



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

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

verfasst von / submitted by

Ricarda Rosalia Baron, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc)

Wien, 2021 / Vienna, 2021

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

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

Danksagung

Zuerst gebührt mein Dank Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner, der meine Masterarbeit betreut und begutachtet hat.

Ein besonderer Dank gilt Laura Bragagna, Dipl.-Ing. für die großartige Unterstützung und Betreuung, die von der Einschulung im Labor über die Durchführung bis hin zum Verfassen dieser Arbeit reichte.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium durch ihre Unterstützung ermöglicht haben und stets ein offenes Ohr für mich hatten.

Inhaltsverzeichnis

I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	III
II. TABELLENVERZEICHNIS	V
III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
1 EINLEITUNG.....	1
2 LITERATUR	3
2.1 ALTERUNGSPROZESSE	3
2.2 THEORIEN DES ALTERNS	6
2.3 FREIE RADIKALE UND OXIDATIVER STRESS	7
2.4 ANTIOXIDANTIEN	10
2.5 PHYSIOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN IM ALTER	13
2.6 PROTEINAUFNAHME IM ALTER.....	14
2.7 KRAFTTRAINING IM ALTER.....	16
2.7.1 TRAINING IN KOMBINATION MIT PROTEINEN IM ALTER.....	19
2.7.2 OXIDATIVER STRESS UND SPORTLICHE AKTIVITÄT	21
2.7.3 ANTIOXIDANTIEN UND SPORTLICHE AKTIVITÄT	22
2.8 BESTIMMUNG DES ANTIOXIDATIVEN POTENZIALS.....	23
3 METHODIK	26
3.1 STUDIENDESIGN.....	26
3.2 REKRUTIERUNG.....	26
3.3 RANDOMISIERUNG	27
3.4 INTERVENTION	28
3.4.1 ERNÄHRUNGSINTERVENTION	29
3.4.2 SPORTTEST UND KRAFTTRAININGSINTERVENTION	30
3.5 MESSMETHODE FRAP	33
3.5.1 MESSPRINZIP.....	33
3.5.2 CHEMIKALIEN	34
3.5.3 PROBENAUFBEREITUNG.....	35
3.5.4 GERÄTE UND EINSTELLUNG	36
3.5.5 LÖSUNGHERSTELLUNG	38
3.5.6 DURCHFÜHRUNG	39
3.5.7 AUSWERTUNG.....	41
3.6 MESSMETHODE GSH/GSSG	42
3.6.1 MESSPRINZIP.....	42
3.6.2 CHEMIKALIEN	46
3.6.3 PROBENAUFBEREITUNG.....	46
3.6.4 GERÄTE UND EINSTELLUNG	48
3.6.5 LÖSUNGHERSTELLUNG	50
3.6.6 DURCHFÜHRUNG	51
3.6.7 AUSWERTUNG.....	54

3.7	GSH/GSSG-RATIO	55
3.7.1	BERECHNUNG GSH/GSSG-RATIO	55
3.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	56
<u>4</u>	<u>ERGEBNISSE.....</u>	<u>57</u>
4.1	ANALYSE DER AUSGANGSWERTE – MÄNNER	57
4.2	FRAP – MÄNNER	59
4.2.1	FRAP-KORRELATIONEN – MÄNNER	61
4.3	GSH – MÄNNER.....	65
4.4	GSSG – MÄNNER	66
4.5	GSH/GSSG-RATIO – MÄNNER	68
4.5.1	GSH/GSSG-RATIO-KORRELATIONEN – MÄNNER	69
4.6	FRAP – GESAMTE KOHORTE	71
4.6.1	FRAP-KORRELATIONEN – GESAMTE KOHORTE.....	73
4.7	GSH/GSSG-RATIO – GESAMTE KOHORTE	76
4.7.1	GSH/GSSG-RATIO-KORRELATIONEN – GESAMTE KOHORTE	77
<u>5</u>	<u>DISKUSSION.....</u>	<u>79</u>
<u>6</u>	<u>SCHLUSSBETRACHTUNG.....</u>	<u>85</u>
<u>7</u>	<u>ZUSAMMENFASSUNG.....</u>	<u>87</u>
<u>8</u>	<u>SUMMARY</u>	<u>89</u>
<u>9</u>	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>91</u>

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Neun Kennzeichen des Alterungsprozesses (nach López-Otín et al.).....	3
Abbildung 2: Ungleichgewicht zwischen antioxidativem Schutz und RONS führt zu oxidativem Stress.	9
Abbildung 3: Phenolische Grundstruktur.	11
Abbildung 4: Interaktion der Mangelernährung, Kachexie und Sarkopenie durch physiologische Veränderungen im Alter.	13
Abbildung 5: Belastungsinduzierte Produktion von RONS in der aktiven Muskelfaser (nach Powers et al.).....	21
Abbildung 6: Chronologische Darstellung des Studienablaufs. Unterteilt in K-, PL- und PH- Gruppe zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3.....	28
Abbildung 7: Darstellung der vierstufigen Trainingsintervention.....	31
Abbildung 8: Darstellung des Trainingsprotokolls Seite 1. Biofaktoren, Kniebeuge, Beinbeuger, Latzug und Schulterdrücken.....	32
Abbildung 9: Darstellung des Trainingsprotokolls Seite 2. Beinpresse, Stütz, Rudern und Brustpresse.....	32
Abbildung 10: FRAP-Reaktionsmechanismus.	33
Abbildung 11: Layout der 96-well Mikrotiterplatten 1 und 2. Fe^{2+} (Eisen(II)-lösungen), Trolox, Blank (Blindwert), Plasmaproben.....	40
Abbildung 12: Fe^{2+} -Standardgerade zur Berechnung der FRAP-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$	41
Abbildung 13: Reaktionsprinzip der GSH-Messung. Bindung des Fluoreszenzreagenz OPA an die SH-Gruppe von GSH.	43
Abbildung 14: 1. Reaktionsschritt der GSSG-Messung. Bindung von NEM an die SH-Gruppe von GSH, um Autooxidation zu GSSG zu verhindern.	44
Abbildung 15: 2. Reaktionsschritt der GSSG-Messung. Einsetzung von NaOH, um die Hydrolyse von GSSG zu GSH hervorzurufen.	44
Abbildung 16: 3. Reaktionsschritt der GSSG-Messung. Bindung des Fluoreszenzreagenz OPA an die SH-Gruppe von reduziertem GSH.	45
Abbildung 17: Pipettierschema für die Standardgeraden von GSH und GSSG mit bekannter Konzentration im Bereich von 1 mM bis 1,56 μM	47
Abbildung 18: Zusammenfassung der jeweiligen GSH- und GSSG-Analyseschritte.....	51
Abbildung 19: Layout der 96-well Mikrotiterplatten GSH. Standardreihe 1 - 7. Blank (Blindwert), Control (Kontrolle), Plasmaproben.	53

Abbildung 20: Layout der 96-well Mikrotiterplatten GSSG. Standardreihe 1 - 7. Blank (Blindwert), Control (Kontrolle), Plasmaproben.	53
Abbildung 21: GSH- und GSSG-Standardgeraden zur Berechnung der Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$	54
Abbildung 22: Aufteilung der Probanden in die Interventionsgruppen in %.	57
Abbildung 23:	57
Abbildung 24: Proteinaufnahme in g/kg BW/d in den Gruppen zu den Zeitpunkten T1, T2 und T3 bei den Männern.	58
Abbildung 25: Verlauf der FRAP-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 bei den Männern.	59
Abbildung 26: Korrelation zwischen FRAP [$\mu\text{mol/l}$] und der Muskelmasse [kg] zum Zeitpunkt T1.....	61
Abbildung 27: Korrelation zwischen FRAP [$\mu\text{mol/l}$] und Harnsäure [mg/dl] zum Zeitpunkt T1.	62
Abbildung 28: Verlauf der GSH-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 bei den Männern	65
Abbildung 29: Verlauf der GSSG-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 bei den Männern.	66
Abbildung 30: Verlauf der GSH/GSSG-Ratio in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 bei den Männern.	68
Abbildung 31: Korrelation zwischen GSH/GSSG-Ratio und dem Alter [Jahre] zum Zeitpunkt T1.	69
Abbildung 32: Verlauf der FRAP-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 in Bezug auf beide Geschlechter.	71
Abbildung 33: Verlauf der GSH/GSSG-Ratio in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 in Bezug auf beide Geschlechter.	76

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der reaktiven RONS (nach Löffler, 2008).....	8
Tabelle 2: Einteilung der endogenen antioxidativen Schutzenzyme (S.-H. Kim et al., 2015)	10
Tabelle 3: Einteilung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe mit antioxidativer Wirkung (nach Lotito & Frei, 2006; Fernandez-Panchon et al., 2008).	12
Tabelle 4: Empfehlungen zur Proteinzufuhr von Personen ab 65 Jahren (nach Cruz-Jentoft et al., 2020)	15
Tabelle 5: Auswahl klinischer Studien zur Untersuchung der positiven Aspekte des Krafttrainings im hohen Alter.....	16
Tabelle 6: Empfehlungen eines Krafttrainingsprogramms für gesunde ältere Personen (nach Zahner et al 2014; Fragala et al., 2019).	18
Tabelle 7: Lebensmittel mit erhöhtem Proteingehalt (nach König et al., 2020).....	19
Tabelle 8: Richtlinien der PROT-AGE und ESPEN-Gruppen für eine ausgewogene Proteinzufuhr mit zusätzlichem Training (nach Deutz et al., 2014; Bauer et al., 2013).....	20
Tabelle 9: Empfehlungen zur Erhöhung des antioxidativen Potenzials durch bewusste Ernährung und eine gesunde Lebensweise (nach Robert Koch-Institut, 2008; 10-Regeln-der-DGE, 2017).	23
Tabelle 10: Messprinzipien zur Ermittlung des Redoxstatus (nach Finaud et al., 2006; Huang et al., 2005; Kuchařová et al., 2019).	24
Tabelle 11: Einteilung der Interventionsgruppen.	27
Tabelle 12: Auflistung der ausgewählten proteinreichen Lebensmittel und Rezepte in der PH- und PL-Gruppe.....	29
Tabelle 13: Auflistung der funktionellen Tests.	30
Tabelle 14: Auflistung der Übungen im Krafttrainingsprogramm.	32
Tabelle 15: Auflistung der verwendeten FRAP-Chemikalien.	34
Tabelle 16: Verdünnungsreihe zur Herstellung der Fe ²⁺ -Standardgeraden.	35
Tabelle 17: Verdünnungsreihe zur Herstellung der Troloxreihe.	36
Tabelle 18: Auflistung des verwendeten Labormaterials für die FRAP-Analyse.	36
Tabelle 19: Einstellung des Programms MARS Datenanalyse Software (Version 2.41) am FLUOstar Optima für die FRAP-Analyse.	37
Tabelle 20: Anleitung zur Herstellung aller FRAP-Lösungen.	38
Tabelle 21: FRAP-Pipettierschema für die 96-well Befüllung.....	39
Tabelle 22: Auflistung der verwendeten GSH- und GSSG-Chemikalien.	46

Tabelle 23: Konzentrationsbereich der GSH- und GSSG-Kontrolle in μM	47
Tabelle 24: Auflistung des verwendeten Labormaterials für die GSH- und GSSG-Analyse..	48
Tabelle 25: Einstellung des Programms MARS Datenanalyse Software (Version 2.41) am FLUOstar Optima für die GSH- und GSSG-Analyse.....	48
Tabelle 26: Anleitung zur Herstellung der GSH- und GSSG-Lösungen.....	50
Tabelle 27: GSH-Pipettierschema für die 96-well Befüllung.....	52
Tabelle 28: GSSG-Pipettierschema für die 96-well Befüllung.....	52
Tabelle 29: Anzahl der Frauen und Männer zu Beginn der Studie.....	57
Tabelle 30: Mittelwerte ausgewählter Parameter zum Zeitpunkt T1.....	58
Tabelle 31: Durchschnittliche FRAP-Konzentrationen in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3. Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$	59
Tabelle 32: Innersubjekt- und Zwischensubjekteffekte von FRAP im Studienverlauf.	59
Tabelle 33: FRAP zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 in der PH-Gruppe.....	60
Tabelle 34: Korrelationen zwischen FRAP und anthropometrischen Messungen zum Zeitpunkt T1.....	61
Tabelle 35: Korrelationen zwischen FRAP und der Proteinzufuhr aller Gruppen zum Zeitpunkt T1, T2 und T3.....	62
Tabelle 36: Korrelation zwischen FRAP und Harnsäure zum Zeitpunkt T1.....	62
Tabelle 37: Korrelationen zwischen FRAP und Harnsäure bei allen Gruppen zum Zeitpunkt T1, T2 und T3.	63
Tabelle 38: Korrelationen zwischen FRAP und den funktionellen Parametern bei allen Gruppen zum Zeitpunkt T1.....	63
Tabelle 39: Durchschnittliche GSH-Konzentrationen in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3. Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$	65
Tabelle 40: Innersubjekt- und Zwischensubjekteffekte von GSH im Studienverlauf.	66
Tabelle 41: Durchschnittliche GSSG-Konzentrationen in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2, T3. Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$	66
Tabelle 42: Innersubjekt- und Zwischensubjekteffekte von GSSG im Studienverlauf.....	67
Tabelle 43: Durchschnittliche GSH/GSSG-Ratio in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2, T3. Angabe des Mittelwertes und Standardabweichung.....	68
Tabelle 44: Innersubjekt- und Zwischensubjekteffekte des GSH/GSSG-Ratio im Studienverlauf.....	69
Tabelle 45: Korrelation zwischen GSH/GSSG-Ratio und dem Alter [Jahre] zum Zeitpunkt T1.	69

Tabelle 46: Durchschnittliche FRAP-Konzentrationen in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3. Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$	71
Tabelle 47: Innersubjekt- und Zwischensubjekteffekte von FRAP im Studienverlauf.	72
Tabelle 48: FRAP zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 in der PH-Gruppe.....	72
Tabelle 49: Korrelationen zwischen FRAP und anthropometrischen Markern der Gesamtgruppe zum Zeitpunkt T1.	73
Tabelle 50: Korrelationen zwischen FRAP und den funktionellen Parametern der Gesamtgruppe zum Zeitpunkt T1.	74
Tabelle 51: Korrelationen zwischen FRAP und den funktionellen Parametern innerhalb der PL- und PH-Gesamtgruppen zu den Zeitpunkten T1, T2 und T3.....	74
Tabelle 52: Durchschnittliche GSH/GSSG-Ratio in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3. Angabe des Mittelwertes und Standardabweichung.....	76
Tabelle 53: Innersubjekt- und Zwischensubjekteffekte des GSH/GSSG-Ratio im Studienverlauf.	77
Tabelle 54: Korrelationen zwischen GSH/GSSG-Ratio und dem Alter in der Gesamtgruppe zum Zeitpunkt T1.....	77

III. Abkürzungsverzeichnis

8-OxoG	8-Oxoguanin
Abb.	Abbildung
ANCOVA	Analysis of Covariance
ANOVA	Analysis of Variance
AO	Antioxidant
AP-Stellen	apurinic/aprimidinic site
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata
C. elegans	Caenorhabditis elegans
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESPEN	European Society for Clinical Nutrition and Metabolism
FFM	fettfreie Körpermasse
FOXO	forkhead BOX protein
FRAP	ferric reducing ability of plasma
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HMB	3-Hydroxy-3-methylbuttersäure
IGF-1	insulinähnliche-Wachstumsfaktor
IL	Interleukin
ISS	Insulin- und IGF-1-Signalweg
K	Kontrolle
KAT	Katalase
MDA	Malondialdehyd
MPS	muskuläre Proteinbiosynthese
mTOR	mammalian target of rapamycin
NEM	N-Ethylmaleinimid
NO•	Stickstoffmonoxid
NF-κB	nuclear factor-kappa B

$O_2^{\bullet-}$	Superoxidradikal
$OH^{\bullet}$	Hydroxyradikal
OPA	o-Phthaldialdehyd
P	Phase
PGC-1a	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-Gamma-Coaktivator 1-alpha
PH	Protein High
PL	Protein Low
PROT-AGE	The International Study Group to Review Dietary Protein Needs with Aging
RONS	reactive oxygen and nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
RNS	reactive nitrogen species
SET	single electron transfer
SOD	Superoxiddismutase
T	Termin
Tab.	Tabelle
TAC	total antioxidant capacity
TCA	Trichloressig
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure
Wdh	Wiederholung
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Altern lässt sich als komplexer Prozess eines Individuums innerhalb der Umwelt im Laufe der Zeit definieren. Der Prozess des Alterns steht seit vielen Jahrzehnten im Zentrum der Forschung. Die grundlegende Frage, die sich viele Wissenschaftler*innen auf biochemischer Ebene zu beantworten versuchen, ist, warum Menschen – und lebende Organismen generell – altern und wie sie das tun (Dodig et al., 2019).

