen mit mittlerem und hohem Status im Vergleich zur Gruppe mit niedrigem MN-Vorkommen (**Abbildung 2**). Der Vergleich ergab des Weiteren eine signifikante Abnahme an krebsfrei Überlebenden in den Gruppen mit mittlerem und hohem Status. In der Beurteilung des Risikos für spezifische Krebsarten konnte ein erhöhtes Risiko für alle Krebsarten, außer Leber, Pankreas und Galle, gezeigt werden, wobei das Risiko für urogenitalen Krebs signifikant erhöht war. Die Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass MNi in PBL einen Biomarker für ein erhöhtes Krebsrisiko darstellen [BONASSI et al., 2007].

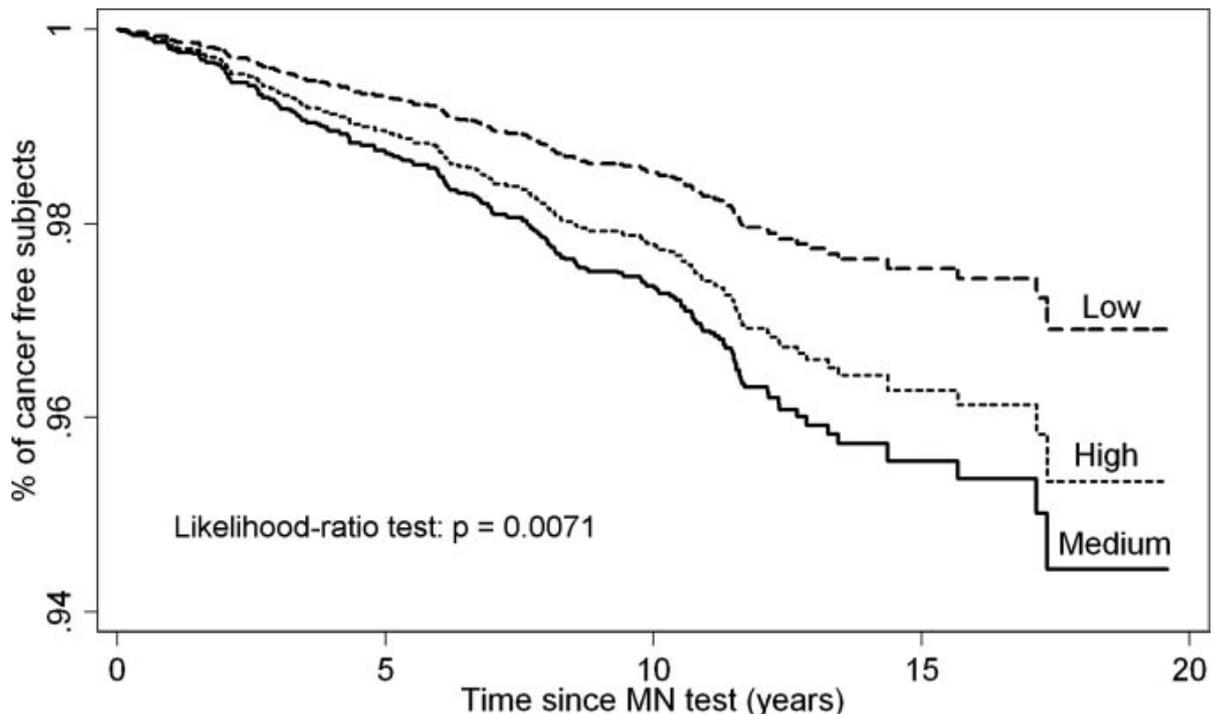


Abbildung 2: Möglichkeit des krebisfreien Überlebens je nach MN-Häufigkeit. Krebsfrei bezieht sich auf die Zeit vom MN-Test bis zur ersten Krebsdiagnose [BONASSI et al., 2007].

Um Biomarker für die Risikobeurteilung von Pankreaskrebs zu finden, wurde das MN-Level in PBL von 346 Krebspatienten und 449 gesunden Probanden bestimmt. Es war eine signifikant höhere Anzahl an MNi bei Krebspatienten ($15,3 \pm 0,3$) als bei den Gesunden ($9,7 \pm 0,5$) festzustellen. Auch der Abgleich mit demographischen Daten und Risikofaktoren zeigte einen Zusammenhang zwischen einer hohen MN-Rate und einem erhöhtem Krebsrisiko, wobei das Risiko für Männer höher war. Männliche Krebspatienten, die gleichzeitig Raucher waren, hatten einen höheren MN-Status, ebenso wie übergewichtige Frauen der Patientengruppe. Allgemein war die Anzahl an MNi bei Rauchern höher als bei Nichtrauchern und auch Übergewichtige wiesen höhere Werte gegenüber Normalgewichtigen auf. Die Anzahl der MNi war unabhängig vom Krankheitsfortschritt oder einer Tumorentfernung. Dies könnte darauf hindeuten, dass die erhöhten Werte auch eine Folge der Krankheit sein könnten oder die

unterschiedliche Sensibilität für Einflüsse, die die Genomstabilität beeinträchtigen, widerspiegeln [CHANG et al., 2010].

2.4 Einfluss von Mikronährstoffen auf chromosomale Veränderungen

Viele verschiedene Mikronährstoffe sind an der Prävention und der Reduktion von chromosomalen Schäden beteiligt. Sie haben wichtige Aufgaben als Co- Faktoren diverser Enzyme und dienen in Methylierungsprozessen innerhalb der Genexpression als wichtige Helfer. Vor allem die Nahrungsergänzung mit B-Vitaminen und antioxidativ wirksamen Vitaminen zeigen Reduktionen der MN- Häufigkeit [THOMAS e al., 2011].

Es hat sich gezeigt, dass sowohl ein Mangel als auch ein Überschuss an Mikronährstoffen die Stabilität des Genoms beeinflussen. Diese Auswirkungen auf die Stabilität sind ebenso von Wechselwirkungen zwischen den Nährstoffen und Wechselwirkungen zwischen Nährstoffen und Genen abhängig [THOMAS et al., 2011].

2.4.1 Vitamin B12 und Folat

Folat und Vitamin B12 sind wichtige Methylgruppendonatoren des DNA-Metabolismus. Folat wird vor allem für die Synthese von Deoxythymidinmonophosphat (dTMP) aus Deoxyuridinmonophosphat (dUMP) benötigt. Ein Folatmangel führt zu einem vermehrten Uracileinbau in die DNA, was Punktmutationen und DNA-Strangbrüche, chromosomale Schäden und vermehrtes Auftreten von MNi zur Folge hat. Vitamin B12- Mangel bewirkt eine abgeschwächte Produktion des für die dTMP – Synthese benötigten Folats. Die beiden Mikronährstoffe werden ebenso für die Methioninsynthese durch Remethylierung von HCy benötigt [THOMAS et al., 2011].

In einer Studie an 64 gesunden Männern zwischen 50 und 70 Jahren wurden der Folat-, Vitamin B12- und HCy-Status und der Zusammenhang dieser Nährstoffe mit dem MN-Status in PBL untersucht. Des Weiteren wurde innerhalb dieser Studie eine Placebo-kontrollierte, doppelblinde, randomisierte, retrospektive Interventionsstudie

durchgeführt, die die Auswirkungen einer viermonatigen Supplementation mit 0,7mg (mittels Cerealien) bzw. 2mg (in Tablettenform) freiem Folat auf die Konzentration von Folat, HCy und den MN-Index untersuchte.

56% der getesteten Personen wiesen einen oder mehrere erhöhte Werte für Folat, Vitamin B12 oder HCy auf. Der Vergleich mit Personen mit normalen Blutwerten für Folat, Vitamin B12 und HCy ergab einen signifikant erhöhten MN-Index bei Personen mit erhöhten Blutwerten für Folat, Vitamin B12 oder HCy. Der MN-Index war auch bei Personen mit HCy- Werten von $> 10\mu\text{mol/l}$ signifikant erhöht im Vergleich zu den Personen mit Werten $< 10\mu\text{mol/l}$. Eine signifikante positive Korrelation ergab sich zwischen der Plasmakonzentration von HCy und dem MN-Index bei Personen ohne Mangel an Folat oder Vitamin B12. Signifikant negativ korrelierten der MN-Index und der Gehalt an Vitamin B12 im Serum. Die Nahrungsergänzung mit Folat erhöhte die Folatkonzentration im Blut um das Vierfache, die Konzentration in den roten Blutzellen stieg um den Faktor 2,6 und es kam zu einer Reduktion von HCy im Plasma von 11%. Der MN-Index blieb unbeeinflusst. Keine signifikante Korrelation ergab sich zwischen dem MN-Index und dem Folatstatus [FENECH et al., 1997].

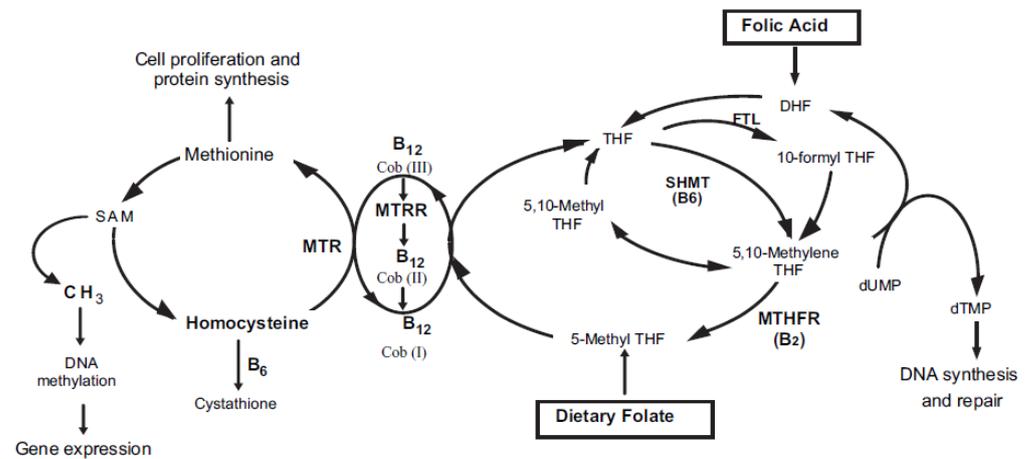


Abbildung 3: Folsäurestoffwechsel; SAM, S-Adenosylmethionin; MTRRR, Methionin Synthase Reductase; MTR, Methionin Synthase; SHMT, Serin Hydroxymethyltransferase; THF, Tetrahydrofolat; DHF, Dihydrofolat; FTL, Format Tetrahydrofolat Ligase; dUMP, deoxyuridine Monophosphat; dTMP, deoxythimidin Monophosphat; Cob(I), reduzierte Form von Vitamin B12; Cob(III), oxidierte Form von Vitamin B12 [Thomas et al., 2011].

In einer weiteren Studie wurde der Zusammenhang zwischen Folat und Vitamin B12 sowie der Schädigungen weißer Blutzellen in Abhängigkeit von Tabak- und Alkoholkonsum und dem Alter untersucht. Es kam zu einer positiven Korrelation zwischen MN-Häufigkeit und den Variablen Alter, Rauchen, Alkoholkonsum, Vitamin B12- und Folatkonzentration im Serum. Die höchste Anzahl an MNi wies die Gruppe mit der niedrigsten Vitamin B12-Konzentration auf [MILIC et al., 2010].

Eine Nahrungsergänzung mit Folsäure (15mg) 3x/Woche über 17 Wochen bzw. mit Folsäure (15mg) und Vitamin B12 (1000ug) 1x/Woche über 17 Wochen reduzierte den MN-Index um 28% bzw. um 41% bei Patienten mit Nierenversagen. Um 32% bzw. um 47% reduziert wurden auch die Hcy-Konzentrationen im Plasma [THOMAS et al., 2011].

Zusammenfassend kann man sagen, dass ein erhöhter Hcy-Spiegel und ein niedriger Vitamin B12 Spiegel Risikofaktoren für Chromosomenveränderung in Lymphozyten darstellen und eine Supplementation mit Folat bis zum fünffachen des recommended dietary intake (RDI) keine Auswirkung auf den MN-Index hat [FENECH et al., 1997].

Mikronährstoff	Aufgabe für DNA-Stabilität	Auswirkung bei Mangel
Vitamin C und E	Prävention DNA und Fettoxidation	DNA-Strang –und Chromosomenbrüche, oxidative DNA-Schäden
Folat, Riboflavin, Vitamin B6 und B12	DNA-Methylierung; dTMP Synthese aus dUMP	Uracileinbau in DNA, vermehrte Chromosomenbrüche, DNA Hypomethylierung
Niacin	PARP-Substrat für Teilung und Wiedervereinigung von DNA und Erhaltung der Telomerlänge	vermehrt unreparierte DNA-Einschnitte, vermehrte Chromosomenbrüche und –wiedervereinigungen, Mutagensensibilität
Zink	Cofaktor für Cu/Zn Superoxide-dismutase, Endonuclease IV, p53-Funktion	DNA-Oxidation, DNA-Brüche, Chromosomenschaden
Eisen	Komponente der Ribonucleotid-Reductase und mitochondrialem Cytochrom	Reduzierte DNA-Reparaturkapazität, gesteigerte Neigung oxidativer Schädigung mitochondrialer DNA
Magnesium	Cofactor verschiedener DNA-Polymerasen; Reparaturvorgänge, Chromosomenteilung,	Reduzierte Genauigkeit bei DNA-Replikation, reduzierte DNA-Reparaturkapazität, Fehler bei der Chromosomenteilung

	mikrotubuläre Polymerisation	
Mangan	Komponente der mitochondrialen Mangan-Superoxid-Dismutase	Erhöhte Anfälligkeit für Schädigung mitochondrialer DNA durch Superoxide, reduzierte Resistenz gegenüber strahleninduzierter Schädigung der Kern-DNA
Calcium	Cofaktor bei der Regulation mitotischer Prozesse und Chromosomenteilung	Mitotische Dysfunktion, Fehler bei der Chromosomenteilung
Selen	Selenproteine als Bestandteile des Methionin-Stoffwechsels und antioxidativen Stoffwechsels	Vermehrte DNA-Strangbrüche, DNA-Oxidation und Telomer-Verkürzungen

Tabelle 1: Rollen und Effekte spezifische Mikronährstoffe auf DNA-Stabilität; dTMP, deoxythymidin Monophosphat, dUMO, deoxyuridin Monophosphat; PARP, Poly(ADP-Ribose) Polymerase [FENECH et al., 2010].

2.4.2 Antioxidantien

Freie Radikale entstehen im Organismus permanent durch Stoffwechselprozesse und werden normalerweise durch ein System von Radikalfängern abgebaut [THOMAS et al., 2011].

Ist die Konzentration an freien Radikalen stark erhöht, können nicht mehr alle Radikale beseitigt werden und es kommt zu vermehrten zellulären und genetischen Schäden [THOMAS et al., 2011].

2.4.2.1 Vitamin C

Vitamin C hat sowohl eine antioxidative als auch eine prooxidative Eigenschaft. Vitamin C reduziert DNA- gebundene Anionen wie Kupfer und Eisen, welche das Auftreten von Hydroperoxiden reduzieren können und damit die Bildung von Hydroxylradikalen verhindern. Diese sehr reaktiven Radikale führen zu DNA-Strangbrüchen und der Bildung von MNI. In in vitro Studien steigerte Vitamin C die Schädigungen an der DNA und höhere Dosen steigerten die Zytotoxizität der Hydroperoxide gegenüber menschlichen Lymphozyten durch vermehrte Bildung von Hydroxylradikalen [THOMAS et al., 2011].