Die meisten Theorien lassen sich in drei Kategorien einteilen: die genetische Programmierung des Alterns, die Akkumulation von biologischen Fehlern und Schäden sowie die Kombination aus beiden (da Costa et al., 2016). Die am weitesten verbreitete Alterstheorie ist die Free Radical Theory of Aging, die den Anstieg von freien Sauerstoff- und Stickstoffspezies (Reactive Oxygen and Nitrogen Species, RONS) mit zunehmendem Alter beschreibt. Das kumulative Auftreten von RONS kann bei einem Ungleichgewicht oxidativen Stress auslösen und das antioxidative Potenzial älterer Menschen verringern (Afanas'ev, 2010). Der allmähliche Verlust an Muskelmasse und Muskelkraft, bis hin zur Sarkopenie, ist ein zusätzlicher Aspekt, der die Lebensqualität älterer Personen verschlechtern kann. Da die Weltbevölkerung immer älter wird, ist es besonders wichtig, auf eine gesunde Lebensweise zu achten, deren Kernelemente eine gesunde Ernährungsweise sowie regelmäßige körperliche Bewegung darstellen (Lang et al., 2010).

Die empfohlene Proteinaufnahme bei älteren Personen liegt derzeit laut den D-A-CH-Referenzwerten bei 1,0 g/kg/KG pro Tag (DGE, 2021), variiert jedoch in der Expertenlage zwischen 1,0 bis 1,5 g/kg/KG/d (Cruz-Jentoft et al., 2020). Zusätzlich sollte ein abgestimmtes Trainingsprogramm zwei bis drei Mal die Woche stattfinden, um die Muskeladaption beizubehalten (Fragala et al., 2019). Regelmäßige körperliche Aktivität wird im Allgemeinen mit gesundheitsfördernden Aspekten in Zusammenhang gebracht, wobei sehr intensive körperliche Betätigung eine Überproduktion von prooxidativen Verbindungen und somit oxidativen Stress hervorrufen kann. Regelmäßiges Training wiederum wird mit einer Verstärkung der antioxidativen Schutzsysteme sowie mit einer Toleranzentwicklung gegenüber oxidativem Stress assoziiert. Die Bedeutung freier Radikale in Zusammenhang mit körperlicher Belastung sowie die Bestimmung antioxidativer Schutzsysteme ist aufgrund kontroverser Ergebnisse von großem Interesse (S. K. Powers et al., 2016).

Diese Masterarbeit liefert Teilergebnisse der NutriAging-Studie und befasst sich mit dem Einfluss einer erhöhten Proteinzufuhr – allein und in Kombination mit einem achtwöchigen progressiven Krafttraining – auf das antioxidative Potenzial bei älteren Menschen im Alter von 65 bis 85 Jahren.

Mit Hilfe des Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) -Tests wurde in der vorliegenden Arbeit die antioxidative Gesamtkapazität beurteilt. Zusätzlich wurde das antioxidative Potenzial der beiden Thiole, Glutathion (GSH) und Glutathiondisulfid (GSSG), anhand des fluorometrischen GSH/GSSG-Assays analysiert. Beide photometrischen Messungen wurden mit dem Mikroplattenlesegerät FLOUstar Optima durchgeführt, um die antioxidative Kapazität im Blutplasma älterer Menschen zu beurteilen.

Die analytische Laborarbeit wurde im Team mit Muriel Harloff absolviert. Aufgrund dessen erfolgte die Auswertung geschlechterspezifisch. Die Ergebnisse dieser Masterarbeit beziehen sich auf die männlichen Probanden der Studie. Ein vollständiger Vergleich der Werte beider Geschlechter ließ sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht durchführen, da die Auswertung der weiblichen Probandinnen noch nicht ausreichend erfolgt ist. Das Verhältnis der Werte zwischen den männlichen Teilnehmern der Studie sowie der gesamten Studienpopulation bildet jedoch die abschließende Betrachtung dieser Arbeit.

2 Literatur

2.1 Alterungsprozesse

Die komplexen Alterungsprozesse und deren biologische Regulierungsmechanismen sind bis dato nicht ganz erklärt. Man ist sich jedoch einig, dass es sich nicht nur um einen Mechanismus handelt, sondern dass mehrere biochemische Prozesse auf vielen Ebenen miteinander interagieren. Das natürliche Altern der Zelle, die Seneszenz und somit die fortschreitende Verschlechterung der Körperfunktion geht mit einem erhöhten Risiko für Krankheiten wie Krebs, Diabetes, kardiovaskuläre und neurodegenerative Erkrankungen sowie Gebrechlichkeit einher und führt schließlich zum Tode.

Nach López-Otín et al. werden die Kennzeichen des Alterns in neun Kategorien unterteilt:



Abbildung 1: Neun Kennzeichen des Alterungsprozesses (nach López-Otín et al.)

Genomische Instabilität Die Fehlprogrammierung von DNA-Sequenzen während der Genexpression ist ein natürlicher Vorgang während der gesamten Lebensdauer eines Organismus (Moskalev et al., 2013). Sie können durch exogene oder endogene Einwirkmechanismen induziert werden. Endogene Mechanismen sind zum einen nicht korrigierte DNA-Replikationsfehler, spontane Hydrolyse- und Alkylierungsprozesse sowie

die Bildung und Akkumulation von freien Radikalen, die während des Metabolismus anfallen. Zu den exogenen Einflüssen zählen physikalische, chemische und biologische Einflüsse, wie z. B. UV-Strahlen, radioaktive Strahlen oder zahlreiche Chemikalien (Hoeijmakers, 2009). Die daraus resultierenden DNA-Läsionen sind sehr unterschiedlich und umfassen Punktmutationen, Chromosomentranslokationen, einzel- oder doppelsträngige Brüche sowie Telomerverkürzungen und können sogar bis zum vollständigen Verlust der Genfunktion führen. Umso älter ein Organismus ist, desto stärker sind diese Schäden in der nuklearen oder mitochondrialen DNA ausgeprägt, sodass deren Akkumulation und unzureichende Reparaturmechanismen den Alterungsprozess begünstigen (López-Otín et al., 2013). Häufige DNA-Läsionen, die im Alter erhöht nachgewiesen werden, sind zum einen die AP-Stellen (apurinic/apyrimidinic site), die durch fehlende Nukleotide entstehen (Atamna et al., 2000) oder das oxidierte 8-Oxoguanin (8-OxoG), welches ein hohes Mutationspotenzial aufweist (Lu et al., 2004).

Verkürzung der Telomere Telomere sind repetitive DNA-Wiederholungssequenzen am Ende linearer eukaryotischer Chromosomen. Da die DNA-Polymerasen die schützenden Endbausteine nicht vollständig replizieren können, verkürzen sich die Telomere mit jeder Zellproliferation. Dieser Vorgang führt zur zellulären Seneszenz und somit zu einer Dysfunktion oder Degeneration eines Gewebe- oder Organsystems. Im Vordergrund steht hier die mitochondriale Dysfunktion, da sie viele metabolische Stoffwechselwege wie die Atmungskette, die energiebringender Glukoneogenese oder die β -Oxidation betrifft (Zhu et al., 2019). Die telomere Erschöpfung wurde schon 1961 als Hayflick-Grenze beschrieben und ist ein häufig diskutierter Mechanismus der Zellalterung (Hayflick & Moorhead, 1961).

Epigenetische Veränderungen Während des gesamten Lebens durchlaufen alle Zellen eine Vielzahl von epigenetischen Veränderungen, die an altersassoziierten Merkmalen beteiligt sein können. Dazu gehören veränderte DNA-Methylierungsmuster und posttranslationale Modifikationen von Histon- und Chromatinstrukturen. Eine erhöhte sowie verminderte enzymatische Methylierung oder Acetylierung der DNA, die die Aufrechterhaltung epigenetischer Muster sicherstellt, kann zu Störungen bei der Transkription und Translation führen. Weitere Dysfunktionen sind der Ausfall von DNA-Reparaturmechanismen oder die Instabilität chromosomaler Strukturen (Sen et al., 2016).

Verlust der Proteostase Für die Aufrechterhaltung der Proteostase sind verschiedene Mechanismen während der Proteinbiosynthese und der darauffolgenden Proteinfaltung verantwortlich. Endogener und exogener Stress kann jedoch diese Proteinfaltung beeinträchtigen. Normalerweise werden die fehlgefalteten Proteine durch lysosomale

Autophagie abgebaut oder durch Hitzeschockproteine wieder in ihre gewöhnliche Struktur gebracht (López-Otín et al., 2013). Durch Funktionsverluste kann es jedoch zur Akkumulation (Proteinaggregation) oder zum beeinträchtigten Abbau kommen, welche beide eine toxische Wirkung mit sich bringen. Daher wird eine beeinträchtigte Protein-Homöostase mit einigen Krankheiten in Zusammenhang gebracht. Zu den häufigsten zählt die Stoffwechselerkrankung Mukoviszidose oder altersbedingte Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Chorea Huntington (E. T. Powers et al., 2009).

Deregulierte Nährstoffwahrnehmung Ein wichtiger Mediator für die Steigerung des Zellwachstums ist der insulinähnliche-Wachstumsfaktor (IGF-1), der hauptsächlich von den Hepatozyten synthetisiert wird. Insulin und IGF-1 besitzen den gleichen Reaktionsmechanismus der Signalübertragung, den Insulin- und IGF-1-Signalweg (ISS). Der nahrungsabhängige ISS wird mit verschiedensten Alterungsmechanismen in Verbindung gebracht, welche durch mammalian target of rapamycin (mTOR), AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK), Sirtuine und dem Transkriptionsfaktor forkhead BOX protein (FOXO) beeinflusst werden.

Viele Studien weisen darauf hin, dass eine verminderte Nährstoffaufnahme und somit eine Verringerung an anabolen Stoffwechselwegen, die normalerweise durch mTOR hervorgerufen werden und somit gehemmt werden, Mechanismen zur Krankheitsentstehung entgegenwirken können. Zusätzlich wurde eine Verlängerung der Lebensdauer bei verschiedensten Tierorganismen festgestellt (Fontana et al., 2010).

Beim Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) können injizierte Mutationen, die die ISS Signalübertragung verringern, die Lebensdauer verdoppeln und dazu führen, dass der Fadenwurm länger jung und aktiv bleibt (Kenyon, 2010).

Insbesondere beeinflusst FOXO einige Zell- und Gewebefunktionen. Einer der wichtigsten Mechanismen der FOXO-Proteine ist es, Zellen mit antioxidativem Potenzial zu erhöhen, wodurch die Anhäufung von RONS vermindert werden kann (Martins et al., 2016).

Mitochondriale Dysfunktion Je älter ein Organismus ist, desto mehr nimmt die Fähigkeit der Atmungskette in den Mitochondrien ab. Die vermehrte Dysfunktion führt zu einem erhöhten Elektronenverlust und zu einer Verringerung der Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion. Mitochondriale RONS akkumulieren und es kommt vermehrt zu oxidativen und inflammatorischen Zellschäden, die sich in Mutationen des Genoms auswirken können (Green et al., 2011).

Zelluläre Seneszenz Die Zellalterung ist ein vorprogrammierter Mechanismus aller lebenden Organismen und bringt geno- sowie phänotypische Veränderungen mit sich. Wie bereits

erwähnt, hat Hayflick einen der wichtigsten Alterungsmechanismen der Zelle, die Telomerverkürzung, beschrieben (Hayflick & Moorhead, 1961). Es gibt jedoch mehrere Mechanismen, die die Seneszenz auslösen, da die Regenerationskapazitäten aller Zellen mit zunehmendem Alter geringer werden. Ein Beispiel dafür ist das Immunsystem. So produzieren ältere Menschen weniger Antikörper, während sich zusätzlich die immunologischen Abwehrzellen verändern (Shaw et al., 2010).

Stammzellen Erschöpfung Die Regenerationsfähigkeit eines Organismus hängt vom Potenzial seiner Stammzellen ab, sodass beschädigte Zell- und Organsysteme neu synthetisiert werden können. Diese nimmt jedoch im Alter ab und die Anfälligkeit gegenüber Krankheiten wie z. B. inflammatorischen Erkrankungen oder Krebs steigt stark an. Am häufigsten sind die blutbildenden Stammzellen der Hämatopoese, Stammzellen des Mesenchyms, intestinale Epithelstammzellen, Satellitenzellen des Skelettmuskels, Hautstammzellen und neuronale Stammzellen betroffen (Schultz & Sinclair, 2016).

Veränderte interzelluläre Kommunikation Die Kommunikation, die durch endokrine, neuroendokrine und neuronale Signalweiterleitung auf Zellebene abläuft, wird im Alter durch zunehmende Entzündungsreaktionen, neuroendokrine Dysfunktion und eine geschwächte Immunantwort verändert (López-Otín et al., 2013). Konträr dazu werden wichtige hormonelle Systeme wie die Steroid-Ausschüttung (Cholesterol, Östrogen) oder der ISS (FOXO, Klotho) in vielen Studien an Mäusen und *C. elegans* als Anti-Aging-Hormone in Betracht gezogen. Das berühmte Klotho-Protein ist sogar in der Lage, das Leben von Mäusen um 20 bis 30 % zu verlängern (Russell & Kahn, 2007).

2.2 Theorien des Alterns

Wie Medvedev schon 1990 feststellte, gibt es mehr als 300 Theorien, die den Alterungsprozess des Menschen auf verschiedenen molekularen Ebenen zu erklären versuchen. Die meisten Theorien lassen sich in drei Kategorien einteilen: die genetische Programmierung des Alterns, die Akkumulation von biologischen Fehlern und Schäden sowie eine Kombination der ersten beiden. Diese kombinierte Variante übernimmt dabei auch bestimmte Mechanismen der Alterungshypothesen (da Costa et al., 2016). Die programmierten Theorien implizieren, dass das Altern seinem eigenen biologischen Zeitplan folgt, das heißt, dass alle lebenden Organismen eine innere Uhr besitzen, welche die Alterungsprozesse reguliert. Diese Mechanismen hängen von der Genexpression ab, denn in einem höheren Alter werden bestimmte Gene an- oder ausgeschaltet, die z. B. für

Reparaturvorgänge oder Abwehrreaktionen verantwortlich sind. Zu den programmierten Mechanismen zählen zusätzlich hormonell und immunologisch bedingte Theorien, da sich auch diese Vorgänge mit zunehmendem Alter verändern. Als Beispiel hierfür fungieren, wie bereits erwähnt, der hormonell- und nahrungsabhängige ISS-Signalweg, oder dass die Antikörper an Effektivität verlieren und sich somit Krankheitserreger schneller und einfacher im Körper ausbreiten können.