Die antioxidative Wirkung beruht auf der schlechten Reaktivität des Semi-hydroascorbat Radikals. Epidemiologische Belege zeigen, dass eine hohe Aufnahme an Vitamin C –reichen Nahrungsmittel das Krebsrisiko bis zu 50% reduzieren kann [THOMAS et al., 2011].

In einer Studie wurde untersucht, welche Auswirkungen eine hohe Vitamin C- Dosis in vitro auf die Lebensfähigkeit von menschlichen Lymphozyten im Plasma hat. Dies wurde in An- bzw. Abwesenheit von Hydrogenperoxid getestet. Die Auswertung erfolgte anhand der Auszählung von Apoptosen, Nekrosen und MN-Zellen. Vitamin C alleine (0,57-2,27 mmol) hatte keine Effekte auf die 3 genannten Variablen, jedoch reduzierte das Vitamin in Anwesenheit von Hydrogenperoxid signifikant die Anzahl an Zellteilungen und Apoptosen. Nekrosen und die Anzahl an MN-Zellen wurden signifikant erhöht. Innerhalb dieser Beurteilung wurde eine placebokontrollierte, doppelblinde Interventionsstudie an 11 männlichen Personen zwischen 20 und 40 Jahren durchgeführt. Ziel war mittels einer Vitamin C- Supplementation zu beurteilen, ob hohe Plasmakonzentrationen dieses Vitamins Chromosomenschäden und den Zelltod fördern oder verhindern. Eine 2 Tage dauernde Antioxidantien-arme Diät reduzierte die Konzentration an Vitamin C im Blut um 15%. Eine darauf folgende Gabe von 2g Vitamin C erhöhte die Konzentration von Vitamin C im Plasma 2 Stunden (116%) und 4 Stunden (125%) nach der Einnahme. Blutproben wurden 2 Stunden und 4 Stunden nach der Verabreichung des Supplements genommen und untersucht. Es

wurden 18ml Blut entnommen (9ml Lithium Heparin, 9ml EDTA). Das Plasma aus dem Lithium Heparin wurde isoliert und für die Herstellung der Lymphozyten-Kultur verwendet. Das EDTA-Plasma wurde für die Bestimmung der Vitamin C-Konzentration mittels HPLC verwendet. Es kam zu keiner Erhöhung des MN-Auftretens oder der Apoptose sowohl in der Kontrollgruppe als auch der Hydroperoxid-Gruppe, jedoch erhöhte sich der Wert für Nekrosen leicht. Nach Kombination der Daten kam es zu einer positiven Korrelation zwischen Nekrosen und MN-Häufigkeit und einer negativen Korrelation zwischen Nekrosen und Apoptosen. Es konnte kein DNA-Schaden aufgrund der Vitamin C-Supplementation festgestellt werden, aber auch kein protektiver Effekt für Zellen nach Hydroperoxidschädigung [CROTT et al., 1999].

2.4.2.2 Vitamin E

Vitamin E als Antioxidans hat die Aufgabe, der Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) z.B. während einer Fettoxidation entgegenzuwirken [THOMAS et al., 2011].

Eine placebokontrollierte, doppelblinde Interventionsstudie, an der 60 Männer zwischen 50 und 70 Jahren teilnahmen, untersuchte den schützenden Effekt einer Hochdosis-Supplementation mit d- α -tocopherol vor DNA-Schädigung. Die Studie wurde in zwei achtwöchige Phasen unterteilt. In der ersten Phase wurde das Vitamin mit angereicherten Cerealien (50mg Vitamin E) und in der zweiten Phase mit einer Tablette (335mg Vitamin E) verabreicht. Vor, zwischen und nach Ablauf der Interventionsphasen wurden Blutproben genommen und mit HPLC und CBMN-Assay ausgewertet. Durch die Gabe der Cerealien stieg die Plasmakonzentration von Vitamin E um 22%. Im Vergleich dazu erbrachte die Einnahme von Vitamin E in Tablettenform einen Anstieg der Plasmakonzentration von 89%. Die gesteigerte Vitamin E-Konzentration hatte keinen sichtbaren Einfluss auf DNA-Schädigungen in den Lymphozyten. Es gab auch keinen Zusammenhang zwischen den genetischen Veränderungen und dem Vitamin E-Status. Einen signifikanten Rückgang in beiden Gruppen gab es bei den MNi, im Speziellen beim Vergleich der Ausgangswerte mit den

Werten nach abgeschlossener Intervention. In beiden Gruppen reduzierte sich die MNi-Häufigkeit um 30%. Es ist unklar, ob dieser Effekt auf die saisonale Bedingungen oder andere Nahrungskomponenten, wie den Sojaöl-Carrier in den Placebo- und Vitamin E-Kapseln, zurückzuführen ist [FENECH et al., 1997].

2.4.3 Effekte kombinierter Antioxidantien

Die Auswirkungen eines antioxidativ wirkenden Vitaminkomplexes auf spontane und durch γ -Strahlung induzierte MN-Bildung, wurden in drei verschiedenen Gruppen untersucht. Diese setzten sich wie folgt zusammen:

Gruppe	Alter	Personen
1	56-83	35
2	23-30	13
3	63-82	12

Tabelle 2: Gruppeneinteilung der Studienpopulation [GAZIEV et al., 1996].

Ein Jahr lang wurden alle 4 Monate Blutproben in jeder Gruppe entnommen. Nach der ersten Abnahme bekamen Gruppe 1 und 2 ein Vitaminpräparat aus Vitamin A (3mg), Vitamin C (150mg), Vitamin E (30mg), β -Carotin (15mg), Folsäure (0,2mg) und Rutin(75mg) für 4 Monate. Das Präparat wurde nach der zweiten Blutabnahme abgesetzt. Ein Teil des Blutes wurde γ -Strahlung ausgesetzt und die Bildung spontaner und induzierter MNi in den Lymphozyten gemessen. Sowohl die Spontanbildung als auch die induzierte Bildung von MNi war in der Altersgruppe signifikant erhöht. Diese Gruppe zeigte auch einen signifikanten Rückgang spontaner MN-Bildung nach der Intervention. In beiden Gruppen konnte nach der Aufnahme des Präparates ein Rückgang der induzierten MNi beobachtet werden [GAZIEV et al., 1996].

In einer Placebo-kontrollierten Studie wurde der Effekt einer Gabe von α -Tocopherol (100mg/Tag(d)), β -Carotin (6mg/d), Vitamin C (100mg/d) und Selen (50ug/d) auf oxidativen Stress und MN-Vorkommen untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss des Methylentetrahydrofolatreductase(MTHFR)-Gens auf den oxidativen Stress und

das MN-Vorkommen untersucht. Die Intervention dauerte 12 Monate, als Teilnehmer dienten 46 Personen mit Myokardinfarkt vor dem fünfzigsten Lebensjahr und 60 gesunde Personen, die randomisiert auf die beiden Gruppen aufgeteilt wurden. Gemessen wurde die MN-Häufigkeit nach der Intervention in Abhängigkeit vom MTHFR-Genotyp und der Hcy –und Folat-Konzentration. Ein signifikanter Rückgang der MNi wurde bei Probanden mit normalen Folat-Werten festgestellt. Jene mit niedrigen Folat-Werten wiesen eine starke Korrelation zwischen MNi nach der Supplementation und Hcy, vor und nach Supplementation, auf. In der Placebo-Gruppe kam es zu einem Anstieg der MN-Häufigkeit. Folat-Mangel kann die Wirkung anderer Risikofaktoren, z.B. erhöhte Hcy-Spiegel oder Varianten des MTHFR-Genotyps, verstärken. [SMOLKOVA et al., 2004].

Fenech et.al. untersuchten den Zusammenhang zwischen der Nahrungsaufnahme (Food Frequency Questionnaire (FFQ)) und Genom-Schädigungen in Lymphozyten mittels CBMN-Assay. Des Weiteren wurde an den 190 Studienteilnehmern in einer randomisierten, halbjährigen Intervention, untersucht, ob ein Mix aus β -Carotin (18mg), Vitamin E (250mg) und C (900mg) zusammen mit Zink (12mg) die Genom-Stabilität verbessert. Die Aufnahmen der weiteren Mikronährstoffe (Retinol, Calcium etc.) wurden mit dem FFQ erfasst. Hohe Aufnahmen von Vitamin E, Retinol, Folsäure, Nikotinsäure und Calcium reduzierten die MN-Häufigkeit signifikant. Das Gegenteil bewirkten hohe Riboflavin-, Biotin -und Pantothensäure-Aufnahmen. Interessanterweise reduzierte eine mittlere β -Carotin-Aufnahme die MNi um 18%, jedoch erhöhte die höchste (>6400ug/d) Aufnahmemenge das Auftreten um 18%. Die Supplementierung erbrachte einen Anstieg aller Supplementbestandteile im Blut außer Zink. Das Supplement reduzierte das Auftreten von MNi um 13%. Die Studie zeigte zusätzliche Effekte: eine protektive Wirkung einer gesteigerten Calcium-Aufnahme und den verstärkenden Effekt von Riboflavin auf eine durch niedrige Folat-Aufnahme ausgelöste, gesteigerte DNA-Schädigung [FENECH et al., 2005].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Studien darauf hindeuten, dass die Kombinationen verschiedener Mikronährstoffe in Verbindung mit normalen Folat- und

Vitamin B12-Status eine effizientere Reduktion der MN-Häufigkeit bewirken als einzelne Mikronährstoffe [THOMAS et al., 2011].

Ein großes Ziel in der Zukunft ist, die optimalen Aufnahmemengen einzelner oder kombinierter Mikronährstoffe zu eruieren, um Schädigungen der DNA zu reduzieren [FENECH, 2010].

2.5 Neurodegenerative Krankheiten und DNA-Schäden

Unter neurodegenerativen Krankheiten versteht man vorwiegend die im Alter auftretenden Krankheiten Alzheimer und Parkinson. 15% der Alzheimer-Erkrankungen sind erblich bedingt [TRIPPI et al., 2001].

In einer Zwillingsstudie an 39 Monozygoten (MZ), 10 Dizygoten (DZ) und 38 Kontrollpaaren (KP) wurde der Einfluss von vererbten genetischen Faktoren auf natürlich auftretende und durch Strahlung induzierte MNi untersucht. Beim Vergleich der MZ mit den KP gab es einen starken Einfluss der vererbten Faktoren auf beide MN-Gruppen. Das Ergebnis wurde durch verschiedene Korrelationskoeffizienten innerhalb der einzelnen Gruppen für beide MN-Klassen bestätigt. Damit konnte gezeigt werden, dass die MN-Frequenz zu einem großen Teil durch genetischen Faktoren festgelegt wird [SUROWY e al., 2011].

Spontane und chemisch induzierte MN- Veränderungen wurden in Lymphozyten und Fibroblasten der Haut von 14 Alzheimer-Patienten (AP) und 8 Personen mit vererbter Alzheimer (VA) in vitro untersucht. Die spontane MN-Häufigkeit war in beiden Gruppen signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe. Die chemische Induktion der MNi erfolgte mit Aluminium (Al) und Griseofulvin (GF). Al erhöhte die MN-Werte der meisten Teilnehmer nur in der Kontrollgruppe. GF bewirkte einen signifikanten Anstieg in allen Kontrollpatienten und in 2 VA-Patienten. In AP mit GF kam es zu einer signifikant geringeren Erhöhung der spontanen MN-Bildung verglichen mit der Kontrollgruppe [TRIPPI et al.; 2001].

Studien mit PBLs von Patienten mit Alzheimer und Parkinson zeigten eine gesteigerte MN-Bildung für beide Krankheiten. MNi stammen entweder von Chromosomenbrüchen oder anormaler Chromosomentrennung. Bei Alzheimer-Patienten entstanden MNi hauptsächlich durch eine anormale Chromosomentrennung, bei Parkinson-Patienten vor allem durch Chromosomenbrüche, die wahrscheinlich durch oxidativen Stress ausgelöst wurden. Um die These einer erhöhten MN-Anzahl in Parkinson Patienten zu testen, wurden mit dem CBMN-Assay und Comet-Assay die PBLs von Parkinson-Patienten und einer Kontrollgruppe untersucht. Patienten zeigten eine erhöhte MN-Häufigkeit und einen signifikanten Anstieg der Einzelstrangbrüche und oxidierten Purinbasen gegenüber der Kontrollgruppe [MIGLIORE et al., 2011].

Es konnte auch eine Verbindung zwischen dem Folat-Stoffwechsel und Alzheimer hergestellt werden. Viele Alzheimer-Patienten leiden an einem Folat- und Vitamin B12-Mangel. Der Folatmangel bewirkt auch einen Anstieg von HCy, was jedoch auch einen Risikofaktor für Parkinson darstellt. Diese Faktoren werden, wie bereits erwähnt, mit einem erhöhtem MN-Auftreten und zytotoxischen Wirkungen in Verbindung gebracht [MIGLIORE et al., 2011].

2.6 Einfluss des Lebensstils auf das Auftreten von Mikrokernen

2.6.1 Übergewicht und Metabolisches Syndrom

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Fettleibigkeit und Übergewicht mit erhöhtem oxidativen Stress einhergeht. In diesen Studien waren DNA-Schäden bei Personen mit Fettleibigkeit oder dem metabolischen Syndrom (MSy) gegenüber gesunden Patienten signifikant erhöht. Des Weiteren nahm die antioxidative Kapazität bei kranken Personen signifikant ab. Je mehr metabolische Störungen bei einer Person festzustellen war, desto mehr DNA-Schäden konnte gemessen werden. In Zukunft sollten verstärkt Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen MN-Häufigkeit,

Fettleibigkeit und dem MSy durchgeführt werden, da die Anzahl an Menschen mit Fettleibigkeit und dem MSy stetig steigt [ANDREASSI et al., 2011].

2.6.2 Mikrokerne und Diabetes

Eine gesteigerte oxidative DNA-Schädigung bei Diabetikern konnte in den letzten Jahren aufgezeigt werden, wobei die Schädigungen in Diabetes mellitus Typ 2 (DM2)-Patienten größer war als in Diabetes mellitus Typ1 (DM1)-Patienten. Diabetes ist eine starke Determinante für DNA-Schädigungen und eine hohe Anzahl an chromosomalen Schäden steht in Verbindung mit der Erkrankung [ANDREASSI et al., 2011].

In Bezug auf MNi konnte kein Unterschied zwischen DM1-Patienten und einer Kontrollgruppe gefunden werden, jedoch zeigte sich ein signifikant hohes MN-Vorkommen in DM2-Patienten. Während einer koronaren Angiographie zeigte sich, dass DM2 die größte unabhängige Determinante einer erhöhten MN-Häufigkeit in zirkulierenden Lymphozyten bei Patienten mit Herzischämie war [ANDREASSI et al., 2011].

In kontrollierten als auch unkontrollierten Diabetes-Patienten konnten etwa doppelt so hohe MN-Werte in Zellen der Mundschleimhaut festgestellt werden als in gesunden Patienten. Eine gesteigerte MN-Häufigkeit war bei nicht eingestellten DM1-Patienten gegenüber Patienten mit guter metabolischer Kontrolle festzustellen. Des Weiteren führte bei den Diabetikern eine dreißigtägige Folat-Supplementation zu einer signifikanten MN-Reduktion [ANDREASSI et al., 2011].