Die Fehler- und Schadenstheorien des Alterns beinhalten unter anderem die Wear and Tear Theory, laut der sich die Zellen nach wiederholter Replikation abnutzen und es zu Fehlern während der Proteinbiosynthese kommen kann. Ebenso zu nennen ist die Cross-linking Theory, die die Schädigung von akkumulierenden degenerierten Proteinen an Zellen und Gewebe und die damit einhergehende Verlangsamung biologischer Prozesse im Organismus beschreibt. Eine weitere dieser Kategorie zuzuordnende Theorie ist die Somatic DNA Damage Theory, welche die Akkumulation von nicht reparierten DNA-Molekülen darlegt. Für diese Masterarbeit jedoch am relevantesten ist die Free Radical Theory of Aging (Jin, 2010). Die von Harman (1956) etablierte Theorie des Alterns, nach der das Altern durch RONS hervorgerufen wird, gilt seit mehr als 50 Jahren und wurde durch zahlreiche experimentelle Studien, die den Anstieg der Radikalwerte mit zunehmendem Alter beschreiben, nachgewiesen. Im Wesentlichen geht die Theorie davon aus, dass die RONS oder ähnliche Oxidationsmittel aus der Umwelt und aus dem endogenen Metabolismus Biomoleküle wie Lipide, Proteine und die Nukleinsäure schädigen. Mit zunehmender Lebenszeit führt diese Akkumulation zur Seneszenz der Zellen und fortschreitend zu strukturellen und funktionellen Schäden des Organismus (Pomatto & Davies, 2018).

2.3 Freie Radikale und oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) und reaktive Stickstoffspezies (reactive nitrogen species, RNS) sind Atome oder Molekülfragmente, die außerordentlich reaktiv sind, da sie ein ungepaartes Elektron in ihrer äußersten Atomhülle aufweisen. Sie sind in aeroben Organismen unerlässlich und haben wichtige physiologische Funktionen, sind aber auch durch ihre hochreaktive Eigenschaft ein schädlicher Auslöser für oxidativen Stress (Brieger et al., 2012).

Tabelle 1: Einteilung der reaktiven RONS (nach Löffler, 2008).

RONS		Mechanismus	Entstehung
Superoxidradikal	$O_2^{\bullet-}$	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet-}$	Reduktion von O_2 (Atmungskette)
Wasserstoffperoxid	H_2O_2	$2 O_2^{\bullet-} + 2 H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$	Superoxiddismutase
Hydroxyradikal	$OH^{\bullet}$	$H_2O_2 + e^- \rightarrow OH^- + OH^{\bullet}$	Fenton-/Haber-Weiss-Reaktion
Stickstoffmonoxid	$NO^{\bullet}$	$Arginin + O_2 + NADPH \rightarrow$ $Citrullin + NO^{\bullet} + NADP^+$	Stickstoffmonoxid-Synthase
Peroxinitrit	$ONOO^-$	$O_2^{\bullet-} + NO^{\bullet} \rightarrow ONOO^-$	Rekombination von Stickstoffmonoxid- und Superoxid-Radikalen

Endogene Quellen Mehrere physiologische Mechanismen führen zur RONS-Bildung im Körper. Die mitochondriale Atmungskette, die für die Energiegewinnung unerlässlich ist, ist der wichtigste biochemische Prozess bei der Entstehung von prooxidativen Verbindungen. Durch die oxidative Phosphorylierung von Sauerstoff wird Wasser reduziert. Während dieses Vorgangs entstehen in den Mitochondrien unvollständig reduzierte Moleküle, zu denen die Superoxidradikale ($O_2^{\bullet-}$) und daraus folgend Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxyradikale ($OH^{\bullet}$) gehören. Eine weitere Quelle sind zahlreiche Oxidoreduktasen, zu denen die Enzyme Xanthinoxidase, Dehydrogenasen, NADPH-Oxidase und ähnliche gehören. Diese produzieren ROS und RNS, um Redoxreaktionen zu katalysieren (Afanas'ev, 2010). Ein Beispiel dafür wäre die Entgiftung von Xenobiotika während der Biotransformation, die durch Cytochrom P-450-Oxidasen metabolisiert wird (He et al., 2017). Oder beim respiratorischen Burst der Immunabwehr, bei dem eine große Menge an $O_2^{\bullet-}$ von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen während der Phagozytose freigesetzt wird, um gegen eingedrungene Krankheitserreger anzukämpfen (Yang et al., 2013).

Exogene Quellen Neben der endogenen Produktion gibt es noch zahlreiche exogene Quellen, die die Synthese von Radikalen im Organismus hervorrufen. Dabei handelt es sich um Noxen aus der Umwelt wie UV-Strahlen, Wasser- und Luftverschmutzung, Industriemetalle, Medikamente wie Paracetamol, Tabak und Alkohol sowie Stoffwechselprodukte beim Kochen (geräuchertes Fleisch, Altspeiseöl etc.) (Phaniendra et al., 2015).

RONs sind dazu fähig, nahezu alle Verbindungen im menschlichen Organismus anzugreifen und zu schädigen. Die drei am stärksten betroffenen Biomoleküle sind die Nukleinsäure, Proteine und Lipide. Bei der oxidativen Schädigung von Lipiden, besonders bei mehrfach-ungesättigten Fettsäuren, kommt es zu einer Lipidperoxidation. Hierbei wird die äußere Schicht der Zelle angegriffen, was zum Funktionsverlust der Zellmembran führen kann. Daraus resultiert eine verringerte Fluidität sowie die Inaktivierung von Membranrezeptoren. Dieser Mechanismus bringt weitere oxidative Läsionen mit sich, welche sich überwiegend in Proteinen und Nukleinsäuren manifestieren. In der nuklearen und mitochondrialen DNA kommt es zu Strangbrüchen und zu Modifikationen von Basen. Das 8-oxoG ist hierbei einer der wichtigsten Biomarker, der durch RONS im Zellkern induziert wird (Valavanidis et al., 2009). Bei der Proteinoxidation kommt es zu strukturellen Veränderungen, die unter anderem durch die Bindung der Radikale an die Thiolgruppen bestimmter Aminosäuren hervorgerufen werden. Am anfälligsten sind die Aminosäuren Methionin und Cystein, die eine Proteindenaturierung und den Funktionsverlust von Enzymen, Rezeptor- und Transportproteinen bewirken (Reeg & Grune, 2015). Ein gesunder Organismus ist in der Lage, nahezu alle oxidierenden Produkte durch antioxidative Mechanismen zu neutralisieren. Sobald es jedoch zu einem Ungleichgewicht zwischen den anti- und oxidativen Prozessen (siehe Abb. 2) kommt und die oxidativen Schäden an den Biomolekülen überwiegen, spricht man von oxidativem Stress (Robert Koch-Institut, 2008).

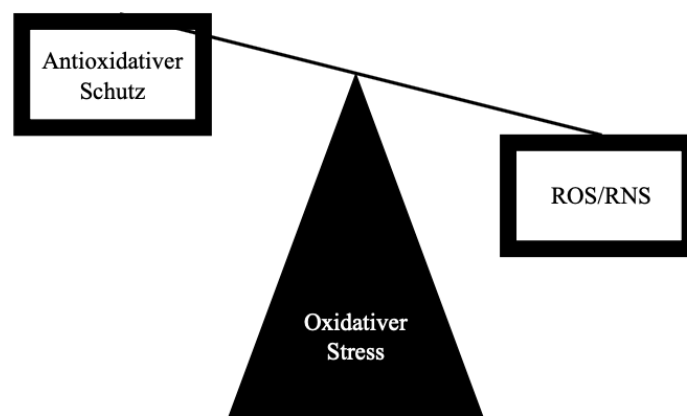


Abbildung 2: Ungleichgewicht zwischen antioxidativem Schutz und RONS führt zu oxidativem Stress.

Aufgrund dessen wird der fortschreitende Verlust von Gewebe- und Organfunktionen, der durch die Akkumulation von oxidativem Stress induziert wird, mit dem Verlauf des Alterns und mit altersbedingten Krankheiten assoziiert. Zu den pathologischen Alterserscheinungen

zählen die Sarkopenie und Krankheitsbilder wie kardiovaskuläre Erkrankungen, entzündliche Lungenerkrankungen, neurodegenerative Erkrankungen sowie diverse Karzinome (Liguori et al., 2018).

2.4 Antioxidantien

Ein Antioxidant (AO) oder ein Antioxydationsmittel ist eine Substanz von endogener oder exogener Natur, die eine Reaktion von oxidativ wirkenden Molekülen (Prooxydantien) verlangsamen oder sogar komplett verhindern kann. Die Funktion eines AO bedeutet demnach eine Verringerung von oxidativem Stress und den Folgeschäden. Je stärker das antioxidative Potenzial eines Radikalfängers ist, desto effizienter kann gegen die Schäden an Biomolekülen angekämpft werden.

Prinzipiell gibt es zwei Verteidigungsmechanismen, die Zellen entwickelt haben, um die Wirkung von Prooxydantien abzuschwächen oder komplett zu hemmen. Auf der einen Seite gibt es diverse Enzyme, die einen antioxidativen Mechanismus katalysieren, und auf der anderen Seite neutralisieren nicht-enzymatische Verbindungen entstehende RONS.

Enzymatische und nicht-enzymatische AO wirken synergetisch (Poljsak et al., 2013).

Enzymatische AO Zu den wichtigsten antioxidativen Schutzmechanismen im menschlichen Organismus gehören drei Enzyme, die der Gruppe der Katalasen und Peroxidasen zugeteilt werden. Wie in Tabelle 2 aufgelistet sind die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase (KAT) und die Glutathionperoxidase (GPx) auf Metallionen, die als Kofaktoren dienen, angewiesen. Die SOD wird nach ihrer Lokalisierung in drei Gruppen unterteilt. Zu diesen Gruppierungen gehören die zytoplasmatische SOD1, die mitochondriale SOD2 und die extrazelluläre SOD3 (S.-H. Kim et al., 2015).

Tabelle 2: Einteilung der endogenen antioxidativen Schutzenzyme (S.-H. Kim et al., 2015)

Enzym	Gruppen	Wirkmechanismus	Kofaktoren
Superoxiddismutase (SOD)	SOD1	$2 \text{O}_2^{\bullet -} + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	Kupfer, Zink Mangan, Eisen
	SOD2		
	SOD3		
Katalase (KAT)	KAT	$2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$	Eisen
Glutathionperoxidase (GPx)	GPx	$2 \text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GSSG} + 2 \text{H}_2\text{O}$	Selen

Nicht-enzymatische AO Zusätzlich spielen endogene Stoffwechselverbindungen sowie mit der Nahrung zugeführte Inhaltsstoffe eine wichtige Rolle, wenn es um antioxidative Abwehrmechanismen geht.

Zu den endogenen nicht-enzymatischen AO zählen unter anderem die Thiole. So sind beispielsweise GSH und die Aminosäure Cystein durch ihre SH-Gruppen unerlässliche Antioxidationspuffer (Sung et al., 2013). GSH und seine oxidierte Form GSSG fangen RONS auf direkte Weise oder durch eine Enzymkatalyse ab. Beispielsweise kann GSH als Substrat für die GPx fungieren, wodurch H_2O_2 reduziert wird. $\text{O}_2^{\bullet-}$ und $\text{OH}^{\bullet}$ können sogar direkt durch GSH gequenchet werden. Als starkes Reduktionsmittel besitzt GSH im Wechselspiel mit GSSG zudem die Fähigkeit, Tocopherol- und Ascorbatradikale zu reduzieren. Durch diesen Prozess kann die Zelle vor der Lipidperoxidation geschützt werden (Gaucher et al., 2018). Einen weiteren wichtigen antioxidativen Effekt bewirken die beiden Stoffwechselendprodukte Harnsäure und Bilirubin. Ersteres fängt vor allem $\text{O}_2^{\bullet-}$ ab und schützt dadurch ebenfalls vor oxidativer Degradation von Lipiden (Sung et al., 2013), während Letzteres die mutagene Wirkung von ROS und RNS senken kann (Bulmer et al., 2008).

Die aus der Nahrung zugeführten Inhaltsstoffe, die reich an AO sind, finden sich vor allem in Obst und Gemüse wieder. Vitamine, phenolische Verbindungen und bestimmte Carotinoide besitzen ein hohes antioxidatives Potential und bringen viele gesundheitliche Vorteile mit sich. Ascorbinsäure und Tocopherole sind die wohl bekanntesten antioxidativen Vitamine, die im Synergismus gegen zahlreiche RONS ankämpfen können.

Tocopherole werden beim Quenchen der Lipidperoxidation selbst zum Radikal und können durch die Reduktion von Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure wieder in ihre ursprüngliche Struktur metabolisiert werden (Padayatty et al., 2003).

Des Weiteren ist in den letzten Jahren das Interesse an AO in pflanzlichen Lebensmitteln um ein Vielfaches gestiegen, da sie mit zahlreichen gesundheitlichen Aspekten in Zusammenhang gebracht werden. Es sind vor allem die phenolischen Pflanzeninhaltsstoffe, die eine hohe

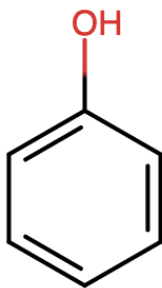


Abbildung 3: Phenolische Grundstruktur.

antioxidative Kapazität aufweisen, da sie die durch ihre aromatischen Strukturen ungepaarte und somit reaktive Elektronen neutralisieren können (siehe Abb. 3). Das daraus resultierende verringerte Risiko für koronare Herzkrankheit, neurodegenerative Erkrankungen, Krebs und Osteoporose wird zu einem großen Teil der erhöhten Zufuhr von Obst und Gemüse sowie den darin enthaltenen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen zugeschrieben (Fernandez-Panchon et al., 2008).

Tabelle 3: Einteilung sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe mit antioxidativer Wirkung (nach Lotito & Frei, 2006; Fernandez-Panchon et al., 2008).

Polyphenol	Untergruppe	Vorkommen
Resveratrol	Stilbene	Weintrauben, Rotwein
Gallussäure, Kaffee- säure	Benzoe- und Zimtsäure	Kaffee, Kartoffeln, Grüntee
Quercetin, Kaempferol, Myricetin	Flavonole	Äpfel, Pfirsiche, Sellerie, Kapern, Zwiebeln
Catechine, Epicatechine, Epigallocatechine	Flavanole	Grüntee, Schwarztee, Brombeeren
Naringenin	Flavanone	Zitrone, Orange, Grapefruit
Genistein, Daidzein	Isoflavone	Sojaprodukte

Zu guter Letzt gibt es noch die Carotinoide, die durch ihre hohe Anzahl an konjugierten Doppelbindungen eine antioxidative Wirkung aufweisen. Viele Studien haben gezeigt, dass besonders das beta-Carotin ein hohes antioxidatives Potential aufweist und besonders in Kombination mit Vitamin C und E die Lipidperoxidation deutlich hemmen kann (Milani et al., 2017).

Antioxidative Peptide aus proteinreicher Nahrung Folgender Absatz bildet einen zentralen Aspekt der thematischen Orientierung dieser Arbeit, da bestimmte Peptide aus einer reichhaltigen Proteinaufnahme antioxidative Kapazitäten besitzen. Aufgrund ihrer biochemischen Auswirkungen werden sie in zwei Gruppen unterteilt. Zum einen sind es Hydrolysate von Vorläuferproteinen und zum anderen bioaktive Peptide. Der antioxidative Mechanismus liegt den funktionellen Gruppen, den aromatischen Strukturen (Tryptophan, Phenylalanin, Tyrosin) oder dem Imidazolring (Histidin) der Aminosäuren zugrunde. Die positiven Auswirkungen sind die Hemmung der Lipidperoxidation, das Abfangen von Radikalen, die Bindung von Chelatkomplexen und die Induktion von schützenden Genen gegen RONS.

Nahrungsquellen für antioxidative Peptide sind beispielsweise Sojabohnen, die eine hohe Anzahl an Säureproteasen aufweisen, Haselnüsse, in denen man die Alkalse wiederfindet, sowie Reiskleie, die viel Pepsin und Trypsin enthält (Nwachukwu & Aluko, 2019).