2.6.3 Mikrokerne und kardiovaskuläre Erkrankungen

Die MN-Häufigkeit kann als Marker für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse in Patienten mit einer bekannten koronaren Erkrankung herangezogen werden, da nachgewiesen werden konnte, dass Personen, die an CVD starben, eine signifikant erhöhtes MN-Auftreten zeigten verglichen mit einer Kontrollgruppe [ANDREASSI et al., 2011].

Bereits bei Erkrankungen der Koronararterie ließen sich chromosomale Schäden in zirkulierenden Zellen nachweisen. Diese Schäden wurden mit dem CBMN-Assay untersucht. Die MN-Häufigkeit korrelierte signifikant mit dem Auftreten und der Schwere der Erkrankung [ANDREASSI et al., 2011].

Eine weitere Einflussgröße auf die MN-Frequenz bei Personen mit einer koronaren Arterienerkrankung sind der C677T-Polymorphismus im 5,10-MTHFR-Gen und die Plasmakonzentrationen von Hcy und Vitamin B12. Das unterstützt die Annahme, dass der Folat-Stoffwechsel einen Risikofaktor für Atherosklerose darstellt, indem er die DNA-Stabilität beeinflusst.

2.6.4 Mikrokerne und körperliches Training

Wie bereits erwähnt, zeigen sich in Bezug auf MNi und körperliche Aktivität unterschiedliche Studienergebnisse.

An 20 Teilnehmern an einem Ironman wurden die Effekte einer solchen sportlichen Belastung auf die DNA-Stabilität untersucht. Hierzu wurden Blutproben 2 Tage vor dem Bewerb, direkt nach dem Rennen und 5 und 19 Tage nach dem Rennen genommen. Mittels CBMN-Assay wurden MNi, NPBs und NBUDs gezählt. Die MN-Anzahl nahm nach dem Rennen ab, blieb 5 Tage nach dem Bewerb auf niedrigem Niveau und nahm nach 19 Tagen weiter ab. Die Zahl NPBs nahm vom zweiten bis zum neunzehnten Tag nach dem Rennen ab. NBUDs stiegen nach dem Rennen, erreichten

ihren Höhepunkt am fünften Tag nach dem Bewerb. 19 Tage nach Rennende wurden wieder die Ausgangswerte für NBUDs erreicht [REICHHOLD et al., 2008].

Eine weitere Studie untersuchte den Effekt eines 2,5 Stunden dauernden, submaximalen (75% VO₂max) Laufes auf DNA-Strangbrüche und den prozentuellen Anteil an Apoptosen und Nekrosen in 8 gut trainierten Ausdauerathleten. Dafür wurden Blutproben vor, direkt nach und 3 Stunden nach der Belastung entnommen. Außer einem signifikanten Anstieg des Serum-Cortisols und einer Abnahme der Lymphozytenzahl konnten keine signifikante Veränderungen festgestellt werden [PETERS et al., 2006].

In einer japanischen Studie wurden die chromosomalen Schäden in Lymphozyten nach einer halbstündigen, intensiven Laufbelastung in Trainierten und Untrainierten Personen untersucht. Hier wurden ebenso Blutproben vor, direkt nach und 30 Minuten nach der Belastung genommen. Des Weiteren wurde in vitro durch Bestrahlung die Entwicklung der belastungsinduzierten Schäden durch den zusätzlichen oxidativen Stress untersucht. Spontane DNA-Schäden zeigten keine Veränderungen, nach Bestrahlung war die Anzahl der Schäden in den nach 30 Minuten entnommenen Blutproben bei Untrainierten signifikant erhöht. Das Verhältnis von induzierten Schäden zu spontanen Schäden zeigte auch nur bei Untrainierten eine leichte Erhöhung [UMEGAKI et al., 1998].

2.7 Zusammenhang Alter-Krafttraining-Proteinbedarf

Ein Faktor, der eine Schlüsselrolle bei der Einschränkung der körperlichen Aktivität und eines aktiven Lebensstils einnimmt, ist der fortschreitende Verlust von Skelettmuskulatur mit dem Alter. Der Verlust an Muskelmasse und der oxidativen Kapazität der Muskulatur, sowie damit verbunden die Zunahme an Fettmasse, erhöht das Risiko für DM 2 und Insulinresistenz. Dieses Problem kann jedoch mit einem angepassten Training und einer entsprechenden Eiweißzufuhr reguliert werden [KOOPMAN UND VAN LOON, 2009].

2.7.1 Proteinmetabolismus und Proteinbedarf im Alter

Der Verlust an Muskelmasse ist eine Kombination mehrerer Faktoren, inklusive einer ungünstigen Ernährung und einem sitzenden Lebensstil. Ein weiterer Einflussfaktor ist die Imbalance zwischen Proteinsynthese und Proteinabbau [KOOPMAN UND VAN LOON, 2009].

Die größere Anzahl an Studien zeigte keine großen Unterschiede in der Proteinsynthese unter Grundumsatzbedingungen der Muskulatur zwischen Alten und Jungen. Unterschiede ergaben sich durch den unterschiedlichen Lebensstil, eine unterschiedliche körperliche Aktivität und den verschiedenen Ernährungsformen. Es sollte jedoch beachtet werden, dass kleine Differenzen in der Proteinsynthese und /oder dem Proteinabbau klinisch relevant sind, wenn deren Einfluss über einen längeren Zeitraum beobachtet wird, bevor Sarkopenie tatsächlich auftritt. Deshalb sollten noch sensiblere Methoden entwickelt werden, um die Proteinsyntheseraten und Proteinabbauraten zu untersuchen [KOOPMAN UND VAN LOON, 2009].

Die Empfehlung für die tägliche Eiweißzufuhr liegt bei 0,8 g/kg Körpergewicht (KG)/Tag (d). Dieser Wert gilt für alle Erwachsenen und Senioren [BIESALSKI et al., 2010].

Einige Studien deuten darauf hin, dass diese Angaben besonders für ältere Personen nicht angemessen sind, um Muskelmasse zu erhalten. Eine unzureichende Proteinaufnahme über einen längeren Zeitraum reduziert den Proteinumsatz im Körper und erhöht den Verlust an Muskelmasse in älteren Personen. Damit einhergehend erhöht sich das Risiko für gesundheitliche Probleme. Neben der Menge sollte auch auf eine hohe Qualität des aufgenommenen Proteins geachtet werden [EVANS, 2004].

Wichtig ist die Aufnahme von essentiellen Aminosäuren (EAAs), vor allem von Leucin, weil diese Aminosäure für die Proteinsynthese verantwortlich ist. In älteren Personen konnte zum Beispiel durch einen höheren Leucin-Anteil in der Nahrung die herabgesetzte Proteinsynthese kompensiert werden. Eine weitere Einflussgröße auf

die Proteinsynthese stellt die oftmals verlangsamte Proteinverdauung in älteren Personen dar [KOOPMAN UND VAN LOON, 2009].

Des Weiteren ist auf eine ausreichende Energiezufuhr zu achten, um zu verhindern das Protein als Energiequelle herangezogen wird [BIESALSKI et al., 2010].

Es gibt jedoch auch Studien, die die empfohlene Verzehrmenge für Eiweiß als ausreichend darstellen. So konnte mit einer standardisierten Aufnahme von 0,9g/kg KG/d eine sichtbare Vergrößerung der trainingsinduzierten Muskelmasse bei älteren Personen gezeigt werden. Eine zusätzliche Erhöhung der Proteinaufnahme zeigte keine Wirkung [KOOPMAN UND VAN LOON, 2009].

Ein viel diskutierter Punkt ist die zeitlich abgestimmte Proteinaufnahme und Proteinsupplementation und deren Einfluss auf den Muskelaufbau. Eine Studie untersuchte die Dauer der Muskelproteinsynthese nach Aufnahme einer kompletten Mahlzeit. Die Muskelproteinsynthese war für drei Stunden erhöht. Obwohl die Muskelproteinsynthese danach wieder abnahm, blieben interessanterweise die Werte für die Plasmakonzentration an Leucin und die für die Proteinsynthese benötigten Initiationsfaktoren erhöht, sodass darauf geschlossen wurde, dass eine weitere Mahlzeit nach 3 Stunden die Muskelproteinsynthese nicht steigern würde, da die Initiationsfaktoren für die Muskelproteinsynthese noch in erhöhter Konzentration vorliegen. Man sollte daher im Alter die Proteinaufnahme gleichmäßig über den Tag verteilen, mit einem Abstand der aufgenommenen Mahlzeiten zwischen 4 und 5 Stunden [LOENNEKE UND PUJOL, 2011].

Weitere Studien untersuchten den optimalen Zeitpunkt einer Proteinsupplementation bei älteren Personen in Verbindung mit Krafttraining. Es war kein klarer Trend zu erkennen und es wird angenommen, dass mögliche positive Auswirkungen einer Supplementation in älteren Personen auf sogenannte Untergruppen (Unterernährte, Gebrechliche,...) beschränkt sind [KOOPMAN und VAN LOON, 2009].

2.7.2 Effekte des Krafttrainings im Alter

Eine Vielzahl an Studien zeigte die positive Wirkung eines angepassten Krafttrainings auf die Muskelmasse und die Kraftentwicklung. Durch ein Krafttraining konnten bei älteren Personen große Kraftgewinne erzielt werden [EVANS, 2004].

Durch ein 12 Wochen dauerndes progressives Krafttraining, wurde eine Verdopplung der Kraft im Kniestrecker und Kniebeuger bei älteren Männern erzielt. Auch durch Biopsien konnte ein Muskelzuwachs nachgewiesen werden. Die Hälfte der Teilnehmer erhielt zusätzlich ein Protein/Energie-Supplement. Durch die erhöhte Energie –und Proteinaufnahme wurde ein größerer Muskelzuwachs erzielt, jedoch wurde kein Unterschied in den Kraftwerten festgestellt [LOENNEKE UND PUJOL, 2011].

Dasselbe Trainingsprogramm wurde bei institutionalisierten Männern und Frauen im Alter von 87-96 Jahren durchgeführt. Nach 8 Wochen konnte die Kraft im Mittel um 180% und die Muskelgröße um 11% gesteigert werden. Hier erhielt eine Gruppe ein Protein/Energie- Supplement auf Soja-Protein-Basis zusätzlich zum Training. Das Ergebnis war eine Gewichtszunahme, eine Steigerung der Kraft im Mittel um 257% und eine 2,5fache Erhöhung der Myosin-Neubildung. Gebrechliche, sehr alte Personen zeigten Verbesserungen des Bewegungsapparates und einen signifikanten Muskelzuwachs [EVANS, 2004].

Eine Vergleichsstudie untersuchte die Auswirkung einer unterschiedlich hohen Proteinaufnahme (0,8 g/kg KG/d oder 1,6 g/kg KG/d) kombiniert mit Krafttraining für 3 d/Woche über 3 Monate, auf die Muskelhypertrophie. Eine höhere Hypertrophierate wurde in der Gruppe mit 1,6 g/kg KG/d erzielt [EVANS, 2001].

Viele Ältere, besonders gebrechliche Personen, können ein sehr intensives Krafttraining nicht durchführen und sind somit auf eine niedrigere Trainingsintensität angewiesen. Hier zeigte eine spezielle Trainingsmethode gute Ergebnisse in älteren Personen. Durch eine Einschränkung des Blutflusses mittels einer Manschette, die nahe dem trainierenden Muskel angebracht wurde, konnten sehr positive Trainingsergebnisse bei niedrigen Intensitäten (10-30% der maximalen

Arbeitsbelastung) erzielt werden. Durch Laufbandtraining bei Ganggeschwindigkeit konnte der Muskelumfang des Oberschenkels um 4-7% gesteigert werden und das Ein-Wiederholungs-Maximum konnte um 8-10% gesteigert werden. Durch das Training auf dem Laufband und mit der Steigerung der Hypertrophie und der Stärke der Beinmuskulatur, konnte gleichzeitig die Ausdauer der Probanden gesteigert werden [LOENNEKE UND PUJOL, 2011; ABE T, 2006].

Diese Methode beruht auf einer verstärkten Aktivierung der schnellen Muskelfasern bei geringer Intensität und einer Stimulierung der Proteinsynthese. Des Weiteren kommt es zu einem verstärkten Ansprechen der Wachstumshormone [LOENNEKE UND PUJOL, 2011].

Progressives Krafttraining ist somit eine effektive Methode gegen Sarkopenie, auch bei sehr alten Personen. Eine randomisierte, kontrollierte Studie zeigte, dass ein geführtes, progressives Krafttraining über 3 Monate bei 91 institutionalisierten, gebrechlichen Personen ab 78 Jahren eine deutliche Verbesserung der Muskelkraft und der fettfreien Körpermasse bewirkte. Signifikante Verbesserungen können schon nach einem 2-3x/Woche durchgeführten Training über 6 Wochen erwartet werden. Aus Präventivmedizinischer Sicht sollten alle älteren Personen ein progressives Krafttraining beginnen und so lange wie möglich durchführen [SUNDELL, 2011].

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Studiendesign

Bei den Ergebnissen dieser Arbeit handelt es sich um Teilergebnisse, die im Rahmen der Forschungsplattform Active Ageing erarbeitet wurden. Die Plattform untersucht in einer Studie die Auswirkungen von Krafttraining und Nahrungsergänzung auf die körperliche Leistungsfähigkeit, die Gesundheit und das Wohlbefinden älterer Menschen in Pensionisten-Wohnhäusern in Wien.

Die Studie ist eine randomisierte, Beobachter-blinde, kontrollierte und monozentrische Interventionsstudie mit 3 Parallelgruppen. Die teilnehmenden ProbandInnen wurden jeweils einer Gruppe zugeteilt, die sich wie folgt zusammensetzen: Gruppe Training, Gruppe Training& Ernährung und Kontrollgruppe. Im Rahmen Studie wurden viele Biomarker analysiert; in dieser Arbeit wurde das MN-Vorkommen mit der CBMN-Assay-Methode ermittelt.

Die Ethikkommission der Stadt Wien genehmigte die Durchführung der Studie.

3.1.1 Rekrutierung der Probanden

Die Rekrutierung der ProbandInnen fand vor Beginn der Studie statt. In jedem der mit dem Kuratorium Wiener Pensionistenhäuser (KWP) ausgewählten Heime fand eine Informationsveranstaltung zur Vorstellung der Studie statt. Für interessierte BewohnerInnen fand eine zusätzliche, ausführlichere Informationsveranstaltung statt. Des Weiteren konnten sich Angehörige über die Studie informieren. Anschließend wurden Einzeltermine vereinbart, um die Ein- und Ausschlusskriterien zu überprüfen. Vor Aufnahme in die Studie mussten die TeilnehmerInnen eine Einwilligungserklärung unterschreiben.

Ziel war es 120 Probanden aus 4 Heimen zu rekrutieren, jedoch konnten für den ersten Untersuchungsdurchgang nur 35 TeilnehmerInnen aus 3 Heimen aufgenommen werden, von denen bis zur zweiten Untersuchung weitere 4 ausschieden. Im Verlauf

der Studie konnten weitere Pensionistenhäuser für das Projekt gewonnen werden und somit wurde auch die gewünschte Personenzahl erreicht.

Die StudienteilnehmerInnen mussten folgende Kriterien erfüllen:

Einschlusskriterien:

- Männer und Frauen im Alter 65+
- Ausreichender geistiger Zustand (Mini-Mental-State>23)
- Fähigkeit, eine 10m Strecke ohne Hilfsmittel zu gehen
- Mindestens 4 Punkte bei der Short Physical Performance Battery (SPPB)

Ausschlusskriterien:

- Chronische Erkrankungen, die eine medizinische Trainingstherapie kontraindizieren
- Schwere kardiovaskuläre Erkrankungen
- Diabetische Retinopathie
- Manifeste Osteoporose
- Antikoagulantia
- Regelmäßige Einnahme Cortison haltiger Medikamente
- Regelmäßiges Krafttraining (> 1x/Woche) in den letzten 6 Monaten vor Einschluss
- Fehlendes schriftliches Einverständnis zur Testung der körperlichen Leistungsfähigkeit
- Personen der Trainingsgruppen: Teilnahme bei weniger als 70% der möglichen Trainingseinheiten bzw. bei weniger als 3 Einheiten in den letzten beiden Wochen vor den einzelnen Tests
- Personen der Supplementgruppe: Einnahme von weniger als 5 Portionen/Woche über den Durchrechnungszeitraum bzw. weniger als 5 Portionen in jeder der beiden letzten Wochen vor den Tests.

Um die körperliche Leistungsfähigkeit und die Eignung der ProbandInnen für die Untersuchungen zu ermitteln, wurden anthropometrische Daten (Größe, Gewicht, Körperfett) erfasst, ein 6min Walkingtest und funktionelle Krafttests zur Feststellung des allgemeinen Kraftniveaus durchgeführt. Der SPPB bestand aus einem

Koordinationstest, einem Ganggeschwindigkeitstest und dem chair raise test als Krafttest der unteren Extremitäten.

3.1.2 Interventionsphase

Die Interventionsphase des ersten Studienabschnittes dauerte 3 Monate. In dieser Phase wurden das Krafttraining und die Ernährungsintervention durchgeführt. In der Kontrollgruppe (= Kognitionsgruppe) wurde anstatt des Krafttrainings und der Ernährungsintervention ein kognitives Training absolviert, um den Faktor Sozialisierung zu berücksichtigen.

Nach einer Erstuntersuchung wurden die SeniorInnen, die alle Kriterien erfüllten, in die Studie aufgenommen und einer der Gruppen zugeordnet (randomisiert). Der erste Teil der Intervention war durch 2 Blutabnahmen gekennzeichnet, eine vor Beginn der Intervention, die andere nach der ersten 3 monatigen Interventionsphase. Die Abnahmen fanden morgens vor dem Frühstück im nüchternen Zustand statt.

3.1.3 Trainingsintervention

Nach der Durchführung der ersten Blutabnahme startete für die Trainingsgruppen die Trainingsintervention in Form eines speziellen, progressiven Krafttrainings. Das Training wurde unter Anleitung von SportwissenschaftlerInnen 2x/Woche durchgeführt.

Ablauf des Trainings:

Aufwärmen: - Balancetraining

-10 Minuten

Hauptteil: - Stabilisationstraining mit eigenem Körpergewicht

-Übungen mit dem Theraband

-30 Minuten

Abschluss:

-Abwärmen

-Entspannung

-10 Minuten

Es wurden jeweils 6-8 Übungen (2 Sätze) zu 6 Muskelgruppen durchgeführt. Pro Satz wurden 8-10 Wiederholungen bei einer Intensität von 60-80% des One Repetition Maximums (RM) ausgeführt. Konnten die TeilnehmerInnen beim letzten Satz einer Übung mehr als 12 Wiederholungen durchführen, wurde die Intensität gesteigert (progressives Krafttraining). Die Gesamtdauer einer Trainingseinheit betrug 50-60 Minuten.

3.1.4. Ernährungsintervention

Ein Teil der Trainingsgruppe erhielt neben dem Krafttraining zusätzlich eine Ernährungsintervention in Form einer Nahrungsergänzung mittels FortiFit. Dieses Produkt enthält eine hohe Konzentration an Leucin und weiteren essentiellen Aminosäuren. Dies soll die Muskelproteinsynthese fördern, die Kraft und Funktion der Muskeln unterstützen und einer Sarkopenie entgegenwirken.

Es handelt sich um ein wasserlösliches Nahrungsergänzungsmittel in Pulverform. Für die Zubereitung wurden 125ml Wasser mit 6 Meßlöffel des Pulvers in einem Shaker gemischt.

In den Heimen erfolgte die Zubereitung durch das Küchenpersonal und wurde von den TeilnehmerInnen 7x/Woche zum Frühstück und 2x nach dem Training eingenommen.

Zusammensetzung	FortiFit/100ml	FortiFit/150ml
Energie	100 kcal	150 kcal
Eiweiß	13,8 g	20,7 g
Molkenprotein	13,1 g	19,7 g
Leucin	2 g	3 g
Essentielle Aminosäuren	>6,6 g	>10 g
Kohlenhydrate	6,2 g	9,3 g
Fett	2 g	3 g
Ballaststoffe	0,8 g	1,2 g
Broteinheiten	0,5 BE	0,8 BE

Tabelle 3: Zusammensetzung von FortiFit

3.2 DER CBMN-ASSAY

3.2.1 Verwendete Reagenzien

Sodium	Einheit	Hersteller
RPMI 1640 steril	500ml	PAA
Fetal Bovine Serum (FBS)	500ml	Sigma
Sodium-L-Pyruvat steril	50ml	Sigma
L-Glutamin steril	200µM	Sigma
Dulbeccos Phosphate buffered saline steril (PBS)	500ml	Sigma
Trypanblau		Sigma
Phytohaemoglutinin (PHA)	10ml	PAA
Cytochalasin B		Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Sigma
Diff Qick Staining Set		Medion Diagnostics
Entellan		Merck

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien des CBMN-Assay

3.2.2 Verwendete Materialien

Name	Einheit	Hersteller
Zentrifugenröhrchen	50ml u. 15ml	VWR
Leucosep-Röhrchen	12ml	
Falconröhrchen	5ml	VWR
Objektträger, Deckgläser		VWR
Mikrozentrifugenröhrchen	1,5ml	Star Lab
Countes cell counting chamber slides		Invitrogen
Spritze, sterile Filter		VWR

Tabelle 5: Verwendete Materialien des CBMN-Assay

3.2.3 Probenaufbereitung

Vor Beginn der Lymphozytenisolation wird das Medium vorbereitet.

Arbeitsanleitung Medium

Die im Wasserbad erwärmten Chemikalien werden unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet.

Beginnend mit 30ml RPMI, dass durch einen sterilen Filter in ein Zentrifugen-Röhrchen filtriert wird, werden 3,3ml FBS, 330µl Natrium-L-Pyruvat und 330µl L-Glutamin in das Röhrchen pipettiert.

Lymphozytenisolation

Das nach der Blutabnahme in ein Heparinröhrchen überführte Blut wird innerhalb weniger Stunden für die Lymphozytenisolation aufbereitet. Diese wird im Lamina Flow

durchgeführt. Dazu werden die Heparinröhrchen 5x geschwenkt und 6-7ml Vollblut in ein Leucosep-Röhrchen überführt. Pro Probe werden zwei Röhrchen mit Hilfe einer Pasteur-Pipette befüllt und bei 1000 relative centrifugal force (rcf)/g (2400 Umdrehungen pro Minute (rpm)) 15 min bei 16° ohne Bremse zentrifugiert. Bei den nächsten Schritten wird auf Eis gearbeitet. Nach der Zentrifugation wird die Lymphozytenschicht (Schicht zwischen Plasma und Separationsmedium) mit der Pasteur-Pipette abgenommen, in ein Zentrifugen-Röhrchen überführt, mit PBS auf 15ml aufgefüllt und 5x über Kopf geschwenkt, um die Zellsuspension herzustellen, und bei 304 rcf (1300 rpm) 15 min bei 4° mit Bremse zentrifugiert .Der Überstand wird anschließend abgesaugt, das Pellet mit 1ml PBS gelöst, das Röhrchen gut geschwenkt und auf 10ml mit PBS aufgefüllt. Dann wird das Röhrchen 5x über Kopf geschwenkt und bei 304 rcf (1300 rpm) 15 min bei 4° mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird wieder abgesaugt. Das Röhrchen wird auf 1ml mit PBS aufgefüllt und geschwenkt, um das Pellet zu lösen. Für die Zellzahlbestimmung wird der Doppelansatz der ursprünglichen Proben in ein Röhrchen vereint.

Zellzahlbestimmung

In ein Cup werden 40µl PBS und 20 µl Zellsuspension pipettiert, dabei wird die Pipettenspitze eingetaucht und 1x gespült.

Die Zellzahl wird mittels der Countess bestimmt.

Dafür werden 10µl Trypanblau mit 10µl verdünnter Zellsuspension gemischt, die Neubauer-Zählkammer damit befüllt und durch die Countess die lebenden Zellen/ml bestimmt.

Inkubation

Die Zellsuspension wird 10 min bei 22°C und 304 rcf (1300rpm) zentrifugiert, anschließend der Überstand abgesaugt und mit Medium auf 1980µl aufgefüllt (errechnet sich aus den ursprünglichen 2000µl abzüglich der Entnahme von 20µl für die Zellzahlbestimmung).

Die Falconröhrchen werden im Doppelansatz mit Medium und Zellsuspension laut Berechnung befüllt.

Die Menge an Zellsuspension und Medium wird in Abhängigkeit von der ermittelten Zellzahl bestimmt. Insgesamt wird ein Volumen von 750µl mit einer Zellkonzentration von 1×10^6 /ml benötigt. Zu beachten sind die jeweiligen Verdünnungsfaktoren.

Jeweils 3 Proben werden im Doppelansatz in einem Abstand von 20 Minuten mit 15µl PHA versetzt.

Während der Inkubationszeit von 44 Stunden wird die mitotische Zellteilung stimuliert; dies geschieht bei 37 °C und unter 5% CO₂ Luftgemisch.

Die Zellteilung wird durch die Zugabe von Cytochalasin B, mit einer Konzentration von 60 µg/l, unterbrochen. Daher ist die vorhandene Stocklösung von 600 µg/l mit RPMI in einem Verhältnis von 1:10 zu verdünnen.

Vor der Zugabe wird ein Überstand von 56,2 µl entfernt und durch die gleiche Menge an verdünntem Cytochalasin B ersetzt.

Darauf folgt eine weitere Inkubationszeit von 28 Stunden.

Zentrifugation im Cytospin

Nach Beendigung der insgesamt 72 h Inkubationszeit muss die Zellsuspension auf Objektträger aufgebracht werden, wobei nicht mehr steril gearbeitet werden muss.

Es werden 200 μ l vom Überstand abgesaugt und 46 μ l DMSO zugegeben. Pro Falconröhrchen sind auf je 2 beschriftete Objektträger 120 μ l dieser Zellsuspension in der Zentrifuge zu pipettieren.

Dafür werden die Objektträger in eine Klammer mit Filterpapier und Trichter eingespannt, in welchen die Zellsuspension pipettiert wird. Nach 5 Minuten Zentrifugation bei 600 rpm ist eine Trocknungszeit von 10 min vorgegeben.

Färbung

Für die Färbung werden drei Wannen mit Deckel vorbereitet, die mit den Lösungen Fixative, Diff Quick 1 und Diff Quick 2 befüllt sind.

Nach der Trocknungszeit gibt man die Objektträger (eingelegt in eine Glashalterung) zuerst für 10 min in die Fixierlösung und anschließend werden sie in den Färbewannen 10x (Diff Quick1) bzw. 8x (Diff Quick2) eingetaucht. Nach dem Abspülen mit Leitungswasser und bidestilliertem Wasser werden die Objektträger zuerst mit der Oberseite nach unten auf ein Papier gelegt und 10-15 min getrocknet. Die Färbung soll im Mikroskop kontrolliert werden, da mitunter eine Nachfärbung notwendig sein kann.

Eindeckeln

Um die Lymphozyten haltbar zu machen, werden 2-3 Tropfen Entellan neben dem Spot aufgetropft. Anschließend wird der Objektträger mit einem Deckglas abgedeckt und getrocknet.

3.2.4 Zählkriterien

Gezählt werden Ein-, Zwei- und Mehrkernzellen, um sowohl DNA- Schäden (MNI, NBUDs, NPBs) als auch Formen des Zelltods (Apoptose, Nekrose) zu ermitteln. Diese Zellen müssen ein intaktes Zytoplasma mit normaler Morphologie der jeweiligen Zellkerne haben.

Insgesamt wurden pro Probe 2000 BNCs gezählt, aufgeteilt auf 4 Objektträger.

Bis 250 BNCs wurden folgende Parameter gezählt:

- ❖ Einkernzellen
- ❖ Mehrkernzellen
- ❖ Apoptosen
- ❖ Nekrosen
- ❖ BNCs mit MNI und MNi insgesamt in der Zeikernzelle (BNC)
- ❖ BNCs mit NPBs
- ❖ BNCs mit NBUDs

Von 250 BNCs bis 500 BNCs wurden nur BNCs und deren Parameter gezählt:

- ❖ BNCs mit MNI und MNi insgesamt in BNCs
- ❖ BNCs mit NPBs
- ❖ BNCs mit NBUDs

Vorgegebene Zählkriterien für den CBMN-Assay nach M. FENECH (2007)

BNCs: Sind Zellen, die zwei Kerne mit einer intakten Kernmembran haben und innerhalb der gleichen cytoplasmatischen Grenze liegen.

Beide Kerne sollten ungefähr die gleiche Größe, Färbung und Farbintensität haben.

Die Kerne können sich berühren, idealerweise sollten sie nicht überlappen. Eine Überlappung darf gezählt werden, wenn die Grenzen der beiden Kerne gut sichtbar sind.

Die Grenzen der cytoplasmatischen Membran der BNCs sollen intakt und klar von benachbarten BNCs zu unterscheiden sein.

MNi: Der Durchmesser der MNi liegt zwischen $1/16$ und $1/3$ des mittleren Durchmessers der Hauptkerne bzw. $1/256$ u. $1/9$ von einem ganzen Hauptkern.

Die MNi sind rund oder oval, nicht refractil (lichtbrechend) und daher gut unterscheidbar von gefärbten Partikeln.

MNi sind nicht verknüpft oder verbunden mit dem Hauptkern, aber die MNi können den Hauptkern berühren. Sie dürfen den Hauptkern aber nicht überlappen und die Grenze der MNi muss klar erkennbar sein.

MNi haben die gleiche (und manchmal sogar stärkere) Farbintensität wie die Hauptkerne.

NPBs: NPBs sind kontinuierliche Verbindung zwischen den Kernen der BNC.

Die Breite der NPBs kann sehr unterschiedlich sein, sie ist normalerweise nicht breiter als ein $1/4$ des Durchmessers der Kerne der BNC.

NPBs haben die gleiche Farbcharakteristik wie die Hauptkerne.

Mehrere NPBs kommen selten vor und werden als eine NPB gezählt.

BNCs können MNi und NPBs enthalten. NPBs sind schwer erkennbar, wenn sich die Kerne berühren. Daher kann die Zählung der NPBs in BNCs auf Kerne beschränkt sein, die deutlich voneinander getrennt sind.