2.5 Physiologische Veränderungen im Alter

Mit zunehmendem Alter verändert sich die Körperzusammensetzung eines Menschen. Durch die Atrophie der Skelettmuskulatur und der Knochensubstanz sowie die Abnahme des Gesamtwassergehalts haben ältere Personen eine niedrigere fettfreie Körpermasse (FFM). Bei der Abnahme der FFM findet eine Umverteilung von peripherem zu viszeralem Körperfett statt.

Ab dem 30. Lebensjahr nimmt die Muskelmasse jährlich 1 bis 2 % ab. Ein 75 Jahre alter Mensch kann somit bis zu 40 % seiner ursprünglichen Muskelmasse verlieren (Pleyer & Raidl, 2017). Obwohl der Gehalt des Körperfettes ansteigt, bleibt das Gesamtkörpergewicht gleich. Diese physiologischen Veränderungen sind sehr individuell und von vielen Einflussfaktoren abhängig, die unterschiedliche gesundheitliche Konsequenzen mit sich bringen. Sehr häufig kommt es zu einer Verschlechterung des Bewegungsapparates, einer Einschränkung der Leistungsfähigkeit sowie zu einer allgemeinen Verschlechterung des Gesundheitszustandes mit sinkender Lebenserwartung (Volkert, 2004).

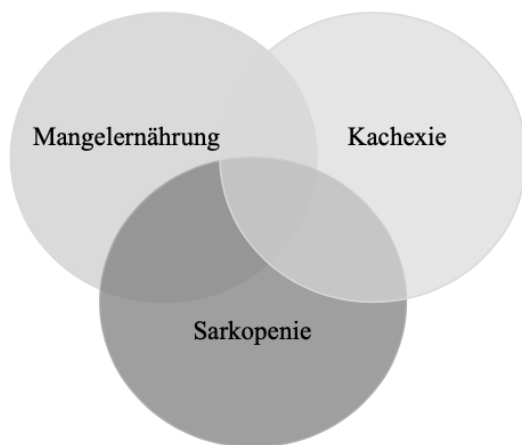


Abbildung 4: Interaktion der Mangelernährung, Kachexie und Sarkopenie durch physiologische Veränderungen im Alter.

Mangelernährung, Kachexie und Sarkopenie spielen bei diesen altersbedingten Veränderungen eine wesentliche Rolle (Bauer et al., 2008). Die durch ein hohes Alter hervorgerufene Mangelernährung erfolgt durch eine unzureichende Nahrungsaufnahme von Makro- und Mikronährstoffen, wodurch der Abbau der Fettmasse induziert wird. Gründe dafür sind der Nachlass von Appetit und Durst, eine Verschlechterung des Kau- und Schluckapparates sowie

Veränderungen der gastrointestinalen Verdauungsmechanismen, die mit steigendem Alter auftreten. Diese Veränderungen können dazu führen, dass ältere Personen in einem schweren Krankheitsverlauf eine lebensbedrohliche Anorexie entwickeln können (Pleyer & Raidl, 2017).

Die Kachexie geht mit einem übermäßigen Abbau der Skelettmuskelmasse und akuten oder chronischen Entzündungsprozessen einher, die häufig Folgen von Tumorerkrankungen, Herz-Kreislauf-erkrankungen, Niereninsuffizienz oder Rheuma sind.

Durch die Entstehung zahlreicher pro-inflammatorischer Zytokine, wie Interleukin 1 (IL-1), IL-6 und TNF-alpha, wird die Nahrungs- und Nährstoffaufnahme zusätzlich unterdrückt (Thomas, 2002).

Auch die Sarkopenie, die einen übermäßigen Verlust an Muskelmasse und Muskelkraft bedeutet, manifestiert sich mit zunehmendem Alter stärker. Die Anzahl und die Größe der Muskelzellen reduziert sich zunehmend und man findet zwischen ihnen immer mehr Bindegewebs- und Fetteinlagerungen. Das Krankheitsbild der Sarkopenie ist mit erhöhter Gebrechlichkeit, Kraftverlust, verminderter körperlicher Funktion und geringerer Belastbarkeit assoziiert (Agarwal et al., 2013). Die Gründe hierfür sind multidisziplinär und resultieren aus mehreren molekularen Prozessen. Besonders auffällig ist der altersbedingte Rückgang der Motoneuronen, die für die aktiven Kontraktionen der Skelettmuskeln verantwortlich sind. Zusätzlich kommt es zu Modifikationen der hormonellen und immunologischen Signalweiterleitung, die zu einer Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese führen kann. Die Akkumulation von RONS, die mit einer mitochondrialen Dysfunktion einhergeht, kann zusätzlich die Atemmuskulatur beeinträchtigen (Lang et al., 2010). Ein weiterer Faktor wäre die ansteigende Synthese des Wachstumsfaktors Myostatin, die im höheren Alter auftritt. Myostatin ist dafür bekannt, den Muskelaufbau zu hemmen, um einer Muskelhypertrophie entgegenzuwirken (White & LeBrasseur, 2014). Es wurden in den letzten Jahren einige Studien an älteren Mäusen durchgeführt, bei denen die Inhibierung des Myostatin-Gens zu einer signifikanten Erhöhung der Muskelmasse und -kraft führte (LeBrasseur et al., 2009).

Für diese altersbedingten Syndrome sollte die Therapie und Prävention so früh wie möglich beginnen. Eine Kombination aus Krafttraining und gleichzeitiger bedarfsdeckender Energie- und Nährstoffzufuhr sollte eine tägliche Routine der älteren Bevölkerungsgruppe sein (Lang et al., 2010).

2.6 Proteinaufnahme im Alter

Besonders bei älteren Personen spielt die Nahrungsaufnahme eine wichtige Rolle, da die veränderte Körperzusammensetzung, altersassoziierte Erkrankungen und häufig eintretende Multimedikationen spezielle Ernährungsbedürfnisse aufweisen. Da die Lebenserwartung immer weiter ansteigt, ist es sehr wichtig, optimale Ernährungsempfehlungen zu berücksichtigen (Baum et al., 2016). Neben einer erhöhten Einnahme von Calcium in Kombination mit Vitamin D (Knochenmineralisation) und den essenziellen B Vitaminen,

Vitamin B₁₂, Vitamin B₆ und Folsäure (Homocysteinestoffwechsel) sollte der Proteinaufnahme besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. Proteine sind die wichtigsten Makromoleküle, wenn es um den Aufbau und um den strukturellen Stoffwechsel der FFM geht. Darüber hinaus beeinflussen sie unter anderem die Hormonhomöostase, immunologische Prozesse und Gerinnungsprozesse im menschlichen Organismus (Clegg & Williams, 2018). Die empfohlene Proteinzufuhr bei älteren Personen ist sehr umstritten. Die aktuellen Expertenempfehlungen liegen derzeit zwischen 1,0 bis 1,5 g/kg/KG am Tag (J. E. Kim et al., 2016). Die DGE gibt einen Schätzwert für eine angemessene Zufuhr von 1,0 g/kg/KG/d Protein für Menschen ab 65 Jahren an, um dem raschen Abbau der FFM entgegenzuwirken (DGE, 2021). Zusätzlich gibt es noch Empfehlungen von der PROT-AGE- (The International Study Group to Review Dietary Protein Needs with Aging) und ESPEN (European Society for Clinical Nutrition and Metabolism)-Gruppen, die in Tabelle 4 angeführt sind.

Tabelle 4: Empfehlungen zur Proteinzufuhr von Personen ab 65 Jahren (nach Cruz-Jentoft et al., 2020)

<u>Gesundheitszustand</u>	<u>Proteinzufuhr pro Tag</u>
gesund	1,0 – 1,2 g/kg/KG
akute oder chronische Krankheit	1,2 – 1,5 g/kg/KG bis zu 2 g/kg/KG bei Mangelernährung
<u>chronische Niereninsuffizienz</u>	<u>0,6 – 0,8 g/kg/KG</u>

Aus diesem Grund sollte sich die Lebensmittelauswahl bei älteren Personen auf protein- und nährstoffreiche Produkte konzentrieren. Milch und Milchprodukte, Fleisch, Eier, Hülsenfrüchte, Kartoffeln und Getreideprodukte sollten zu jeder Hauptmahlzeit konsumiert werden, um Defiziten entgegenzuwirken. Allerdings spielt neben der Proteinmenge und der Proteinqualität auch der Aufnahmezeitpunkt eine wesentliche Rolle. Die Aufnahme der täglichen Eiweißmenge soll gleichermaßen auf alle drei Mahlzeiten aufgeteilt werden. Dadurch wird die Proteinsynthese und zeitgleich der Muskelaufbau mehrmals am Tag stimuliert.

Zusätzlich können durch regelmäßiges Krafttraining und adäquate Proteinzufuhr die altersbedingten Einschränkungen minimiert werden. Hierbei erweist es sich als sinnvoll, die Proteinquelle unmittelbar nach der körperlichen Aktivität zuzuführen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Menge von 1 g/kg/KG Protein pro Tag für die Bevölkerungsgruppe ab 65 Jahren angestrebt werden sollte. Außerdem sollte nicht außer Acht

gelassen werden, dass die Energiezufuhr individuell angepasst wird. Obst und Gemüse sollten mehrmals täglich, Fisch mehrmals pro Woche konsumiert werden. Die Zubereitungsform beim Kochen sollte allgemein schonend sein und ein besonderes Augenmerk auf genügend Flüssigkeitszufuhr ist unerlässlich (Biesalski et al., 2018).

2.7 Krafttraining im Alter

Die gesundheitlichen Aspekte des Krafttrainings im hohen Alter stellen ein immer größer werdendes Interessensgebiet der Forschung dar. Zusätzlich bieten immer mehr Gesundheits- und Fitnesszentren ein spezielles Trainingsangebot für die ältere Bevölkerungsgruppe an. Wie bereits erwähnt, ist das Krafttraining im Alter ein wichtiges Instrument für den Erhalt an Muskelmasse und bildet ein zentrales Element für die allgemeine körperliche und geistige Gesundheit. Um die Mobilitätseinschränkung und die Sturzgefahr zu minimieren, ist ein wöchentliches Krafttraining unentbehrlich (Zahner et al., 2014). In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an randomisierten Studien mit verschiedensten Methoden durchgeführt, die die positive Wirkung des Krafttrainings im hohen Alter untersuchten. Tabelle 5 gibt einen Überblick über Aufbau und Kernaspekte der jeweiligen Studien.

Tabelle 5: Auswahl klinischer Studien zur Untersuchung der positiven Aspekte des Krafttrainings im hohen Alter.

Studie	Alter	Intervention	Verbesserung/Verstärkung
Gonzalez et al. 2014	71,1 ± 6,1	6 Wochen/2x wöchentlich progressives Krafttraining 3 Sätze mit 8 – 15 Wdh Kniebeuge, Liegestütz, Schulterpresse, Unterarmstütz, Bizepscurl etc.	Gleichgewicht
Granacher et al. 2013	70,8 ± 4,1	9 Wochen/2 x wöchentlich progressives Krafttraining Fokus auf Rumpfmuskulatur 3 – 4 Sätze mit 15 – 20 Wdh Rumpfhebe, seitlicher Beckenlift, Arm-/Beinheben im Vierfüßlerstand	Rumpfmuskulatur Wirbelsäulenbeweglichkeit Gleichgewicht funktionelle Mobilität
Lacroix et al. 2016	73 ± 4	12 Wochen/3x wöchentlich 2 Gruppen (1x mit Supervisor, 1x ohne Supervisor)	Beinmuskulatur Gleichgewicht Supervisor-Gruppe effektiver

	progressives Balance- und Krafttraining 3 – 4 Sätze mit 8 – 15 Wdh Gleichgewichtübung, Kniebeuge, Unterarmstütz, seitlicher Beckenlift	
Nicholson et al. 66 ± 4 2015	26 Wochen/2x wöchentlich Body Pump: Krafttraining mit hoher Anzahl an Wdh bei geringer Gewichtsbelastung (bis zu 100 Wdh) Ganzkörpertraining in der Gruppe	Maximalkraft Gehgeschwindigkeit Gleichgewicht
Pamukoff et al., 70,8 ± 4,4 2014	6 Wochen/3x wöchentlich progressives Balance- und Krafttraining 3 Sätze mit 8 – 10 Wdh Beinpresse, Beinbeuge, Wadenpresse, Hüftabduktion	Beinmuskulatur Gleichgewicht
Vikberg et al., 70 2019	10 Wochen/3x wöchentlich progressives Krafttraining mit Fokus der unteren Extremitäten 4 Sätze mit 10 Wdh Kniebeuge, vom Stuhl aufstehen, Wadenheben, Liegestütze, Brücke	Erhöhung der Muskelmasse und -kraft bei Erkrankung an Sarkopenie

Wdh = Wiederholungen

Der Gewinn an Muskelkraft ist sehr variabel und kann zwischen 10 und 174 % schwanken. Je nach Häufigkeit, Intensität, Dauer der Übungen, aber auch nach Alter und allgemeinem Fitnesszustand, variiert der Aufbau an Muskelmasse sehr stark (Zahner et al., 2014).

Aufgrund dessen sollte sich das Training für die Kraftentwicklung an bestimmte Empfehlungen halten, um ein effektives und sicheres Training zu gewährleisten. Am wichtigsten ist es, dass die einzelnen Übungen verständlich übermittelt werden, sodass die Durchführung korrekt erfolgt und keine Verletzungen hervorgerufen werden. Des Weiteren sollte die Intensität der Trainingseinheiten individuell konzipiert sein und alle Übungen für jede Muskelgruppe mehrmals pro Woche progressiv wiederholt werden.

Außerdem sollte das Trainingsprogramm so angepasst sein, dass es explizit gegen altersbedingte Veränderungen des Körpers wie Muskelatrophie, aber auch neuromuskuläre Dysfunktion wirkt. Der Gewinn an FFM und die inter- und intramuskuläre Koordination sind hier besondere Zielgrößen. Weitere wichtige Aspekte des Krafttrainingskonzeptes für ältere Menschen sind, die Mobilität im alltäglichen Leben aufrechtzuerhalten, widerstandsfähiger gegen Verletzungen zu sein, aber auch das psychosoziale Wohlbefinden aufrechtzuerhalten. Die Unabhängigkeit im Alltag stärkt die psychische und die körperliche Gesundheit älterer Personen. Zu guter Letzt sollten alternative Krafttrainingsprogramme angeboten werden, die ältere Personen mit eingeschränkter Mobilität (Sarkopenie, Gebrechlichkeit) oder kognitiver Beeinträchtigung (Demenz) ausführen können. Mobile Trainingsgeräte oder Kraftübungen im Sitzen sind Alternativprogramme, die auch vor Ort (Pflegeeinrichtung, Krankenhaus) durchgeführt werden können (Fragala et al., 2019).

Zusammenfassend bietet das Krafttraining eine Vielzahl an Vorteilen für die ältere Bevölkerungsgruppe. Gerade Aktivitäten des alltäglichen Lebens, zu denen Gehgeschwindigkeit, Aufstehen oder das Treppensteigen gehören, können durch die Erhöhung der Muskelmasse und -kraft signifikant verbessert werden (Papa et al., 2017). Empfehlungen für die Gestaltung eines Krafttrainingsprogramms für gesunde ältere Personen sollten wie folgt aussehen:

Tabelle 6: Empfehlungen eines Krafttrainingsprogramms für gesunde ältere Personen (nach Zahner et al 2014; Fragala et al., 2019).