NBUDs: Diese sind über Brücken mit dem Kern verbunden. Diese Verbindungen sind dünn oder kaum schmaler als der Durchmesser der NBUDs.

NBUDs können in einer Vakuole am Kern vorliegen.

NBUDs sollen dieselbe Farbintensität wie MNi besitzen.

Apoptose: Die frühe Phase zeichnet sich durch eine Chromatin-Kondensation innerhalb des Kerns aus, mit intakter Kern- und Cytoplasma-Membran.

In der späten Phase kommt es zu einer Kern-Fragmentierung (Bildung von Kernkörperchen).

Das Cytoplasma und die Cytoplasma-Membran sind intakt.

Die Farbintensität ist im Kern, in den Kernfragmenten und im Cytoplasma normalerweise stärker.

Nekrose: In der frühen Phase ist das Cytoplasma hell und mit zahlreichen Vakuolen versehen, wobei auch einige im Zellkern vorkommen können.

Die Cytoplasma-Membran ist beschädigt und der Zellkern fast intakt.

In der späten Phase kommt es zum teilweisen oder kompletten Verlust des Cytoplasmas und einer unregelmäßig beschädigten Kernmembran. Die Kernstruktur ist nur teilweise intakt und die Kernmembran kann undicht sein.

Die Farbintensität von Kern und Cytoplasma ist normalerweise geringer als in lebenden Zellen.

Vereinbarte Punkte der Auszählung

Es wird der mittlere Durchmesser von der kurzen Seite der BNC gemessen. Im Zweifelsfall wird der MN dazugezählt, wenn er etwas größer als kurze Seite der BNC ist.

Ist der MN nicht wirklich rund bzw. heller als die Kerne und hat er eine undichte Punktierung, dann wird er nicht gezählt.

Den MNi nicht mit einer Brücke verwechseln, wenn er zwischen zwei Kernen liegt.

Mehrere NBUDs pro BNC gelten als ein nucleoplasmic bud (NBUD).

Abschnürungen der NBUDs sind entweder durch eine sichtbare Brücke oder als deutliche Knospe ohne Brücke zu erkennen.

Mehrere NPBs pro BNC gelten als 1 NPBs.

Eine Berührung von Kernen in einer BNC gilt nicht als nucleoplasmic bridge (NPB).

Apoptose mit hellem Cytoplasma wird nicht gezählt.

Die frühe Phase der Apoptose beachten: Sie ist durch einen Kern mit hellen Einschlüssen (Vakuolen) und beginnender Auflösung zu erkennen.

Späte Phase der Nekrose: Ist nur mehr das Zellkernmaterial zu erkennen, wird die Nekrose nicht gezählt. Bei einem hellblauem bis rosa Cytoplasma mit Einschlüssen wird die Nekrose gezählt.

Ist es fraglich, ob es sich um eine Apoptose oder Nekrose handelt, dann wird die Zelle als Nekrose gezählt.

Kann es sich um einen NBUD oder einen MN handeln, dann wird ein MN gezählt.

3.3 Datenauswertungen

Die statistischen Auswertungen der Studienergebnisse wurden mit dem Statistikprogramm SPSS 17.0. durchgeführt.

Zuerst wurden die Mittelwertunterschiede vom Untersuchungszeitpunkt 1 (T1) auf den Untersuchungszeitpunkt 2 (T2) jedes einzelnen Parameters gruppenweise untersucht. Nach Prüfung auf Normalverteilung wurde der t-Test für gepaarte Stichproben herangezogen, da alle Parameter normal verteilt waren.

Für die Gruppenvergleiche der Mittelwerte zum Zeitpunkt T2 wurde der t-Test bei unabhängigen Stichproben herangezogen (t-Test bei Mittelwertgleichheit).

Der p-Wert gibt Auskunft über eine signifikante Veränderung von T1 auf T2 bzw. über einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppenmittelwerten. Signifikanz ist mit einem p-Wert $\leq 0,05$ gegeben.

4. ERGEBNISSE

4.1 Lineare- Messwiederholung für die 3 Studiengruppen und das Geschlecht

Die Studienpopulation wurde in die drei Gruppen Training, Training & Ernährung und die Kontrollgruppe unterteilt.

In dieser Diplomarbeit werden die mittels CBMN-Assay ermittelten Parameter, die für DNA-Schädigungen und ein erhöhtes Krebsrisiko stehen, statistisch ausgewertet. Vorrangiges Ziel war es, die Auswirkungen von Training und einer Nahrungsergänzung auf diese Parameter, und MNi im Speziellen, in den einzelnen Gruppen vom Untersuchungszeitpunkt T1 zum Untersuchungszeitpunkt T2 zu untersuchen. Neben den bereits erwähnten Parametern wurden auch der NDI und der NDCI erfasst.

4.1.1 Trainingsgruppe

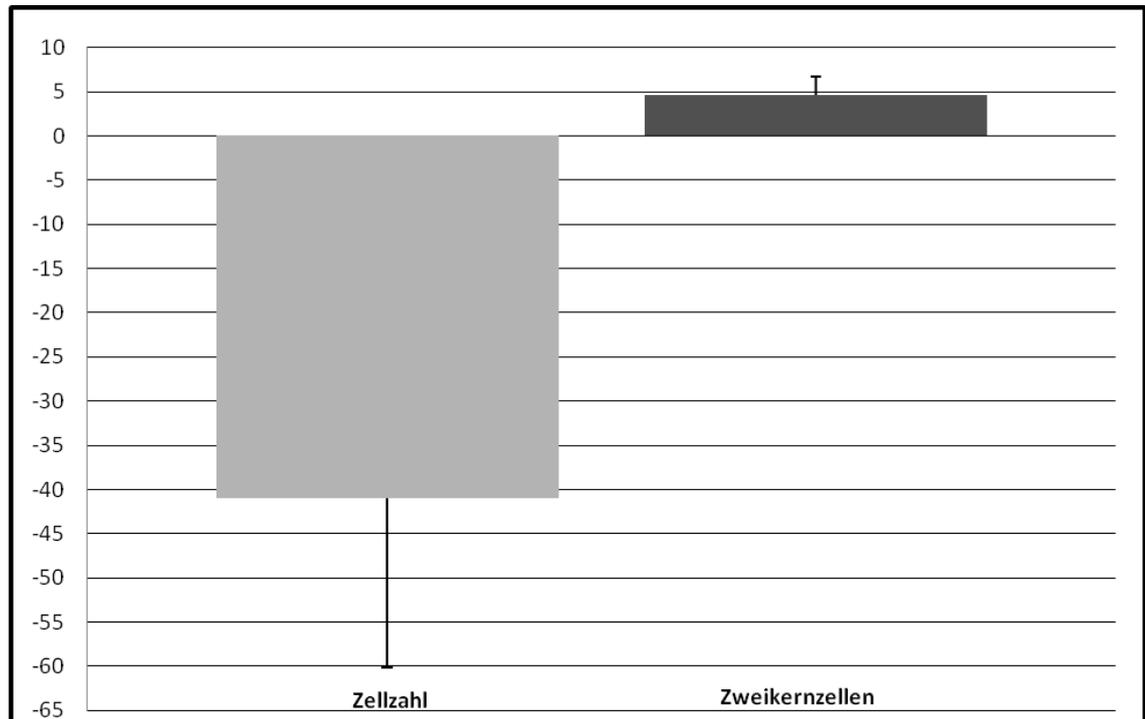


Abbildung 4: Differenz des Mittelwertes der Gesamtzellzahl und der Zweikernzellzahl von T1 zu T2. Zellzahl, Gesamtzellzahl; Zweikernzellen, Zweikernzellzahl.

Die Trainingsgruppe beinhaltete 10 StudienteilnehmerInnen. Die Gesamtzellzahl nahm von T1 auf T2 im Mittel um $40,9 \pm 60,1$ Zellen ab, die Zahl der BNCs erhöhte sich um durchschnittlich $4,6 \pm 6,7$ BNCs. Bei den restlichen Parametern (Apoptosen, Nekrosen, NDI, NDCI) konnten keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.

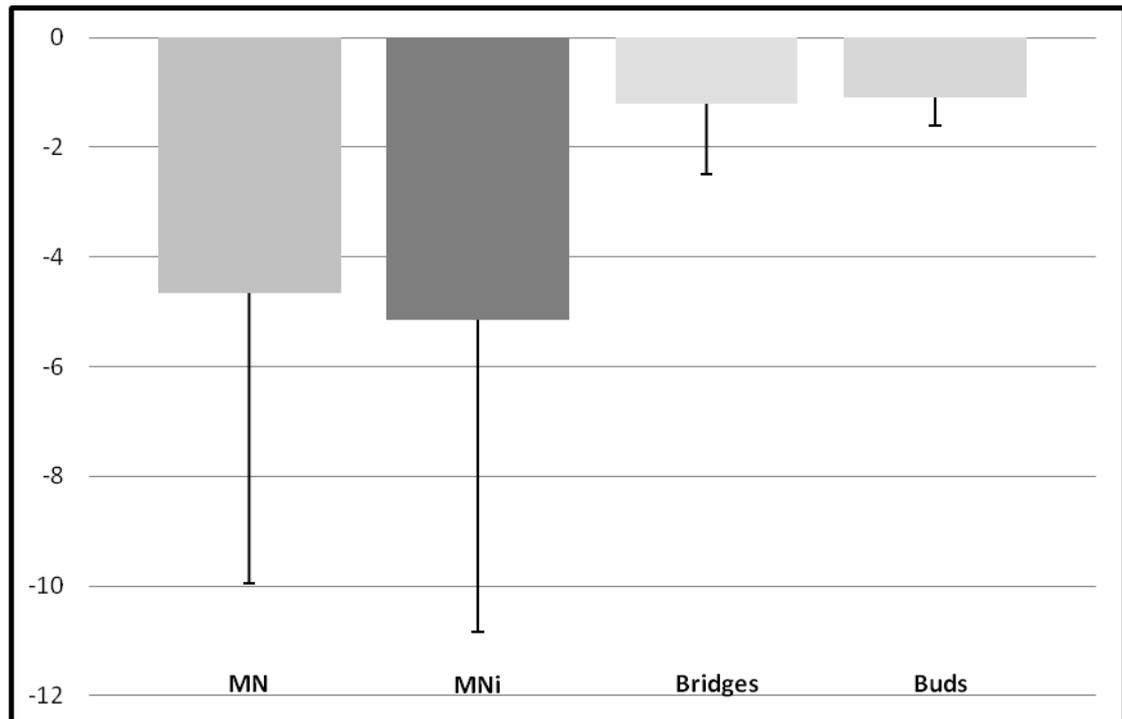


Abbildung 5: Differenz des Mittelwertes der MN-Zellen, der Gesamtzahl an MNi, der NPBs und NBUDs von T1 zu T2. MN , MN-Zellen, MNi, Gesamtzahl MNi; Bridges, NPBs; Buds, NBUDs

Die Auswertung der Parameter ergab zwar keine signifikante Veränderung, jedoch konnte für die MN-Zellzahl und die Gesamtheit an MNi eine deutliche Verringerung erzielt werden. Der Mittelwert der MN-Zellen verringerte sich um $4,7 \pm 10$ Zellen, die Gesamtzahl an MNi verringerte sich um durchschnittlich $5,2 \pm 10,9$. Die Anzahl an NPBs und NBUDs konnte im Mittel um $1,2 \pm 2,5$ und $1,1 \pm 1,6$ verringert werden.

4.1.2 Gruppe Training & Ernährung

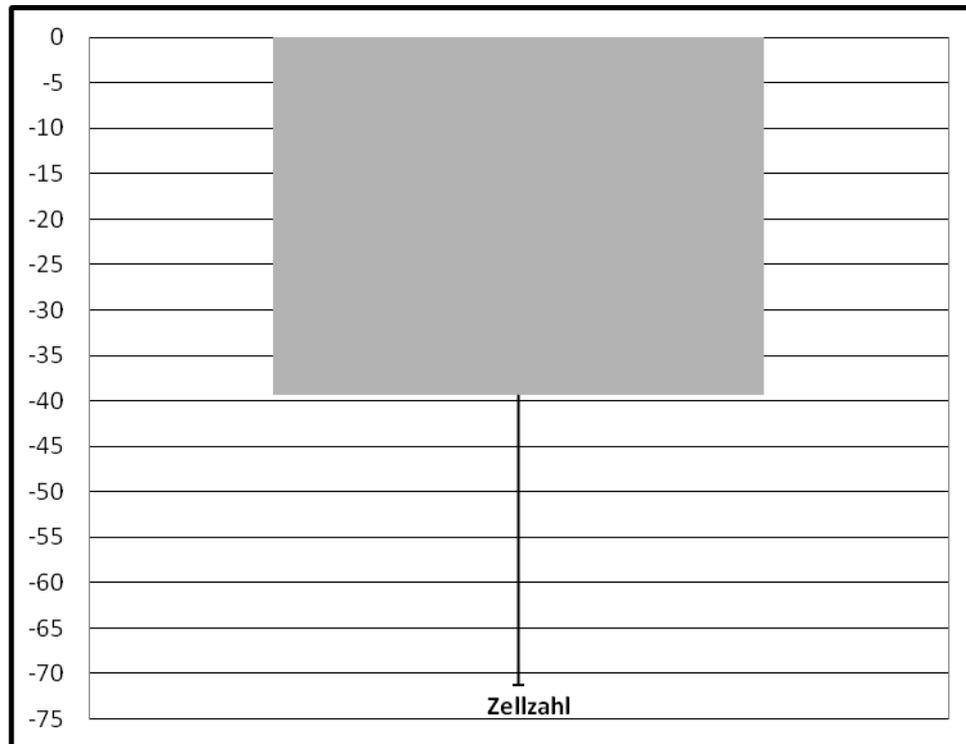


Abbildung 6: Differenz des Mittelwertes der Gesamtzellzahl von T1 zu T2. Zellzahl, Gesamtzellzahl.

Die Gruppe mit der Trainings- und Ernährungsintervention umfasste 8 Personen. Die Gesamtzellzahl änderte sich im Mittel um $39,3 \pm 71,2$ Zellen. Der Mittelwert für die BNCs änderte sich geringfügig ($0,5 \pm 6,1$). Für die Parameter Apoptosen, Nekrosen, NDI und NDCI waren nur sehr geringe bis keine Veränderungen festzustellen.

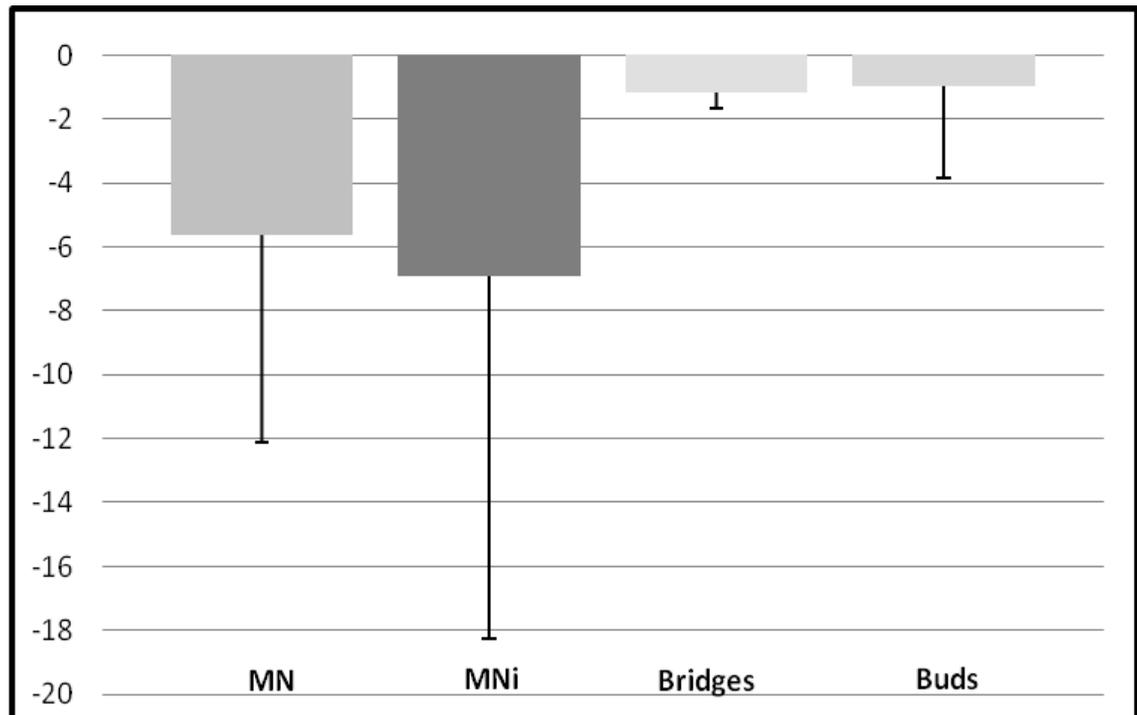


Abbildung 7: Differenz des Mittelwertes der MN-Zellen, der Gesamtzahl an MNi, der NPBs und NBUDs von T1 zu T2. MN, MN-Zellen; MNi, Gesamtzahl MNi; Bridges, NPBs; Buds, NBUDs.

Auch in der Gruppe Training und Ernährung gab es eine deutliche Reduktion sowohl bei den MN-Zellen als auch in der Gesamtzahl an MNi. MN-Zellen konnten um durchschnittlich $5,6 \pm 12,1$ Zellen verringert werden, die Gesamtzahl an MNi wies eine Abnahme von durchschnittlich $6,9 \pm 18,2$ MNi auf. Die Reduktion des Mittelwertes für NPBs um $1,3 \pm 0,7$ war signifikant ($p = 0,001$). Die Anzahl an NBUDs konnte im Mittel um $0,97 \pm 3,84$ NBUDs gesenkt werden.

4.1.3 Kognitionsgruppe

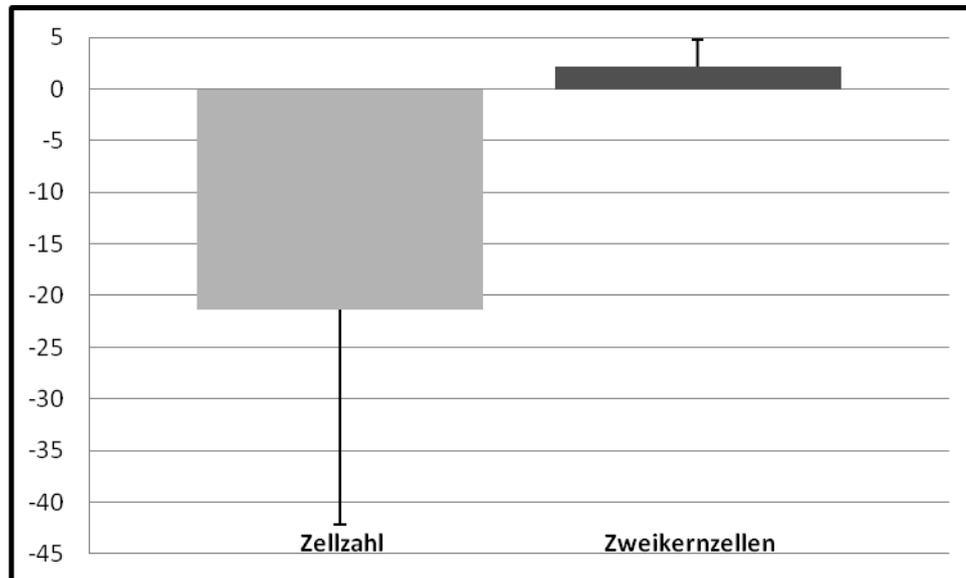


Abbildung 8: Differenz des Mittelwertes der Gesamtzellzahl und der Zweikernzellzahl von T1 zu T2. Zellzahl, Gesamtzellzahl; Zweikernzellen, Zweikernzellzahl.

Die Kognitionsgruppe, die 8 Personen umfasste, zeigte eine im Durchschnitt um $21,3 \pm 42,2$ Zellen geringere Gesamtzellzahl. BNCs konnten im Mittel um $2,2 \pm 4,8$ Zellen reduziert werden. Apoptosen, Nekrosen, NDI und NDCI zeigten sehr geringe bis keine Unterschiede von T1 zu T2.

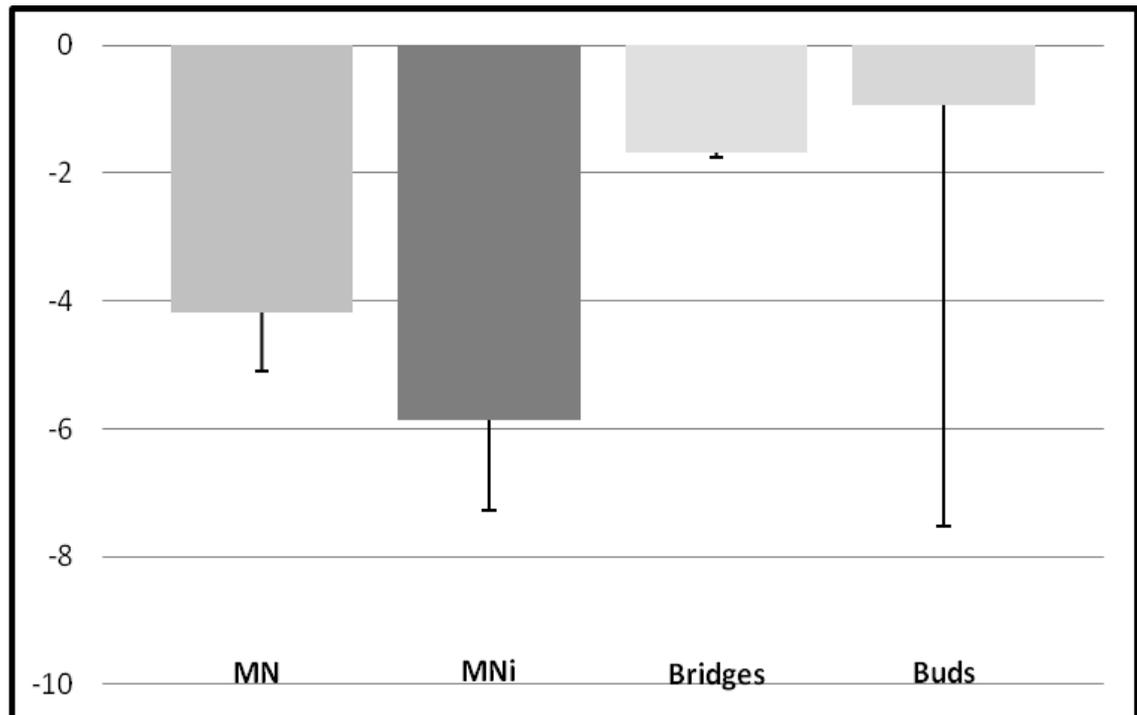


Abbildung 9: Differenz des Mittelwertes der MN-Zellen, der Gesamtzahl an MNi, der NPBs und der NDUDs von T1 zu T2. MN, MN-Zellen; MNi, Gesamtzahl MNi; Bridges, NPBs; Buds, NBUDs.

Auch in der Kognitionsgruppe konnten Veränderungen der MN-Variablen festgestellt werden. MN-Zellen nahmen um durchschnittlich $4,2 \pm 5,1$ Zellen ab, der Mittelwert für die Gesamtzahl an MNi nahm um $5,9 \pm 7,3$ MNi ab. Wiederum signifikant ($p=0,022$) zeigte sich die Reduktion der durchschnittlichen Anzahl an NPBs um $1,68 \pm 1,62$ NPBs. Die NBUDs reduzierten sich um durchschnittlich $0,94 \pm 7,00$ NBUDs.

4.1.4 Interventionsergebnisse Männer

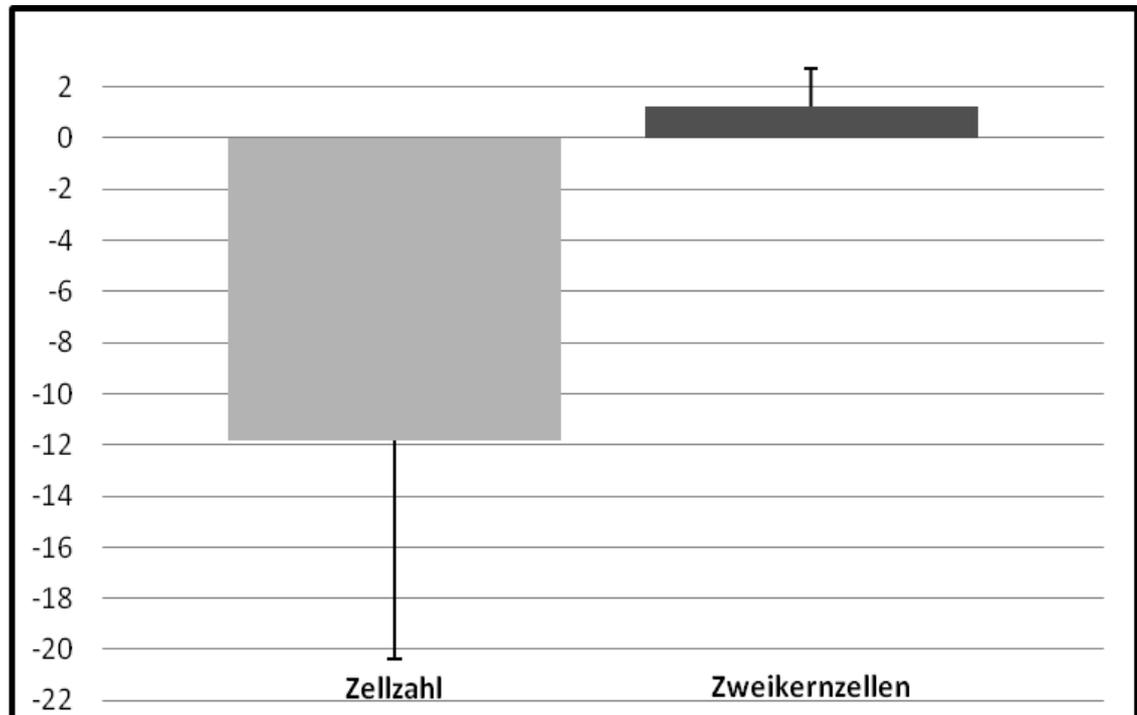


Abbildung 10: Differenz des Mittelwertes der Gesamtzellzahl und der Zweikernzellzahl von T1 zu T2. Zellzahl, Gesamtzellzahl; Zweikernzellen, Zweikernzellzahl.

In der 8 Personen umfassenden Männergruppe nahm der Mittelwert der Gesamtzellzahl um $11,9 \pm 20,4$ Zellen ab. BNCs nahmen im Mittel um $1,22 \pm 2,76$ Zellen zu. Apoptosen, Nekrosen, NDI und NDCI nahmen nur sehr geringfügig ab.

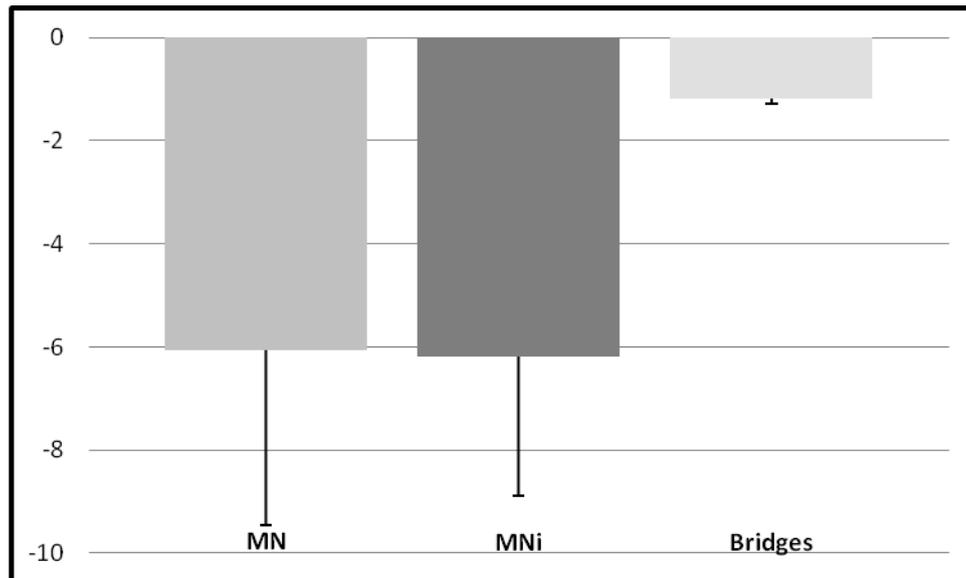


Abbildung 11: Differenz des Mittelwertes der MN-Zellen, der Gesamtzahl an MNi und der NPBs von T1 zu T2. MN, Mn-Zellen; MNi, Gesamtzahl MNi; Bridges, NPBs.

In der Männergruppe nahm der Mittelwert für MN-Zellen um $6,1 \pm 9,5$ MN-Zellen ab. Die Gesamtzahl an MNi senkte sich um durchschnittlich $6,2 \pm 8,9$ MNi. NPBs wurden signifikant ($p=0,040$) reduziert. Im Durchschnitt gab es eine Abnahme von $1,2 \pm 1,3$ NPBs. Für NBUDs konnte nur eine sehr geringe Reduktion festgestellt werden.