Trainingsprogramm	Empfehlung
Intensität	8 – 12 Wochen 45 – 60 min pro Einheit 6 – 8 Übungen pro Einheit 1 – 3 Sätze mit 8 – 12 Wdh oder 10 – 15 Wdh
Pausen	2 – 3 min zwischen den Einheiten
Frequenz	2 – 3 pro Woche
Belastung	70 – 80 % des 1-RM (Einwiederholungsmaximum)
	Prinzip der Progression bei der Wdh-Zahl

Wdh = Wiederholungen, RM = Einwiederholungsmaximum

2.7.1 Training in Kombination mit Proteinen im Alter

Eine gesunde und ausgewogene Ernährung ist eine wichtige Basis für den Erfolg im Kraft- und Ausdauertraining. Dass die Proteinzufuhr ein wesentlicher Aspekt im Training ist, ist schon seit längerem bekannt. Doch im Hinblick auf Menge, Proteinzusammensetzung, Qualität der Proteinquelle und den richtigen Zeitpunkt der Aufnahme herrscht bis dato immer noch Uneinigkeit (König et al., 2020). Die International Society of Sports Nutrition empfiehlt derzeit für sportlich aktive Erwachsene 1,4 bis 2,0 g/kg/KG Protein am Tag, um die optimale Stimulation der muskulären Proteinbiosynthese (MPS) zu erzielen. Dieser Wert ist abhängig vom Trainingszustand und vom Alter der Sporttreibenden. Der Zeitpunkt der Proteinaufnahme sollte während des Muskelaufbautrainings alle drei bis vier Stunden gleichmäßig über den Tag verteilt sein, da die anabole Wirkung nach einem Krafttraining bis zu 24 Stunden andauert. Um vermehrt positive Effekte zu erzielen, sollte das Zeitfenster von zwei Stunden nach der körperlichen Belastung nicht überschritten werden. Im Normalfall ist es älteren und aktiven Menschen möglich, durch eine vollwertige Ernährungsweise ihren optimalen Proteinbedarf decken, in speziellen Fällen können Supplementationen jedoch sehr hilfreich sein. So können Nahrungsergänzungsmittel mit schnell verdaulichen Proteinen und einer erhöhten Menge an essenziellen Aminosäuren, vor allem Leucin, besonders wirkungsreich sein, da sie die MPS am effektivsten stimulieren (Jäger et al., 2017). Insbesondere bei Personen ab 65 Jahren sollte eine Proteinsupplementation aus Leucin, HMB (3-Hydroxy-3-methylbuttersäure) und zusätzlichem Vitamin D in Erwägung gezogen werden. Evidenzbasierte Hinweise zeigen, dass diese Kombination aus Nahrungsergänzungsmitteln und progressivem Krafttraining am effektivsten gegen den Verlust von Muskelkraft sowie Sarkopenie wirken kann (Cruz-Jentoft et al., 2020). Nichtsdestotrotz sollten besonders ältere Personen auf eine protein- und nährstoffreiche Ernährungsform achten. In Tabelle 7 sind Lebensmittel mit hohem Proteingehalt und hoher biologischer Wertigkeit aufgelistet.

Tabelle 7: Lebensmittel mit erhöhtem Proteingehalt (nach König et al., 2020)

<u>Lebensmittel</u>	<u>Proteingehalt pro Portion</u>
Kartoffeln (25 g) + Quark (150 g)	25 g
Kartoffeln (220 g) + Ei (60 g)	19 g
Quark/Skyr (200 g)	16 – 19 g
Milch/Buttermilch (500 g)	17 g
Haferflocken (50 g) + Milch (250 g)	15 g
Vollkornbrot (2 x 55 g) + Käse (30 g)	15 g
Vollkornbrot (2 x 55 g) + Erdnussmuss (25 g)	15 g

Nach aktueller Studienlage bieten tierische Proteinquellen keinen eindeutigen Vorteil gegenüber pflanzlichen Proteinen (Messina et al., 2018). Darüber hinaus besitzen pflanzliche Eiweißquellen eine höhere Menge an Vitaminen, Ballaststoffen und sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und senken zusätzlich die Zufuhr an LDL-Cholesterin und Triglyzeriden (Lynch et al., 2018).

Der positive Effekt einer erhöhten Proteinzufuhr in Kombination mit progressivem Kraft- und Widerstandstraining wurde in einer Vielzahl von Interventionsstudien bei älteren Personengruppen untersucht. So fanden Francis et al. heraus, dass ein 12-wöchiges, sich stetig steigerndes Krafttraining in Kombination mit einer erhöhten Proteinsupplementation die Muskelmasse im Oberschenkelbereich und somit die Gehgeschwindigkeit bei älteren Frauen über 50 Jahren verbesserte (Francis et al., 2017). In einer weiteren klinischen Studie wurde die Auswirkung von Molkeproteinen als Nahrungsergänzungsmittel, die vor und nach dem Krafttraining supplementiert wurden, untersucht. Nach sechs Monaten stellte sich heraus, dass die über 60-jährigen Frauen, die die Supplementierung mit Molkeprotein erhielten, eine signifikante Erhöhung von Muskelkraft und -masse zeigten, unabhängig vom Zeitpunkt der Supplementation (Nabuco et al., 2018). Abschließend ist noch die Studie von Tieland et al. zu erwähnen. Hier stellte man fest, dass eine Proteinergänzung von 15 g zweimal pro Tag den Muskelaufbau während eines progressiven Widerstandstrainings bei gebrechlichen älteren Personen erhöhte (Tieland et al., 2012). Anhand dieser Ergebnisse haben die PROT-AGE- und ESPEN-Gruppen Richtlinien erstellt, die eine adäquate Zufuhr an Proteinen in Kombination mit Kraft- und Ausdauertraining für gesunde ältere Personen empfehlen.

Tabelle 8: Richtlinien der PROT-AGE und ESPEN-Gruppen für eine ausgewogene Proteinzufuhr mit zusätzlichem Training (nach Deutz et al., 2014; Bauer et al., 2013).

<u>Training/Proteinzufuhr</u>	<u>Häufigkeit</u>
körperliche Aktivität	täglich
Ausdauertraining	30 min pro Tag
Krafttraining	2 – 3 pro Woche/10 – 15 min
Proteinzufuhr	1,2 g/kg/KG
<u>Empfehlung: zusätzliche 20 g Supplementation nach dem Training</u>	

2.7.2 Oxidativer Stress und sportliche Aktivität

Intensive körperliche Belastung erhöht die Generierung von RONS im menschlichen Organismus und kann im größeren Ausmaß sogar oxidativen Stress induzieren und somit wichtige Makromoleküle schädigen.

Der Hauptentstehungsort der

belastungsinduzierten Prooxidantien sind vor allem die aktiven Muskelfasern, die

während der Muskelkontraktion zahlreiche RONS produzieren (siehe Abb. 5). Die primären Radikale, die bei kontraktiven Mechanismen entstehen sind $O_2^{\bullet-}$ und $NO^{\bullet}$. Hierfür verantwortlich sind hauptsächlich die NADPH-Oxidase, Xanthinoxidase und NO-Synthase, die in den Myozyten lokalisiert sind (Powers et al., 2010). Whitee et al. untersuchten die durch oxidativen Stress verursachten Schäden bei Teilnehmenden eines Halbmarathons und fanden heraus, dass 8-OxoG und Malondialdehyd (MDA), beides wichtige Biomarker für oxidativen Stress, nach dem Lauf signifikant erhöht waren (Withee et al., 2017).

RONS sind aber auch unentbehrliche Stimulationsmoleküle und regulieren während der physiologischen Belastung viele Aufgaben. Zum einen modulieren sie den zellulären Blutfluss der Muskelfasern und induzieren dadurch die Muskelkraft, zum anderen spielen sie eine wichtige Rolle als Botenstoff in der Signaltransduktion. Durch die Regulierung als Signalstoff können viele Transkriptionsfaktoren im Skelettmuskel stimuliert werden, wie z. B. das nuclear factor-kappa B (NF- κ B) und Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor-Gamma-Coaktivator 1-alpha (PGC-1 α). Beide Transkriptionsfaktoren induzieren wichtige Biomoleküle, die am endogenen Antioxidationsystem und an der Synthese von Mitochondrien beteiligt sind (S. K. Powers et al., 2010). Folglich bewirkt sportliches Training eine systematische Anpassung der antioxidativen Systeme, sodass bei trainierten Personen ein verbesserter Schutzmechanismus gegen oxidativem Stress vorliegt und durch intensives Training die Anzahl an antioxidativen Enzymen wie der SOD, KAT und GPx in den Myozyten erhöht werden (Powers & Jackson, 2008). In der Studie von Vezzoli et al. stellte man sogar fest, dass ein moderates Krafttraining bei älteren Personen mit Sarkopenie die RONS-Bildung und somit oxidativen Stress senkt und zusätzlich der Verminderung der Muskelkraft entgegenwirkt (Vezzoli et al., 2019).

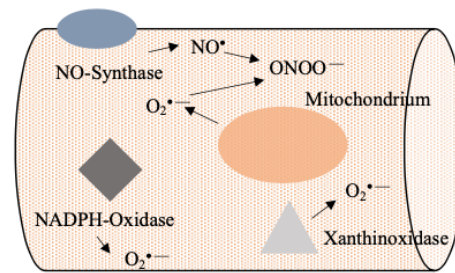


Abbildung 5: Belastungsinduzierte Produktion von RONS in der aktiven Muskelfaser (nach Powers et al.).

Aufgrund der eben beschriebenen Faktoren stellt sich nun allerdings die Frage, ob die belastungsinduzierte Erhöhung von RONS vorteilhaft oder schädlich für die körperliche Gesundheit ist. Dieser paradoxe Mechanismus der Radikalbildung wurde von Power et al. in ihrer zuletzt erschienen Übersichtsarbeit beschrieben. So induziert die RONS-Bildung einerseits, bei moderatem Training, eine physiologische Muskeladaptation, die durch die Biogenese von Mitochondrien und endogenen AO hervorgerufen wird. Andererseits kann ein intensives Ausdauer- und Krafttraining oxidativen Stress induzieren. Daraus folgend lässt sich feststellen, dass zukünftig ein Gleichgewicht zwischen RONS und antioxidativen Enzymen sowie das Prinzip der Hormesis (Belastungstoleranz) in diesem Wechselspiel an Aufmerksamkeit gewinnen sollten (Powers et al., 2020).

2.7.3 Antioxidantien und sportliche Aktivität

Da bei körperlicher Anstrengung die Produktion von RONS stark ansteigt, ist das Interesse am Zusammenspiel von oxidativem Stress, Leistungsoptimierung und AO-reicher Lebensmittelauswahl sehr groß. Eine vollwertige Ernährungsweise mit einem hohen Anteil an pflanzlichen Lebensmitteln kann den Bedarf an antioxidativ wirksamen Nährstoffen bei Sportler*innen, die sich im Breiten- und Gesundheitssport bewegen, ohne Probleme decken. Da durch körperliche Aktivität außerdem die endogene Enzymaktivität sowie das gesamte antioxidative Potenzial verstärkt werden, ist es bis dato immer noch umstritten, ob ein an AO-reiches Nahrungsergänzungsmittel für sportlich aktive Personen notwendig ist, um muskuläre Leistungs- und Regenerationsfähigkeit zu verbessern (Carlson et al., 2019). Einige Studien zeigen sogar nachteilige Effekte trainingsbedingter Supplementationen, da sie sich negativ auf die Leistungsentwicklung auswirken können (Paulsen et al., 2014). Morrison et al. kamen sogar zu dem Ergebnis, dass nach einem intensiven Training hohe Dosen an Vitamin E und C keine Reduktion von RONS im Skelettmuskel hervorrufen (Morrison et al., 2015). Weitere Untersuchungen mit alternativen Dosierungsformen sowie mit ähnlich wirksamen Substanzen sind hier erforderlich (Cruz-Jentoft et al., 2020). Nach aktueller Datenlage ist Sportler*innen zu raten, den Bedarf an antioxidativen Nährstoffen durch eine ausgewogene Lebensmittelauswahl zu decken und sich dabei an den Empfehlungen der D-A-C-H-Referenzwerte zu Vitamin C, Vitamin E, Carotinoiden und Spurenelementen wie Selen oder Zink zu orientieren (Carlson et al., 2019).

Die Regel „5 am Tag“ der DGE wäre eine weitere Orientierungshilfe. Sie ergibt ca. ein Gewicht von 250 g Obst und 400 g Gemüse am Tag an und kann hier idealerweise als

antioxidative Versorgung angesehen werden (Boeing et al., 2012). In Tabelle 9 sind Empfehlungen zur Erhöhung des antioxidativen Potenzials durch eine gesunde Lebensweise angeführt.

Tabelle 9: Empfehlungen zur Erhöhung des antioxidativen Potenzials durch bewusste Ernährung und eine gesunde Lebensweise (nach Robert Koch-Institut, 2008; 10-Regeln-der-DGE, 2017).

Empfehlung	Information
5 am Tag - täglich 5 Portionen Obst und Gemüse	antioxidative Versorgung ↓ Energiedichte + ↓ postprandiale oxidative Belastung
↓ rotes Fleisch (300 - 600 g)	↑ Eisengehalt wirkt prooxidativ
1 – 2 x pro Woche Fleisch und Wurst	↑ tierische Fette + ↑ postprandiale oxidative Belastung durch Hypertriglyzeridämie
↓ Fett (60 – 80 g/d) fettarme Produkte und pflanzliche Öle bevorzugen	↑ postprandiale oxidative Belastung durch Hypertriglyzeridämie
↓ Zucker (50 g/d) gelegentlicher Verzehr von Mono- sacchariden (Limonaden, Süßwaren)	↑ glykämischer Index ↑ oxidative Belastung durch Hyperglykämie
↓ Alkohol moderater Konsum von 20 g/d für Männer und 10 g/d für Frauen	↑ oxidative Belastung vor allem in der Leber
nicht Rauchen	↑ oxidative Belastung durch zahlreiche freie Radikale im Tabakrauch
↑ körperliche Aktivität mindestens 30 min/d	↑ endogene Synthese von antioxidativen Enzymen ↓ RONS in Mitochondrien

2.8 Bestimmung des antioxidativen Potenzials

In unserem Körper gibt es eine Vielzahl an antioxidativen Substanzen, die gemeinsam ein effektives Abwehrsystem bilden. Um einen Einblick in das Gleichgewicht zwischen den AO und den prooxidativen Molekülen zu ermöglichen, gibt es eine Vielzahl an Testmethoden, die den Redoxstatus messen können. Die verschiedenen Messprinzipien sind in Tabelle 10 angeführt.

Tabelle 10: Messprinzipien zur Ermittlung des Redoxstatus (nach Finaud et al., 2006; Huang et al., 2005; Kuchařová et al., 2019).

Messung	Testmethodik
direkte Messung von RONS	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie
Messung oxidativer Schäden (DNA, Lipiden und Proteinen)	Comet Assay
Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität	FRAP (ferric reducing ability of plasma) TEAC (trolox equivalence antioxidant capacity) ORAC (oxygen radical absorbance capacity) TRAP (trapping antioxidant parameter)
Bestimmung einzelner AO	GSH/GSSG Enzymatische Aktivitätsmessung (SOD, KAT, GPx)

Die anti- oder prooxidativen Verbindungen werden meistens im Blutplasma untersucht, da es sich als stabiles Transportmedium bewährt hat. Alternativ werden Urin- oder Speichelproben als Biomarker für die Messungen herangezogen (Gyurászová et al., 2018).

Die für diese Arbeit relevantesten Messmethodiken sind:

Antioxidative Gesamtkapazität Aufgrund der hohen Anzahl verschiedener AO, die im Intra- und Extrazellulärraum zirkulieren, ist die Messung des gesamten antioxidativen Potenzials eine beliebte Methodik. Das Messprinzip besteht darin, die Fähigkeit von antioxidativen Verbindungen zu messen, die prooxidative Moleküle abfangen und dadurch neutralisieren (Prior & Cao, 1999). Dies geschieht durch den Transfer eines einzelnen Elektrons, dass vom AO auf das Oxidans übertragen wird. Dabei wird die Absorptionsänderung vom reduzierten Substrat, die z. B. durch eine Farbreaktion bemerkbar gemacht wird, photometrisch gemessen: Probe (Oxidant) + Elektron (vom AO) = reduzierte Probe + oxidierts AO.