4.1.5 Interventionsergebnisse Frauen

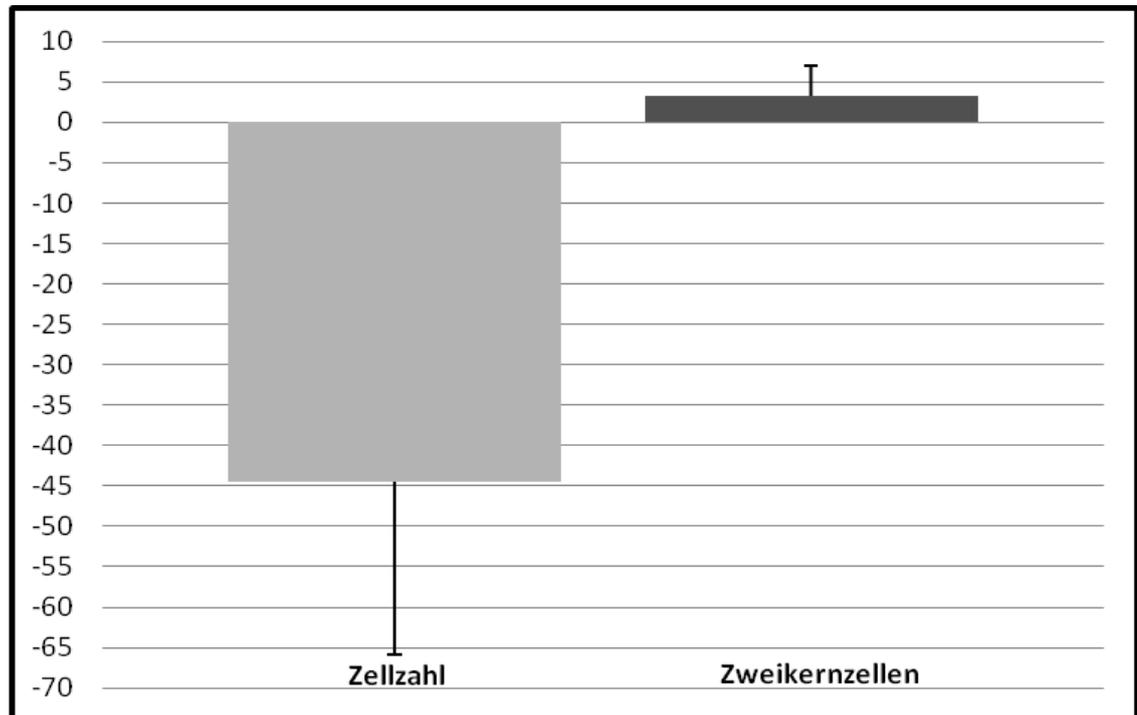


Abbildung 12: Differenz der Mittelwerte der Gesamtzellzahl und der Zweikernzellzahl von T1 zu T2. Zellzahl, Gesamtzellzahl; Zweikernzellen, Zweikernzellzahl.

Die Reduktion der Gesamtzellzahl in der Frauengruppe (18 Personen) beträgt im Mittel $44,4 \pm 65,8$ Zellen und ist damit signifikant ($p=0,011$). Der Mittelwert für BNCs stieg um $3,2 \pm 7,0$ Zellen. Die Parameter Apoptose, Nekrose, NDI und NDCI zeigten keine erheblichen Veränderungen von T1 zu T2.

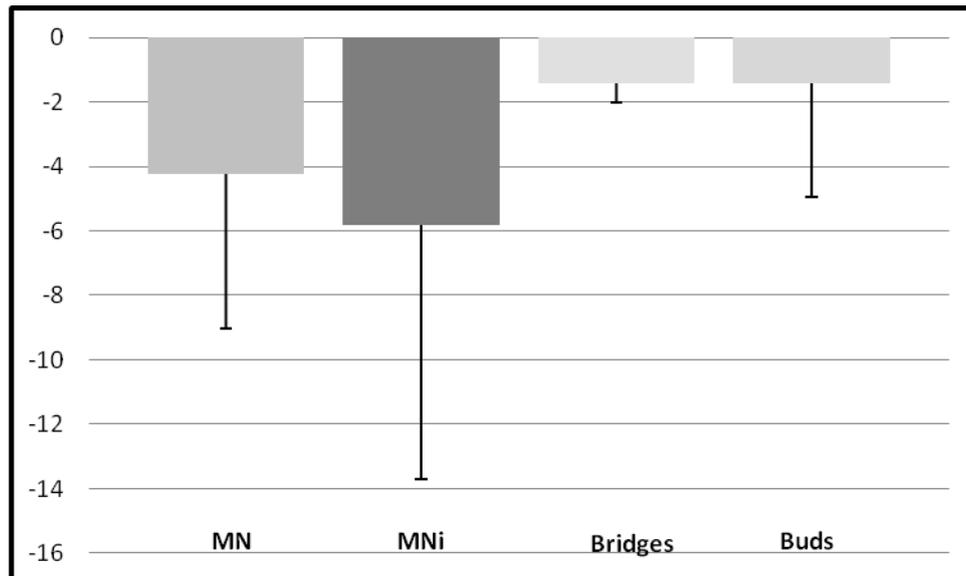


Abbildung 13: Differenz der Mittelwerte der MN-Zellen, der Gesamtzahl an MNi, der NPBs und der NBUDs von T1 zu T2. MN, MN-Zellen; MNi, Gesamtzahl MNi; Bridges, NPBs; Buds, NBUDs.

Das Auftreten von MN-Zellen reduzierte sich in dieser Gruppe im Mittel um $4,25 \pm 9,3$ Zellen. Die Gesamtzahl an MNi reduzierte sich im Mittel um $5,8 \pm 13,7$ MNi. Eine signifikante ($p=0,007$) Reduktion gab es bei den NPBs, die $1,4 \pm 2,0$ NPBs betrug. Um einen ähnlich hohen Wert ($1,4 \pm 4,9$) konnte der Mittelwert für NBUDs reduziert werden.

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

In allen untersuchten Gruppen kam es zu einer deutlichen Reduktion der Gesamtzellzahl, wobei lediglich die Abnahme in der Frauengruppe signifikant war. Des Weiteren kam es in jeder Gruppe zu einem leichten, nicht signifikanten, Anstieg der BNCs, wobei der Anstieg in der Gruppe Training& Ernährung am geringsten ausfiel.

Für die Anzahl an Apoptosen und Nekrosen konnten nur sehr geringe bis keine Veränderungen von T1 zu T2 festgestellt werden. Durch die bereits sehr geringen Ausgangswerte für diese Parameter ergaben sich keine signifikanten Veränderungen.

Auch der NDI und der NDCI erfuhren nur geringe bis keine Veränderungen.

Die Mittelwerte der MN-Zellzahl und die Gesamtzahl an MNi konnte zwar in keiner Gruppe signifikant reduziert werden, jedoch konnten deutliche Abnahmen festgestellt werden.

Derzeit gibt es keine Studien und Informationen, die die Auswirkungen eines Krafttrainings und einer Ernährungsintervention auf die MNi-Häufigkeit älterer Personen untersuchen. Es existieren lediglich wenige Studien, die die Auswirkungen einer Ausdauerbelastung auf die MNi-Entstehung untersuchten. Jedoch zeigten diese sehr heterogene Ergebnisse (siehe Punkt 2.4.6).

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein moderates Krafttraining, mit oder ohne Ernährungsintervention, die MNi-Häufigkeit in älteren Personen reduzieren kann. Interessanterweise zeigte sich ebenfalls eine deutliche Abnahme der MN-Parameter in der Kognitionsgruppe. Das kognitive Training und die damit verbundenen zusätzlichen Treffen könnten zu einer verbesserten geistigen Leistungsfähigkeit der ProbandInnen geführt haben. Die verbesserte psychische Verfassung könnte einen direkten Einfluss auf das körperliche Wohlbefinden haben und so auch die Häufigkeit der untersuchten Parameter beeinflussen.

Die Anzahl an NPBs und NBUDs konnten im Durchschnitt ebenfalls reduziert werden.

Die Abnahmen für NPBs waren in der Gruppe Training & Ernährung, in der Kognitionsgruppe und bei Männern und Frauen signifikant. Trotz der geringen Probandenzahlen in den Gruppen Training& Ernährung, Kontrolle und Männern war die Abnahme an NPBs signifikant. Die Frauen stellten mit 18 Personen eine größere Gruppe als die Männer dar, was schon zu signifikanten Ergebnissen reichte.

Leider gibt es im Moment keine Literatur, die den spezifischen Unterschied zwischen Männern und Frauen in Bezug auf NPBs aber auch NBUDs untersucht hat. Die gängige Literatur konzentriert sich vor allem auf den Unterschied in der MN-Häufigkeit.

6. GRUPPENVERGLEICHE DER CBMN- ASSAY-PARAMETER ZU T2

6.1 Vergleich der Gruppe Training mit der Gruppe Training& Ernährung

T2	Gruppe	N	Mittelwert	Standardabweichung
Gesamtzellzahl	Training	10	627,7	17,5
	Training& Ernährung	8	624,8	36,7
BNCs	Training	10	80,0	2,3
	Training& Ernährung	8	76,5	7,6
Apoptosen	Training	10	0,7	0,3
	Training& Ernährung	8	0,7	0,5
Nekrosen	Training	10	0,8	0,3
	Training& Ernährung	8	0,8	0,5
NDI	Training	10	2,0	0,1
	Training& Ernährung	8	2,0	0,1
NDCI	Training	10	2,0	0,1
	Training& Ernährung	8	2,0	0,1
MNi	Training	10	17,5	15,1
	Training& Ernährung	8	19,6	10,6
Mni-Total	Training	10	21,3	17,4
	Training& Ernährung	8	23,3	13,3
NPBs	Training	10	1,0	1,0
	Training& Ernährung	8	0,7	0,8
NBUDs	Training	10	4,5	2,6
	Training& Ernährung	8	5,2	2,5

Tabelle 6: Vergleich der Parameter zu T2 zwischen den Gruppen Training und Training& Ernährung. N, Anzahl der Probanden

Der Vergleich dieser beiden Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Parametern zum Zeitpunkt T2.

6.2 Vergleich der Gruppe Training& Ernährung mit der Kontrollgruppe

T2	Group	N	Mittelwert	Standardabweichung
Gesamtzellzahl	Training& Ernährung	8	624,8	36,7
	Kontrolle	8	638,2	14,7
BNCs	Training& Ernährung	8	76,5	7,6
	Kontrolle	8	78,6	1,7
Apoptosen	Training& Ernährung	8	0,7	0,5
	Kontrolle	8	0,7	0,1
Nekrosen	Training& Ernährung	8	0,8	0,5
	Kontrolle	8	0,8	0,3
NDI	Training& Ernährung	8	2,0	0,1
	Kontrolle	8	2,0	0,1
NDCI	Training& Ernährung	8	2,0	0,1
	Kontrolle	8	2,0	0,1
Mni	Training& Ernährung	8	19,5	10,6
	Kontrolle	8	13,9	6,3
Mni-Total	Training& Ernährung	8	23,3	13,3
	Kontrolle	8	16,0	7,7
NPBs	Training& Ernährung	8	0,7	0,8
	Kontrolle	8	0,8	0,8
NBUDs	Training& Ernährung	8	5,2	2,5
	Kontrolle	8	7,3	4,2

Tabelle 7: Vergleich der Parameter zu T2 zwischen der Gruppe Training& Ernährung und der Kontrollgruppe. N, Anzahl der Probanden

Zwischen diesen beiden Gruppen konnten auch keine signifikanten Unterschiede betreffend die untersuchten Parameter festgestellt werden. Lediglich für die Variablen MN-Zellen und MNI-Total konnten deutlich geringere Mittelwerte in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt T2 festgestellt werden. Da die durchschnittliche Abnahme von T1 zu T2 etwa gleich ausfiel, kann davon ausgegangen werden, dass sich

die Ausgangswerte etwa im selben Maß voneinander unterschieden. Im weiteren Verlauf der Studie sollte sich die Gruppe Training& Ernährung der Kontrollgruppe annähern oder sie „überholen“, um ein zufriedenstellendes Studienergebnis zu erzielen.

6.3 Vergleich der Trainingsgruppe mit der Kontrollgruppe

T2	Group	N	Mittelwert	Standardabweichung
Gesamtzellzahl	Training	10	627,7	17,5
	Kontrolle	8	638,2	14,7
BNCs	Training	10	80,0	2,2
	Kontrolle	8	78,6	1,7
Apoptosen	Training	10	0,7	0,3
	Kontrolle	8	0,7	0,1
Nekrosen	Training	10	0,8	0,3
	Kontrolle	8	0,8	0,3
NDI	Training	10	2,0	0,1
	Kontrolle	8	2,0	0,1
NDCI	Training	10	2,0	0,1
	Kontrolle	8	2,0	0,1
MN-Zellen	Training	10	17,5	15,1
	Kontrolle	8	13,9	6,3
Mni-Total	Training	10	21,3	17,4
	Kontrolle	8	16,0	7,7
NPBs	Training	10	1,0	1,0
	Kontrolle	8	0,8	0,8
NBUDs	Training	10	4,6	2,6
	Kontrolle	8	7,3	4,2

Tabelle 8: Vergleich der Parameter zu T2 zwischen der Trainingsgruppe und der Kontrollgruppe. N, Anzahl der Probanden

Dieser Gruppenvergleich zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Parametern. Höhere (nicht signifikant) Werte konnten in der Trainingsgruppe für die Parameter MN-Zellen und Mni-Total festgestellt werden.

7. SCHLUSSBETRACHTUNG

Das Alter eines Menschen wird mit einem vermehrten Auftreten von Parametern der DNA-Schädigung, insbesondere mit dem Auftreten von MNi assoziiert [FENECH, BONASSI, 2011]. Die Fragestellung, ob ein moderates Krafttraining mit/ohne einer Ernährungsintervention mit FortiFit die Häufigkeit der MNi im Speziellen von Personen sehr hohen Alters reduziert, wurde mit Hilfe des CBMN-Assay ermittelt. Das Training soll durch Senkung der Parameter das Krebsrisiko vermindern und die Lebensqualität im Alter erhöhen.

Bisher gibt es nur wenige Studien, die den Zusammenhang zwischen physischer Aktivität und DNA-Schädigungen untersuchten. Jedoch wurde bisher keine Studie durchgeführt, die den Einfluss eines regelmäßigen Trainings in Personen sehr hohen Alters untersuchte.

Ein Fingerzeig, dass ein regelmäßiges, dem Alter entsprechendes Training die DNA-Schädigungen reduzieren kann, zeigten die Auswertungen der Ergebnisse.

Die Werte für MNi konnten in allen Gruppen reduziert werden. Die Reduktionen waren zwar nicht signifikant, aber in einem sehr deutlichen Ausmaß. Interessant war, dass auch die Kontrollgruppe, die mit „Denksport“ beschäftigt wurde, eine erhebliche Reduktion der MNi erfuhr. Der weitere Studienverlauf sollte zeigen, ob jahreszeitliche Einflüsse oder auch die Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit eine Rolle spielen.

Ein weiterer Hinweis, dass körperliche Aktivität im Alter DNA-Schädigungen entgegenwirkt, zeigten die NPBs. Diese konnten, die Trainingsgruppe ausgenommen, in allen Gruppen signifikant reduziert werden. Trotz der kleinen Probandenzahlen in den Gruppen Training& Ernährung, Kontrolle und Männer konnten NPBs signifikant reduziert werden. Diese Tendenz sollte sich hoffentlich im Laufe der Studie durch eine höhere Probandenzahl bestätigen. Die Frauengruppe zeigte auch eine signifikante Reduktion der Gesamtzellzahl. Die einzelnen Abnahmen der Parameter hatten etwa dieselbe Größenordnung.

Die Ergebnisse des CBMN-Assay für den Zeitpunkt T2 wurden gruppenweise miteinander verglichen. Aus dieser Untersuchung ergab sich, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ausgangswerten für den nächsten Untersuchungsdurchgang gibt.

Wie bereits erwähnt, gibt es derzeit keine ähnlichen Studien, mit denen die Ergebnisse dieser Arbeit verglichen werden könnten. Es existieren lediglich Studien, die die Auswirkungen von verschiedenen Formen des Ausdauertrainings untersuchten und auch sehr unterschiedliche Ergebnisse zeigten. Es wurde die Abhängigkeit der MNi-Häufigkeit vom Alter wissenschaftlich belegt, wobei die MN-Anzahl bis zum Alter von etwa 70 Jahren anstieg. Allerdings nahm die MN-Häufigkeit ab etwa 70 Jahren wieder ab. Die Wirksamkeit einer Trainings- und Ernährungsintervention auf die MNi-Häufigkeit in Personen sehr hohen Alters ist bisher noch nicht untersucht worden.