Eine erhöhte antioxidative Gesamtkapazität im Serum schließt auf die Fähigkeit, mit einer höheren Belastung an RONS umgehen zu können (Huang et al., 2005). Das FRAP-Assay ist ein solches Testverfahren, bei der die Eisenreduktionsfähigkeit antioxidativ wirkender Substanzen gemessen wird (Benzie & Strain, 1996).

Bestimmung einzelner Antioxidationsmarker Eine weitere Methodik ist die Messung einzelner antioxidativer Biomarker, wie etwa die Thiolproteine, die durch ihre freie SH-Gruppe effiziente Radikalfänger sind. Ein besonders starker Redox-Puffer ist das GSH, da es

gleichzeitig oxidiert und reduziert werden kann und durch diesen Mechanismus RONS neutralisiert. Das Verhältnis zwischen GSH und GSSG ist somit ein häufig verwendeter Marker für die Bestimmung des antioxidativen Potenzials (Finaud et al., 2006). Die fluorometrische Methode von Hissin und Hilf wird noch heute bevorzugt zur Quantifizierung von reduziertem GSH und oxidiertem GSSG im Blutplasma verwendet. Die pH-abhängige Messung basiert auf der Bildung eines Konjugationsproduktes, das aus GSH und einem fluoreszierenden Reagenz besteht, welches anschließend im Photometer gemessen wird (Hissin & Hilf, 1976).

3 Methodik

3.1 Studiendesign

Die NutriAging Protein Studie gehört zu einem multidisziplinären Projekt der Universität Wien und ist Teil der Active Aging Plattform, die in Kooperation mit dem Zentrum der Sportwissenschaft der Universität Wien sowie der Comenius Universität Bratislava durchgeführt wurde.

Bei der Protein Studie handelte es sich um eine prospektive, randomisierte kontrollierte Interventionsstudie, die von Mai bis Dezember 2018 in Wien durchgeführt wurde.

Das Ziel der Studie war herauszufinden, ob die Gabe einer erhöhten Proteinzufuhr mit zusätzlichem Krafttraining einen Effekt auf die Gesundheit und auf die allgemeine Lebensqualität älterer Personen hat. Zu den wichtigsten Parametern, die während und nach der Studie untersucht worden sind, gehörten zum einen die körperliche Leistungsfähigkeit, die durch anthropometrische Messungen erfasst worden sind, oxidativer Stress und die damit einhergehenden DNA-Schäden sowie eine Vielzahl an immunologischen Biomarkern.

3.2 Rekrutierung

Die Rekrutierung begann im Mai 2018. Gesucht wurden Frauen und Männer im Alter ab 65 Jahren aus Wien und Umgebung. Das Kuratorium Wiener Pensionisten-Wohnhäuser wirkte bei der Suche der Proband*innen unterstützend. Zusätzlich erreichte man das Interesse durch Artikel in verschiedensten Tageszeitungen sowie durch Auftritte im Fernsehen oder im Radio. Von über 600 interessierten Personen wurden am Ende 183 Pensionist*innen im Alter von 65 bis 85 Jahren zum Start der Studie eingeladen. Jedoch mussten noch vor der Randomisierung 51 Personen ausgeschlossen werden, da sie die Ein- und Ausschlusskriterien nicht erfüllten. Während der Studie schieden dann noch weitere Personen aus. Die Gründe dafür waren gesundheitliche Probleme oder fehlende Motivation. Die Abschlussuntersuchungen wurden an 117 teilnehmenden Personen durchgeführt.

Durch ärztliche Untersuchungen wurde die zur Teilnahme an der Studie nötige mentale und physische Kompetenz des Studienkollektivs festgestellt. Die geistige Fitness wurde mit Hilfe des Mini-Mental-Status-Tests getestet, die körperliche Leistung erfasste man mit dem Short-Physical-Performance-Battery-Test.

Weitere Ausschlusskriterien waren chronische Krankheiten, die das Krafttraining nicht erlaubten. Dazu zählten kardiovaskuläre Erkrankungen, diabetische Retinopathie sowie Osteoporose. Kortison- und Antibiotikamedikation oder ein schon bestehendes regelmäßiges Krafttraining (mehr als einmal pro Woche in den letzten 6 Monaten) waren auch nicht erlaubt.

3.3 Randomisierung

Nach erfolgreicher Rekrutierung und Genehmigung der Ethikkommission der Universität Wien konnte die Randomisierung der Teilnehmer*innen beginnen. Dabei wurden sie in drei Gruppen eingeteilt:

Tabelle 11: Einteilung der Interventionsgruppen.

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

Um eine homogene Verteilung der Proband*innen zu gewährleisten, wurden die Gruppen nach Alter und Geschlecht stratifiziert, die restliche Einteilung erfolgte zufällig. Dieser Vorgang wurde mit Hilfe der Randomisierungsinternetseite „www.randomizer.at“ der Medizinischen Universität Graz durchgeführt.

Jede Gruppe erhielt unterschiedliche Vorgaben, an die sich die teilnehmenden Personen halten mussten. Die PL-Gruppe sollte sich an die D-A-CH-Referenzwerte für die empfohlene Proteinzufuhr ab 65 Jahre und älter, also 1 g/kg/KG/d Protein, halten. Die doppelte Menge an Proteinen wurde für PH-Gruppe angedacht, die eine Zufuhr von 2 g/kg/KG/d Protein verzehren sollten. Durch speziell ausgewählte Produkte, wie z. B. Proteinshakes oder Eiweißbrot, versuchte man die gewünschte Eiweißmenge sicherzustellen. In der K-Gruppe sollte sich in der gesamten Studienzeit die gewöhnliche Ernährungsweise und die übliche sportliche Aktivität nicht verändern.

3.4 Intervention

Die Intervention der Studie spielte sich im Zeitraum von Juli bis Dezember 2018 ab und wurde in drei Phasen (P1, P2, P3) sowie in drei zusätzliche Termine (T1, T2, T3), die für medizinische und funktionelle Untersuchungen bestimmt waren, unterteilt.

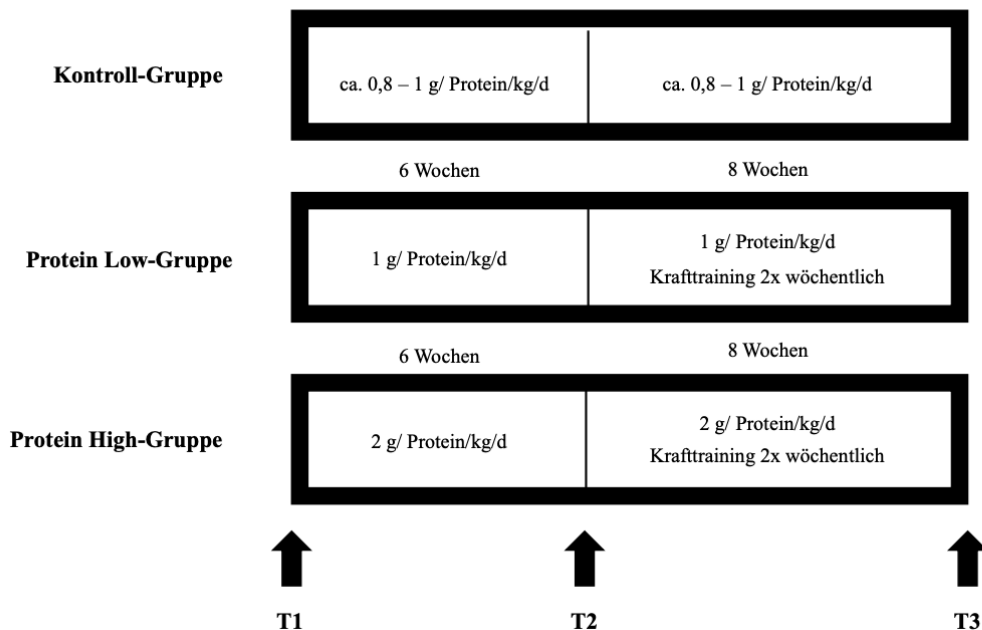


Abbildung 6: Chronologische Darstellung des Studienablaufs. Unterteilt in K-, PL- und PH-Gruppe zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3.

P1 diente als Vorbereitungsphase. Zu Beginn der Studie führte man eine Voruntersuchung durch, welche die üblichen Ernährungsgewohnheiten erfasste. Diese Untersuchung wurde vier Wochen vorher mit einem 24-h-Recall durchgeführt und diente als Referenzmaterial. Die Dauer von P1 erstreckte sich bis zum ersten Untersuchungstermin.

Die ersten Untersuchungen, die zu T1 durchgeführt wurden, waren medizinische, anthropometrische und funktionelle Testungen, um die Ausgangswerte aller Teilnehmer*innen zu erfassen. Zur Analyse der biochemischen Parameter wurden Blut-, Urin- und Stuhlproben gesammelt. Mittels funktioneller Testungen ermittelte man die allgemeine Mobilität, die Handkraft, die Gehgeschwindigkeit, die Ausdauerleistung und die Beinkraft.

P2 begann dann mit der Randomisierung und Zuteilung der Interventionsgruppen und erstreckte sich über sechs Wochen bis zu T2. In diesem Studienzeitraum starteten beide

Interventionsgruppen mit den zugewiesenen Proteinsupplementationen. Bei der K-Gruppe blieb alles wie gewohnt.

T2 begann in der siebten Woche. An diesem Termin wurden für die Zwischenuntersuchungen wieder die gleichen Parameter wie bei T1 untersucht.

Der letzte Abschnitt P3 startete in der achten Woche. In dieser Phase begann das zusätzliche Krafttraining. Es folgte eine Kombination aus Ernährungsintervention und regelmäßigem kontrollierten Krafttraining über einen Zeitraum von acht Wochen. Die K-Gruppe behielt ihr gewohntes Bewegungsausmaß bei.

Nach 15 Wochen wurden beide Interventionen beendet und es folgten die Abschlussuntersuchung (T3). Das Ende der Studie wurde im Dezember 2018 erreicht.

Während der gesamten Interventionszeit wurden in regelmäßigen Abständen die Ernährung mittels 24-h-Recalls erfasst, um die Nahrungszufuhr der Teilnehmer*innen zu beobachten.

3.4.1 Ernährungsintervention

Für die entsprechende Proteinzufuhr der PL- und PH-Gruppen bekamen die Teilnehmer*innen ihrer Gruppe zugeordnete Lebensmittel zugestellt. Um die Vorgaben zu erreichen, wurde die gewohnte Ernährung mit speziellen proteinreichen Produkten ergänzt. Die Organisation und Bereitstellung wurde von einem Logistikteam verwaltet, die die Lebensmittel direkt vor die Haustür der Proband*innen lieferten.

Tabelle 12: Auflistung der ausgewählten proteinreichen Lebensmittel und Rezepte in der PH- und PL-Gruppe.

<u>PH-Lebensmittel</u>	<u>PL-Lebensmittel</u>
NÖM Fasten Proteindrink	NÖM to go Drinks
Chiefs Proteindrink	Gittis Müsliriegel
Chiefs Protein Pudding	Clafoutis
NEOH CrossBar Riegel	Ölz Eiweißbrot, Vollkornbrot
GoVital Suppen	Obst
Ölz Eiweißbrot	
Iglo Erbsengranulat	
Rezepte: Muffin, Dips, Hüttenkäsetaler, Brownie, Kuchen mit Proteinpulver	Rezepte: Gemüsemuffin, Smoothies, Cupcakes ohne Protein- pulver

Die Teilnehmenden der Studie bekamen zusätzlich ein Ernährungstagebuch, in dem schon im Vorhinein eine Übersicht aller Produkte mit dem jeweiligen Proteingehalt gegeben war. Es enthielt auch Speisepläne und Zubereitungsarten, um die Produkte im Alltag besser zu integrieren sowie eine Liste aller Rezepte zum Nachkochen und Nachbacken. Zusätzlich verfügte das Studienbuch die Erklärung des Punktesystems, das die Dokumentation der Proteinzufuhr sicherstellen sollte. Anhand des Proteingehaltes wurden alle Produkte mit Punkten versehen. 10 g Protein entsprach dabei 1 Punkt. Diese waren auf jedem Produkt mit Punktaufklebern angeführt, die man nach dem Verzehr in das Ernährungstagebuch einkleben musste. Durch dieses Verfahren wurde die Auswahl der Nahrungsmittel, zur Erreichung der vorgeschriebenen Proteinmenge, erleichtert. So konnte je nach Gruppe und Körpergewicht für jede*n die vorgeschriebene Verzehrmenge an Proteinen pro Woche berechnet werden.

3.4.2 Sporttest und Krafttrainingsintervention

Um die körperliche Leistungsfähigkeit der teilnehmenden Personen im Verlauf der Studie zu bewerten und zu vergleichen, wurden an allen drei Testterminen folgende funktionelle Parameter (siehe Tab. 13) gemessen.

Tabelle 13: Auflistung der funktionellen Tests.

<u>gemessene Parameter</u>	<u>funktionelle Test</u>
Flexibilität des Körpers	Chair Sit and Reach
	Back Scratch-Test
	Timed Up&Go
	30-Second Arm Curl-Test
Gleichgewicht	Timed Up&Go
Gehgeschwindigkeit und Ausdauerleistung	6 Minute Walk
Muskelfunktion	Chair-Stand-Test
	30-Second ArmCurl-Test
	<u>Handgrip Strength-Test</u>

In der achten Woche startete das Krafttraining unter professioneller Anleitung von Sportwissenschaftler*innen. Die PH- und PL-Gruppe mussten zwei Mal pro Woche an einem detaillierten Trainingsprogramm in ausgewählten Fitnessstudios teilnehmen. Die Krafttrainingseinheiten wurden an zwei nicht aufeinander folgenden Tagen durchgeführt, um eine ausreichende Regeneration der Muskeln zu garantieren. Die progressive Trainingsintervention wurde dabei in vier Stufen unterteilt (siehe Abb. 7).

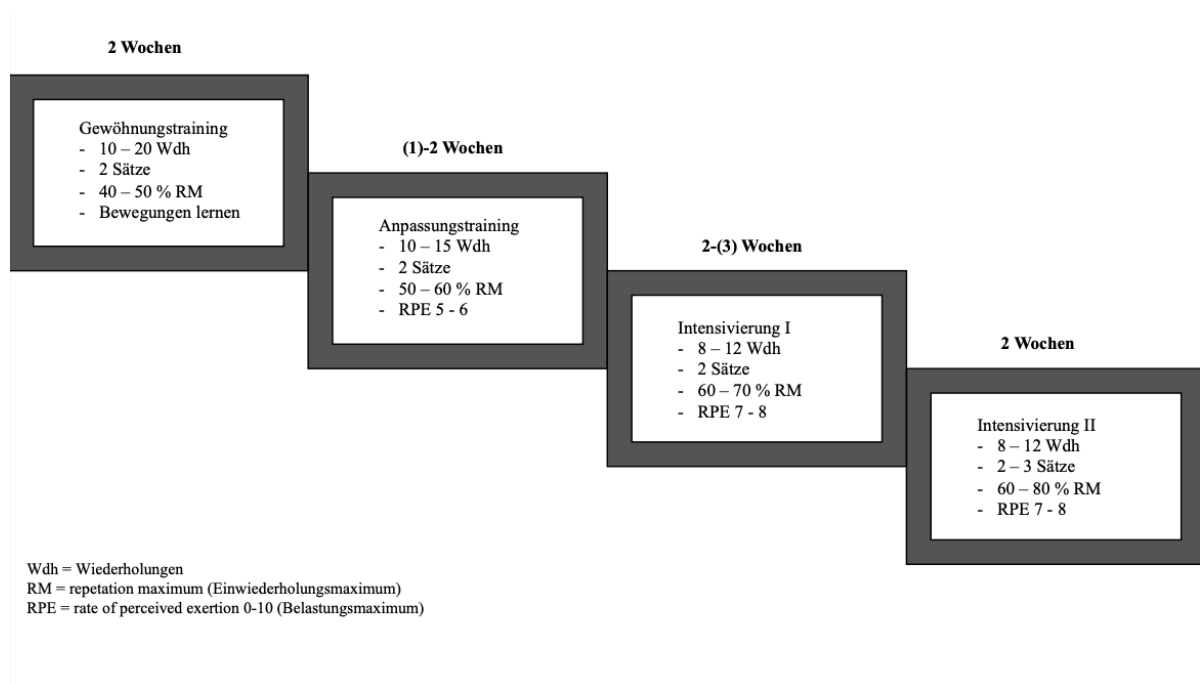


Abbildung 7: Darstellung der vierstufigen Trainingsintervention.

Um den Interventionsgruppen den Einstieg des Krafttrainings zu erleichtern, wurde in den ersten zwei Wochen ein Gewöhnungstraining durchgeführt. Danach erhöhte sich in der Phase des Anpassungstrainings die Intensität. Die Fitnessgeräte und deren Gewichte wurden individuell ausgewählt, sodass 10 bis 15 Wiederholungen in zwei Sätzen bewältigt werden konnten.

In der Intensivierungsphase steigerte sich die Intensität des Trainingsprogramms, bis das gewünschte Maximum an Sätzen und Wiederholungen pro Übung erreicht wurde.

Wie bei der Ernährungsintervention erhielten alle Teilnehmer*innen ein Trainingstagebuch.

Während jeder Einheit führte man die verwendeten Gewichte an und zählte die Wiederholungen auf, um die korrekte Leistungssteigerung zu messen. Außerdem protokollierte man jedes Mal zu Trainingsbeginn das allgemeine Wohlbefinden, die

Motivation und die Schlafqualität der letzten Nacht. Eine dementsprechende Darstellung findet sich in Abbildung 8 und 9.

Insgesamt gab es acht Übungen, deren Durchführung in Übungspaaren vollzogen wurde (siehe Tab. 14).

Tabelle 14: Auflistung der Übungen im Krafttrainingsprogramm.

Übungs paar	Übung
A1 + A2	Kniebeuge + Beinbeuger
B1 + B2	Latzug + Schulterdrücken
C1 + C2	Beinpresse + Stütz
D1 + D2	Rudern + Brustpresse

Trainingsprotokoll Code: _____

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

Abbildung 8: Darstellung des Trainingsprotokolls Seite 1. Biofaktoren, Kniebeuge, Beinbeuger, Latzug und Schulterdrücken.

Trainingsprotokoll Code: _____

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

Abbildung 9: Darstellung des Trainingsprotokolls Seite 2. Beinpresse, Stütz, Rudern und Brustpresse.

3.5 Messmethode FRAP

3.5.1 Messprinzip

Das von Benzie und Strain (1996) entwickelte FRAP-Assay ist ein einfaches und schnelles Testverfahren, um die antioxidative Gesamtkapazität im Blutplasma zu messen. Diese lässt sich – worauf das Verfahren im Kern abzielt – durch die Eisenreduktionsfähigkeit antioxidativ wirkender Substanzen feststellen. Bei dieser Reaktion entsteht eine intensiv blaue Farbe, deren Absorptionsmaximum bei 592 nm liegt, wenn ein Fe^{3+} -Tripyridyltriazin (Fe^{3+} -TPTZ) -Komplex zu Fe^{2+} reduziert wird. Der durch TPTZ blau gefärbte Fe^{2+} -Komplex wird photometrisch bestimmt. Das $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ - TPTZ - Redoxsystem findet in einem sauren Milieu bei einem pH-Wert von 3,6 statt. Je mehr AO in der Probe enthalten sind, umso mehr Fe^{2+} wird gebildet und dementsprechend intensiver ist auch die Farbentwicklung.

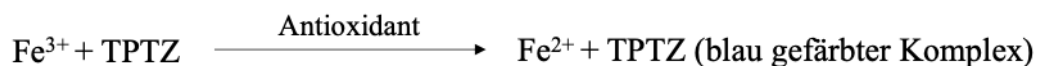


Abbildung 10: FRAP-Reaktionsmechanismus.

Der FRAP-Reaktionsmechanismus basiert auf einem Elektronen-Transfer (SET= single electron transfer). Die SET-Testverfahren messen die Elektronenübertragung potenzieller AO und somit ihre Fähigkeit, verschiedenste Oxidantien, wie z. B. RONS, Metalle oder Carbonyle, zu reduzieren (Prior et al., 2005).

Die Konzentrationsbestimmung wird mithilfe eines Photometers ermittelt und ist somit eine direkte Bestimmung des antioxidativen Potenzials der zu analysierenden Substanz (Benzie & Strain, 1996).

Für die vorliegende Arbeit wurde das Testverfahren in einigen Durchführungsschritten für den 96-Well-Mikroplattenleser modifiziert, um die Handhabung zu optimieren. Der von Benzie und Strain durchgeführte FRAP-Assay wurde mit einem Zentrifugalanalysator (Cobas Fara Centrifugal Analyzer) umgesetzt, dieses Messverfahren ist jedoch mittlerweile obsolet. Des Weiteren wurde das Absorptionsmaximum von 592 nm auf 540 nm reduziert, da die optimale Wellenlänge im FLUOstar optima nicht verfügbar ist. Zusätzlich verlängerte man die Reaktionszeit von 4 min auf 6 min, um das Absorptionsmaximum zu optimieren. Darüber hinaus wurde mit 96-well-Mikrotiterplatten gearbeitet, da sich so die Probandichte pro Durchlauf erhöhen ließ.

3.5.2 Chemikalien

Tabelle 15: Auflistung der verwendeten FRAP-Chemikalien.

Reagenz	chemische Formel	Hersteller
Natriumacetat	$C_2H_3NaO_2$	Fuka Chemicals, Schweiz
Essigsäure	CH_3COOH	Sigma-Aldrich, Deutschland
Tri(2-pyridyl)-s-triazin (TPTZ)	$C_{18}H_{12}N_6$	Sigma-Aldrich, Schweiz
Chlorwasserstoffsäure	HCl	Riedel-de Haën, Germany
Eisen-(III)-chlorid- Hexahydrat	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	Sigma-Aldrich, Deutschland
Eisen-(II)-sulfat- Heptahydrat	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumchlorid	NaCl	Merck KGaA, Deutschland
Kaliumchlorid	KCl	VWR Chemicals, Belgien
di-Sodium-hydrogen- phosphate	Na_2HPO_4	Merck KGaA, Deutschland
Potassium-phosphate monobasic	KH_2PO_4	Sigma-Aldrich, Deutschland
6-Hydroxy-2,5,7,8- tetramethylchroman-2- carbonsäure (Trolox)	$C_{14}H_{18}O_4$	Eigenherstellung

3.5.3 Probenaufbereitung

Plasmaproben Pro Proband*in wurden im Optimalfall drei Blutproben untersucht. Für die FRAP-Methodik verwendete man Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Plasma, welches für jede Testperson aliquotiert und bei -70 °C eingefroren wurde. Während der Analyse mussten die Plasmaproben fortwährend auf Eis gelagert werden, um eine Temperatur von 4 °C nicht zu überschreiten. Zu Beginn taute man die Probe auf, danach wurden sie für circa 10 sec gevortext und anschließend bei 3000 rpm, 4 °C und 3 min zentrifugiert.

Standardlösung Für die Kalibrierung wurde eine Fe^{2+} -Standardgerade mit bekannter Konzentration erstellt. Die Stammlösung aus $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ und *Aqua destillata* (Aqua dest.) musste jeden Tag frisch zubereitet werden und lag in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 2000 $\mu\text{mol/l}$. Mit Hilfe der Standardreihe kann die antioxidative Kapazität der zu analysierenden Probe quantifiziert werden. Einen FRAP-Wert von 100 $\mu\text{mol/l}$ kann man mit 100 $\mu\text{mol/l}$ Fe^{2+} -Standardlösung gleichsetzen.

Tabelle 16: Verdünnungsreihe zur Herstellung der Fe^{2+} -Standardgeraden.

Konzentration	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Aqua dest.
100 $\mu\text{mol/l}$	25 μl	475 μl
250 $\mu\text{mol/l}$	62,5 μl	437,5 μl
500 $\mu\text{mol/l}$	125 μl	375 μl
1000 $\mu\text{mol/l}$	250 μl	250 μl
1250 $\mu\text{mol/l}$	312,5 μl	187,5 μl
150 $\mu\text{mol/l}$	375 μl	125 μl
2000 $\mu\text{mol/l}$	500 μl	

Positivkontrolle Als Positivkontrolle wurde Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) verwendet. Trolox ist ein wasserlösliches Analog zu Vitamin E, dessen antioxidative Wirkung in biologischen Systemen bewährt ist (Barclay et al., 2003). Bei Trolox muss beachtet werden, dass es eine relative Aktivität von 2 hat, was bedeutet, dass 1 mol Trolox 2 mol Fe^{3+} reduzieren kann. Diesbezüglich ist der Trolox-Wert doppelt so hoch wie der der Fe^{2+} -Standardlösung (Benzie & Strain, 1996). Genau wie die Standardlösung musste auch die Positivkontrolle in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 2000 $\mu\text{mol/l}$ jeden Tag frisch hergestellt werden.

Tabelle 17: Verdünnungsreihe zur Herstellung der Troloxreihe.

Konzentration	Trolox	PBS
100 µmol/l	20 µl	480 µl
250 µmol/l	50 µl	450 µl
500 µmol/l	100 µl	400 µl
1000 µmol/l	200 µl	300 µl
1250 µmol/l	250 µl	250 µl
1500 µmol/l	300 µl	200 µl
2000 µmol/l	400 µl	100 µl

3.5.4 Geräte und Einstellung

Die FRAP-Messungen wurden mit einem Mikroplattenleser der Firma BMG Labtech durchgeführt. Die Quantifizierung fand bei einem Absorptionsmaximum von 540 nm statt und die Temperatureinstellung des FLOUstar optima lag bei 37 °C. Für das Auftragen der Proben wurden 96-well Mikrotiterplatten verwendet, die mit einer elektrischen Pipette (Eppendorf) befüllt wurden. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mithilfe des Programms MARS Datenanalyse Software (Version 2.41).

Tabelle 18: Auflistung des verwendeten Labormaterials für die FRAP-Analyse.

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

Tabelle 19: Einstellung des Programms MARS Datenanalyse Software (Version 2.41) am FLUOstar Optima für die FRAP-Analyse.

Einstellung der Software	Eingabe
Reader Configuration:	
Test Setup	Absorbence
Configuration light-wave-cable	Emission: white (empty) Excitation: red
Basic Parameters:	
Test name	FRAP
Microplate	Sterilin 96
Positions delay	0,5 s
Number of kinetic windows	1
Number of cycles	11
Number of flashes per well and cycle	20
Cycle time	36
Total measurement time	6m 08s
Measurement start time	1 s
Cycle time	36
Excitation filter	A 540
Emission filter	empty
Gain	1591
Well scanning	none
Pause before cycle	0
Temperature Control	37 °C
Layout:	
Content	S = Standard C = Control B = Blank X = Samples
Replicates	Number 2 (duplicat) Horizontal
Reading direction	↓ ↓ ↓
Concentrations, Volume, Shaking:	
Concentrations	manuel
Mode	orbital
Shaking width	7 mm
Additional shaking	before first cycle
Shaking time	5 s

3.5.5 Lösungsherstellung

Tabelle 20: Anleitung zur Herstellung aller FRAP-Lösungen.

pH-Lösung	Einwaage	Laborbedarf	Anweisung
Salzsäure 0,5 mol/l	50 ml HCl (37%) 950 ml Aqua dest.	Messkolben	erst Aqua dest. dann die Säure bei 4 °C lagern
Natronlauge 0,5 mol/l	20g NaOH 1000 ml Aqua dest.	Magnetrührer Messkolben	
<u>FRAP-Lösung</u>			
Acetatpuffer 300 mmol/l	3,1 g C ₂ H ₃ NaO ₂ 16 ml CH ₃ COOH 1000 ml Aqua dest.	Messkolben	pH: 3,6 eistellen bei 4 °C lagern
TPTZ 10 mmol/l	0,312 g TPTZ 585 µl HCl (25%) 100 ml Aqua dest.	Messkolben	bei 4 °C lagern
Eisen(III)-chlorid- Hexahydrat 20 mmol/l	0,541 g FeCl ₃ *6H ₂ O 100 ml Aqua dest.	Messkolben	bei 4 °C lagern
<u>Standard-Lösung</u>			
Eisen(II)-sulfat- Heptahydrat 2000 µmol/l	0,0556 g FeSO ₄ *7H ₂ O 100 ml Aqua dest.	Messkolben	Standardgerade täglich frisch herstellen bei 4 °C lagern
<u>Kontroll-Lösung</u>			
Trolox 2000 µmol/l		1,5 ml Eppis	Positivkontrolle täglich frisch herstellen bei -20 °C lagern
PBS für Trolox	8,2 g NaCl 0,2 g KCl 1,2 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄	Messkolben, Pasteurpipette	pH: 7,4 mit HCl oder NaOH einstellen

3.5.6 Durchführung

Der erste Arbeitsschritt bestand darin, die EDTA-Blutplasma Proben aus dem Tiefkühler zu holen. Die Aliquote wurden während der gesamten Analyse in Eiswannen gelagert, um die Temperatur von 4 °C nicht zu überschreiten. Vor dem Auftragen der Proben auf die Mikrotiterplatten, mussten sie für kurze Zeit gevortext und anschließend zentrifugiert (4 °C, 3 min, 3000 rpm) werden.

Das PBS-Verdünnungsmedium wurde vor jeder Messung mit NaOH oder HCl auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Bis zur Erreichung des gewünschten Wertes wurde mithilfe einer Pasteurpipette entweder die Säure oder die Lauge tröpfchenweise hinzugefügt.

Das täglich zubereitete FRAP-Reagenz, das aus Acetatpuffer, TPTZ und Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat bestand, musste in einem Wasserbad bei 37 °C aufbewahrt werden. Für die Befüllung von zwei Mikrotiterplatten benötigte man 25 ml Acetatpuffer und jeweils 2,5 ml TPTZ und Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat. Die Reagenzien wurden in einem Erlenmeyerkolben zusammengemischt und anschließend in Falcon Tubes überführt. Für die Quantifizierung des antioxidativen Potentials der jeweiligen Proben diente eine parallel zubereitete Fe²⁺-Standardreihe. Als Positivkontrolle wurde eine Trolox-Verdünnungsreihe hergestellt. Der Konzentrationsbereich der jeweiligen Verdünnungsreihen lag zwischen 100 und 2000 µmol/l. Auch diese mussten, wie das FRAP-Reagenz, täglich frisch zubereitet werden.

Tabelle 21: FRAP-Pipettierschema für die 96-well Befüllung.

96-well-Befüllung	Standard	Positivkontrolle	Probe	Blank
Fe ²⁺ -Lösung	10 µl			
Trolox		10 µl		
EDTA-Plasma			10 µl	
Aqua dest.	30 µl	30 µl	30 µl	40 µl
FRAP-Reagenz	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl

Das Maximalvolumen per Well war 350 µl. Mit einer elektronischen Eppendorfpipette wurde in jedes Well 10 µl EDTA-Plasma, Fe²⁺-Lösung oder Trolox pipettiert. Anschließend folgte 30 µl Aqua dest. und zu guter Letzt 300 µl vom FRAP-Reagenz. Danach wurde die Messung unmittelbar gestartet. Die Zeit zwischen dem abschließenden Pipettieren des FRAP-Reagenzes und der Messung des FLUOstar optima sollte so gering wie möglich sein, da der Reaktionsmechanismus von TPTZ und dem zu analysierenden Substrat bei Erstkontakt

unmittelbar beginnt. Alle drei Plasmaproben der Termine T1, T2 und T3 der Proband*innen wurden nacheinander auf der gleichen Platte gemessen. Die Programmierung des Mikroplattenreaders war so eingestellt, dass er die Absorptionsänderungen in Intervallen von 36 sec mit einer Gesamtzeit von 6 min maß. Jede Plasmaprobe wurde im Doppelansatz bestimmt. In regelmäßigen Abständen pipettierte man einen Blank (Blindwert), der dann bei der Konzentrationsberechnung von den Messwerten abgezogen wurde. Während eine Platte im FLUOstar optima gemessen wurde, konnte die zweite Platte parallel pipettiert werden. Durch diese Abfolge konnte die Probendurchsatzrate erhöht werden. In Abbildung 11 sind beide Layouts der Mikrotiterplatten abgebildet.