8. ZUSAMMENFASSUNG

Die Lebenserwartung der Bevölkerung wächst stetig an [STATISTIK AUSTRIA 2012]. Allerdings sinkt dabei oft die Lebensqualität. Erkrankungen wie Sarkopenie können die Lebensqualität durch Restriktion der körperlichen Aktivität erheblich beeinflussen. Eine sinnvolle Maßnahme, um der Sarkopenie präventiv entgegen zu wirken, ist ein progressives Krafttraining und eine dem Alter angepasste Ernährung [LOENEKKE, PUJOL, 2011]. Durch eine altersbedingt erhöhte Mikrokern (MN)i-Häufigkeit steigt zusätzlich das Krebsrisiko [BONASSI et al., 2007].

Diese Diplomarbeit liefert erste Ergebnisse der Forschungsplattform Active-Ageing in Bezug auf zellbiologische Veränderungen bzw. DNA-Schädigungen. Diese Arbeit untersuchte als Teil der Studie den Einfluss eines speziellen, progressiven Krafttrainings mit oder ohne einer Ernährungsintervention auf die Häufigkeit von Markern der DNA-Schädigung in den Lymphozyten der Studienteilnehmer. Das Hauptaugenmerk wurde auf das Auftreten von MNi gelegt.

Für die Untersuchungen wurden die Studienteilnehmer in 3 Gruppen unterteilt: Trainingsgruppe (N=10), Gruppe Training& Ernährung (N=8) und Kontrollgruppe (N=8). Für die Erhebung der Parameter wurde der CBMN-Assay gewählt, der sich als verlässlichste Untersuchungsmethode herauskristallisierte hat, um Chromosomenschäden festzustellen. Es wurden die Mittelwertveränderungen der Parameter in den einzelnen Gruppen vom Zeitpunkt T1 (Beginn der Studie) auf T2 (nach 3 Monaten Intervention) gemessen. Diese Analyse wurde auch für Männer (N=8) und Frauen (N=18) getrennt durchgeführt. Die 3 Gruppen wurden auch zum Zeitpunkt T2 miteinander verglichen, um eventuelle signifikante Unterschiede zwischen den Ausgangswerten für T3 (nach 6 Monaten Intervention) zu erkennen.

Wenige Studien wurden bisher durchgeführt, die die Auswirkungen von körperlichem Training auf DNA-Schäden untersuchten. Zahlreiche Studien wiederum untersuchten den Einfluss der Ernährung auf die Stabilität der DNA. Insbesondere die

Mikronährstoffe Vitamin B12 und die Folsäure, die auch zu den altersbedingten Risikonährstoffen zählen, konnten stabilisierende Effekte auf die DNA erzielen.

Die Trainingsgruppe und die Gruppe Training& Ernährung erhielten ein spezielles Krafttrainingsprogramm, welches gemeinsam mit SportwissenschaftlerInnen 2x/Woche durchgeführt wurde. Die Teilnehmer der Gruppe Training& Ernährung erhielten zusätzlich eine Ernährungsintervention in Form eines Nahrungsergänzungsmittels, das täglich zum Frühstück eingenommen wurde. Es handelt sich um ein Nahrungsergänzungsmittel, das eine hohe Konzentration essentieller Aminosäuren enthält und Sarkopenie entgegenwirken soll. In der Kognitionsgruppe wurde ein Gedächtnistraining durchgeführt.

Die MNI-Häufigkeit wurde in keiner der 3 Gruppen signifikant reduziert, aber die Werte zeigten Tendenzen einer Reduktion. Die NPBs reduzierten sich, mit Ausnahme der Trainingsgruppe, in allen Gruppen trotz kleiner Probandenzahl signifikant. Der Vergleich der Ausgangswerte für den nächsten Untersuchungsdurchgang erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Ergebnisse des ersten Teils der Studie zeigen eine Tendenz der Reduktion von Chromosomenschäden durch die Intervention.

9.SUMMARY

The life expectancy of the population grows consistently [SATISTIK AUSTRIA, 2012], however is often associated with a decreased quality of life. Diseases like sarcopenia influence the quality of life significantly by reducing the mobility. A reasonable method to prevent sarcopenia is progressive resistance training and an age-adapted diet quality [LOENEKKE AND PUJOL, 2011]. An age-related increase of micronuclei (MNI) additional is associated with the cancer risk [BONASSI et al., 2007].

This diploma thesis shows the first results of the research-platform Active-Ageing referring to DNA-damage. The thesis evaluated, as a part of this study, the impact of an specific, progressive strength training with or without a dietary supplement (FortiFit) on the frequency of markers of DNA-damage in peripheral blood lymphocytes. The main focus was the evaluation of the MNI-frequency.

For the research the participants of the study were divided into 3 groups: training group (N=10), group training& nutrition (N=8) and control group (cognitive group) (N=8). For the evaluation of the parameters the CBMN-assay was selected, since it is the most reliable method to determine chromosomal-damages. The changes of the mean values of the parameters in the groups from time T1 (study entry) to time T2 (after 3 months of intervention) were determined. This analysis was also executed separately for men (N=8) and women (N=18). The 3 groups were also compared at time T2 to recognize significant differences between the values for T3 (after 6 months intervention).

Only few studies examined the effect of physical activity on DNA-damage, but numerous studies examined the influence of nutrition on DNA-stability. Particularly the micronutrients vitamin B12 and folic acid, which are age related risk-nutrients, showed stabilizing effects on DNA.

The training group and the group training& nutrition received a specific strength training program, which was executed by sport scientists two times per week. The participants of the group training& nutrition additionally received FortiFit as dietary

supplement, which was given daily at breakfast time. It is a dietary supplement that consists of a high concentration of essential amino acids and to fight against sarcopenia. The cognitive group received a mental training.

The frequency of MNi was not significantly reduced in the three groups. In spite of a low number of participants, NPBs were reduced significantly in each group, except in the group training. The comparison of the basic values for the further research showed no significant differences between the groups.

The results of this initial part of the study showed tendencies of reduced chromosomal damage due to the intervention.

10. LITERATURVERZEICHNIS

ABE T, KEARNS C F, SATO Y. Muscle size and strength are increased following walk training with restricted venous blood flow from the leg muscle, Kaatsu-walk training. *Journal of Applied Physiology* 2006; 100: 1460-1466.

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

BIESALSKI H K, BISCHOFF S C, PUCHSTEIN C. Ernährung im Alter. In: *Ernährungsmedizin*. Thieme Verlag, Stuttgart, 2010; 358-369.

BLOUNT B C, MACK M M, WEHR C M, MACGREGOR J T, HIATT R A, WANG G, WICKRAMASINGHE S N, EVERSON R B, AMES B N. Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proceedings of the national academy of science of the United States of America* 1997; 94(7):3290-5.

BOLOGNESI C, ABBONDANDOLO A, BARALE R, CASALONE R, DALPRA L, DE FERRARI M, DEGRASSI F, FORNI A, LAMBERTI L, LANDO C, MIGLIORE L, PADOVANI P, PASQUINI R, PUNTONI R, SBRANA I, STELLA M, BONASSI S. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 1997; vol. 6: 249-256.

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

BONASSI S, ZNAOR A, CEPPI M, LANDO C, CHANG W P, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDERS M, ZEIGER E, BAN S, BARALE R, BIGATTI M P, BOLOGNESI C, CEBULSKA-WASILEWSKA A, FABIANOVA E, FUCIC A, HAGMAR L, JOKSIC G, MARTELLI A, MIGLIORE L, MIRKOVA E, SCARFI M R, ZIJNO A, NORPPA H, FENECH M. An increased micronucleus frequency in

peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007; vol. 28 no. 3: 625-631.

CHANG P, LI Y, LI D. Micronuclei levels in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker for pancreatic cancer risk. *Carcinogenesis* 2010; vol. 32 no. 2: 210-215.

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

DUFFAUD F, ORSIERE T, VILLANI P, PELISSIER A.L, VOLOT F, FAVR R, BOTTA A. Comparison between micronucleated lymphocyte rates observed in healthy subjects and cancer patients. *Mutagenesis* 1997; vol. 12 no. 4: 227-231.

EL-ZEIN R A, SCHABATH M B, ETZEL C J, LOPEZ M S, FRANKLIN J D, SPITZ M R. Cytokinesis-blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk. *Cancer Research* 2006; 66: 6449-6456.

EVANS W J. Protein nutrition, exercise and ageing. REVIEW. *Journal of the American College of Nutrition* 2004; vol. 23 no. 6: 601S-609S

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

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

FENECH M, DREOSTI I, AITKEN C. Vitamin-E supplements and their effect on vitamin-E status in blood and genetic damage rate in peripheral blood lymphocytes. *Carcinogenesis* 1997; vol.18 no.2: 359-364.

FENECH M, DREOSTI I, RINALDI J. Folate, vitamin B12, homocysteine status and chromosome damage rate in lymphocytes of older men. *Carcinogenesis* 1997; vol.18 no.7: 1329-1336.

FENECH M, MORLEY A A. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutation Research* 1986; 148: 99-105.

FENECH M, NEVILLE S, RINALDI J. Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes. *Mutation Research* 1994; 313: 203-207.

FENECH M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2007; vol. 2 no. 5: 1084-1104.

FENECH M. Dietary reference values of individual micronutrients and nutrients for genome damage prevention: current status and a road map to the future. *American Journal Clinical Nutrition* 2010; 91: 1438S-54S.

FENECH M. The role of folic acid and vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutation research* 2001; 475(1-2): 57-67.

GAZIEV A I, SOLUGUB G R, FORMENKO L A, ZAICHKINA S I, KOSYAKOVA N I, BRADBURY R J. Effect of vitamin-antioxidant micronutrients on the frequency of spontaneous and in vitro gamma-ray-induced micronuclei in lymphocytes of donors: the age factor. *Carcinogenesis* 1996; 17(3): 493-9.

ISHIKAWA H, TIAN Y, YAMAUCHI T. Influence of gender, age and lifestyle factors on micronuclei frequency in healthy Japanese populations. Short communication. *Journal of occupational health* 2003; 45: 179-181.

KOOPMAN R, VAN LOON L J C. Aging, exercise and muscle protein metabolism. REVIEW. *Journal of applied physiology* 2009; 106: 2040-2048.

LAL A, AMES B N. Association of chromosome damage detected as micronuclei with hematological diseases and micronutrient status. *Mutagenesis* 2011; 26(1): 57-62.

LOENNEKE J P, PUJOL T J. Sarcopenia: An emphasis on occlusion training and dietary protein. REVIEW. Hippokratia 2011; 15, 2: 132-137.

LÖFFLER G. Viren. In: Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 2003; 431-443.

MIGLIORE L, COPPEDE F, FENECH M, THOMAS P. Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. REVIEW. Mutagenesis 2011; vol.26 no.1: 85-92.

MILIC M, ROZGAJ R, KASUBA V, ORESCANIN V, BALIJA M, JUKIC I. Correlation between folate and vitamin B12 and markers of DNA stability in healthy men: preliminary results. Acta Biochimica Polonica 2010; vol. 57 no.3: 339-345.

NEUBAUER O, KÖNIG D, KERN N, NICS L, WAGNER KH. No indications of persistent oxidative stress in response to an ironman triathlon. Medicine & science in sports & exercise 2008; vol 40 no.12: 2119-2128.

NORPPA H, FALCK G C. What do human micronuclei contain?. Mutagenesis 2003; 18: 221-223.

PETERS EM, VAN EDEN M, TYLER N, RAMAUTAR A, CHUTURGOON AA. Prolonged exercise does not cause lymphocyte DNA damage or increased apoptosis in well-trained endurance athletes. European journal of applied physiology 2006; 98(2): 124-31.

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

STATISTIK AUSTRIA. Indikatoren zur Sterblichkeit und Lebenserwartung (inkl. Säuglingssterblichkeit) seit 1961. www.statistik.at/web.de/statistiken/bevoelkerung/demographische_masszahlen/demographische_indikatoren/index.html; abgerufen am 7 September 2012.

STEFANIE R, OLIVER N, VERONIKA E, SIEGFRIED K, KARL-HEINZ W. No acute and persistent DNA damage after an Ironman triathlon. *Cancer epidemiology, biomarkers and prevention*. 2008; 17(8): 1919-9.

SUNDELL J. Resistance training is an effective tool against metabolic and frailty syndromes. REVIEW. *Advances in preventive medicine* volume 2011, Article ID 984683, 7 pages.

SUROWY H, RINCKLEB A, LUEDEKE M, STUBER M, WECKER A, VARGA D, MAIER C, HOEGEL J, VOGEL W. Heritability of baseline and induced micronucleus frequencies. *Mutagenesis* 2011; vol.26 no.1: 111-117.

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

TRIPPI F, BOTTO N, SCARPATO R, PETROZZI L, BONUCCELLI U, LATORRACA S, SORBI S, MIGLIORE L. Spontaneous and induced chromosome damage in somatic cells of sporadic and familial Alzheimers disease patients. *Mutagenesis* 2001; vol. 16 no.4: 323-327.

UMEGAKI K, HIGUCHI M, INOUE K, ESASHI T. Influence of one bout of intensive running on lymphocyte micronucleus frequencies in endurance-trained and untrained men. *International journal of sports medicine* 1998; 19(8): 581-5.

WOJDA A, ZIETKIEWICZ E, WITT M. Effects of age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects. *Mutagenesis* 2007; vol. 22 no. 3: 195-200.

GAZIEV A I, SOLUGUB G R, FORMENKO L A, ZAICHKINA S I, KOSYAKOVA N I, BRADBURY R J. Effect of vitamin-antioxidant micronutrients on the frequency of spontaneous and in vitro gamma-ray-induced micronuclei in lymphocytes of donors: the age factor. *Carcinogenesis* 1996; 17(3): 493-9.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Name: Klemens Johannes Krejci

Geburtsdatum: 05/07/1982

Familienstand: ledig

Ausbildung:

10/2002-11/2012: Studium Ernährungswissenschaften, Universität Wien

08/2011 und 08/2012: Ausbildung in Lymphdrainage, Sportuniversität Wien

01/2012: Ausbildung in Medical (Physio-)Taping, Massageschule Hilpert, Wien

10/2011-6/2012: Ausbildung zum klassischen Masseur, Sportuniversität Wien

10/2007-6/2008: Ausbildung zum Gesund-und Vitalcoach, Sportuniversität Wien

Schulische Ausbildung:

09/1992-06/2001: Stiftsgymnasium St.Paul im Lavanttal, Matura

09/1988-06/1992: Volksschule 17, Klagenfurt

Berufserfahrung und Praktika:

0/7 2012: LVA GmbH, Abteilung für Rückstandsanalytik

0/6 2011: LVA GmbH, Abteilung für Rückstandsanalytik

0/7-0/8 2010: LVA GmbH, Abteilung für Rückstandsanalytik

0/9 2009: LVA GmbH, Abteilung für Rückstandsanalytik

0/7 2008: LVA GmbH, Abteilung für Rückstandsanalytik