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

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

Abbildung 11: Layout der 96-well Mikrotiterplatten 1 und 2. Fe²⁺ (Eisen(II)-lösungen), Trolox, Blank (Blindwert), Plasmaproben.

3.5.7 Auswertung

Für die Ermittlung des antioxidativen Potenzials ($\mu\text{mol/l}$) wurde eine Standardgerade (siehe Abb. 12) erstellt. Die Geradengleichung wurde mit den Extinktionswerten der Fe^{2+} -Standardlösungen ermittelt. Dabei musste beachtet werden, dass die durchschnittlichen Extinktionswerte des Blanks abgezogen wurden. Abschließend übertrug man die Messwerte der Proben auf die Kalibriergerade und konnte somit die Konzentration der Plasmaproben in $\mu\text{mol/l}$ ermitteln.

Berechnung der Fe^{2+} -Standardgerade:

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

y = Absorption 540 nm

x = Fe^{2+} -Konzentration in $\mu\text{mol/l}$

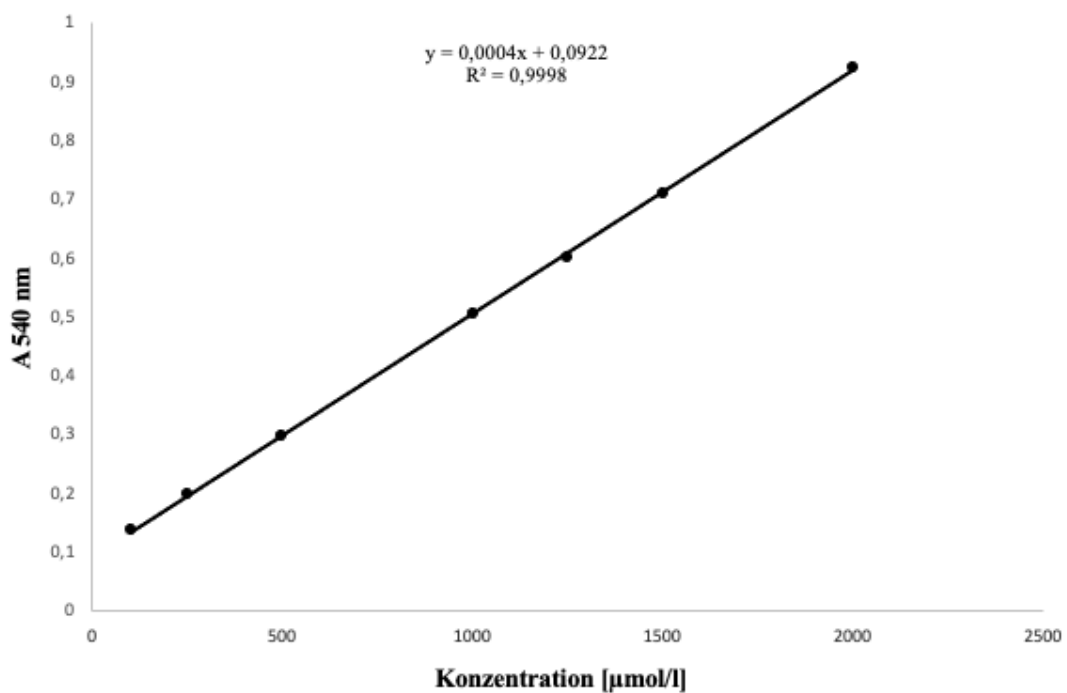


Abbildung 12: Fe^{2+} -Standardgerade zur Berechnung der FRAP-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$.

3.6 Messmethode GSH/GSSG

3.6.1 Messprinzip

Für die Evaluation des GSH- und GSSG-Gehaltes im menschlichen Blutplasma wurde in dieser Arbeit die modifizierte fluorometrische Methode von Hissin und Hilf (1976) angewendet. Die Messung von oxidiertem GSSG und reduziertem Glutathion GSH ist ein etablierter Marker für die antioxidative Kapazität und somit auch für den oxidativen Stress im biologischen System.

Bei der Methodik von Hissin und Hilf spielen die zwei Reagenzien o-Phthaldialdehyd (OPA) und N-Ethylmaleinimid (NEM) eine wesentliche Rolle.

Als Fluoreszenzreagenz wird OPA verwendet. OPA besitzt die Eigenschaft, bei einem spezifischen pH-Wert mit GSH zu reagieren. Bei der chemischen Reaktion mit GSH sollte der pH-Wert bei 8,0 liegen, GSSG benötigt einen alkalischen pH-Wert von 12,0. Die GSH-OPA-Bindung findet an der Thiolgruppe der Cystein-Seitenkette statt (siehe Abb. 13). Die Fluoreszenz-Messung von OPA liegt bei einem Extinktionsfilter von 350 nm und bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm.

Wie bereits erwähnt, sollte der pH-Wert bei der GSH-Analyse bei 8,0 liegen. Dies wird durch die Verwendung von EDTA bei der Herstellung der Verdünnungsreihe erreicht. Die GSH-Proben können direkt mit OPA inkubiert werden und danach erfolgt unmittelbar die Messung. Es wird kein Zwischenschritt benötigt (Hissin & Hilf, 1976). Aufgrund der raschen auto-oxidativen Umwandlung von GSH zu GSSG kann es zu einer Verfälschung der GSSG-Quantifizierung kommen. Dieses Problem wird durch die Verwendung von NEM (siehe Abb. 14) umgangen, da es die GSH-Reduktase inhibiert und somit die Autooxidation von GSH verhindert (Cohn & Lyle, 1966). Diesbezüglich werden die GSSG-Proben vor der Messung 30 Minuten lang mit NEM im Dunkeln inkubiert. Zusätzlich verhindert das Alkylierungsmittel NEM, dass während der GSSG-Messung das GSH mit OPA reagiert. Für den gewünschten pH-Wert von 12,0 wird NaOH verwendet. Die Natronlauge führt dazu, dass die Hydrolyse von GSSG zu GSH stattfindet (siehe Abb. 15) und somit das OPA an der Thiolgruppe von GSH (siehe Abb. 16) binden kann (Singh et al., 2017).

Reaktionsprinzip der GSH-Messung

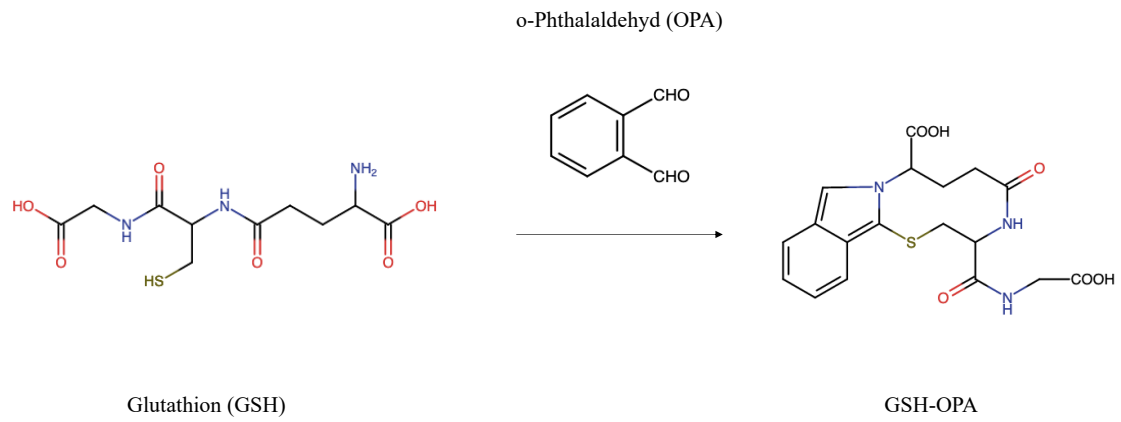


Abbildung 13: Reaktionsprinzip der GSH-Messung. Bindung des Fluoreszenzreagenz OPA an die SH-Gruppe von GSH.

Reaktionsprinzip der GSSG-Messung

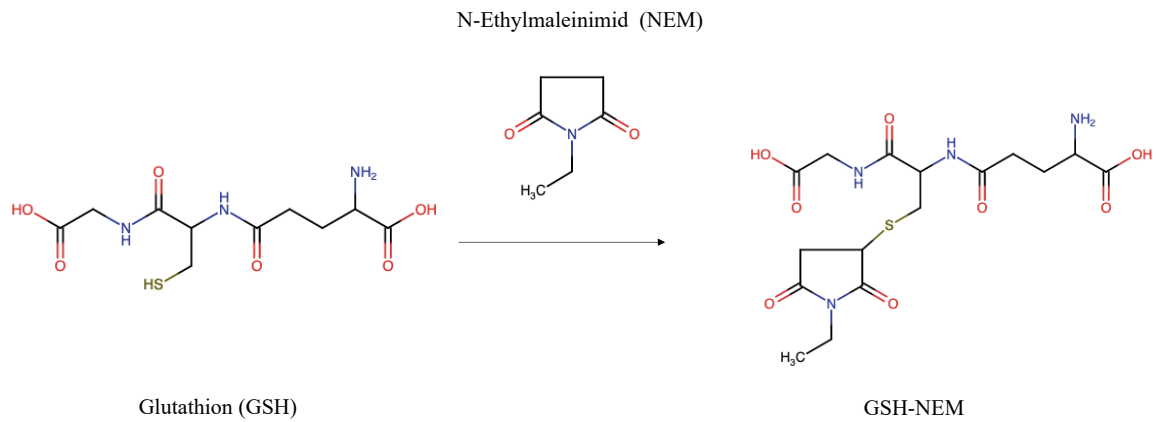


Abbildung 14: 1. Reaktionsschritt der GSSG-Messung. Bindung von NEM an die SH-Gruppe von GSH, um Autooxidation zu GSSG zu verhindern.

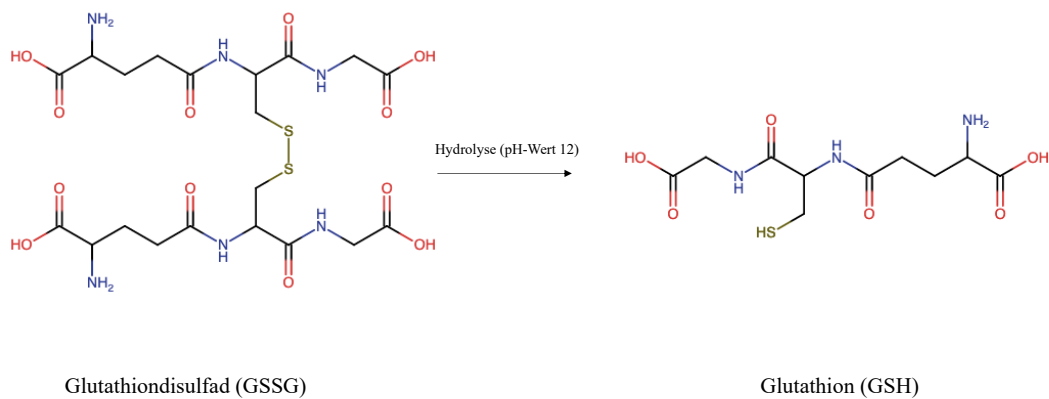


Abbildung 15: 2. Reaktionsschritt der GSSG-Messung. Einsetzung von NaOH, um die Hydrolyse von GSSG zu GSH hervorzurufen.

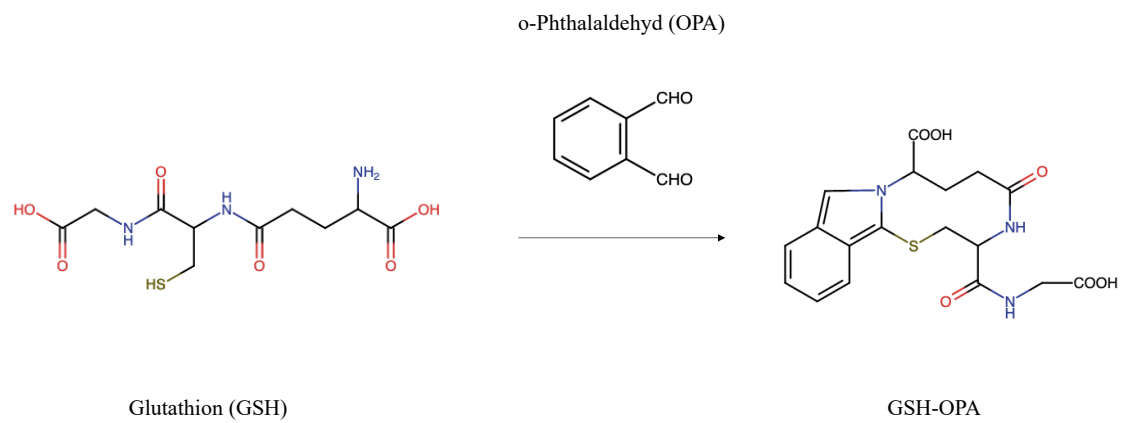


Abbildung 16: 3. Reaktionsschritt der GSSG-Messung. Bindung des Fluoreszenzreagenz OPA an die SH-Gruppe von reduziertem GSH.

3.6.2 Chemikalien

Tabelle 22: Auflistung der verwendeten GSH- und GSSG-Chemikalien.

Reagenz	chemische Formel	Hersteller
Natriumhydroxid	NaOH	Sigma-Aldrich, Deutschland
Sodium phosphate mono-basic	NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Sigma-Aldrich, Deutschland
Sodium phosphate dibasic	Na ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Sigma-Aldrich, Deutschland
N-Ethylmaleinimid (NEM)	C ₆ H ₇ NO ₂	Sigma-Aldrich, USA
o-Phthaldialdehyd (OPA)	C ₈ H ₆ O ₂	Merck KGaA, Deutschland
Methanol	CH ₃ OH	Merck KGaA, Deutschland

3.6.3 Probenaufbereitung

Plasmaproben Im besten Fall wurden wieder pro Proband*in drei Blutproben untersucht. Das Heparinplasma ließ man nach der Blutabnahme für 10 min bei Raumtemperatur ruhen. Anschließend wurde es bei 4 °C für 10 min und 2200 rpm zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurden 600 µl Plasma mit 600 µl Trichloressig (TCA) 10 % in eine Eppi überführt, gevortext und anschließend wieder zentrifugiert. Vom Überstand entwendete man daraufhin 250 µl pro Proband*in. Die Aliquote für die GSH und GSSG Analyse sind bei -80 °C für zwei Jahre haltbar.

Bei der GSH/GSSG-Methode wurden die Plasmaproben während der gesamten Durchführung wieder in Eiswannen gelagert, sobald sie aus dem Tiefkühler (-75 °C) kamen. Zu Beginn der Analyse wurden die Proben wieder gevortext und bei 4 °C für 5 min und 2200 rpm zentrifugiert.

Standardlösung Für die Mischung der Standardgeraden wurde jeweils eine GSH und GSSG Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration erstellt. Für die Kalibrierung verwendete man jeweils 100 µl Aliquote, deren Stocklösung 1 mM GSH oder GSSG beträgt. Die GSH

Standardreihe wurde mit einem EDTA-Buffer verdünnt, bei der GSSG Verdünnung verwendete man NaOH. Beide Verdünnungsreihen mussten täglich frisch zubereitet werden. Der Konzentrationsbereich, der für die Messung benötigt wurde, lag zwischen 50 und 1,56 $\mu\text{mol/l}$. Mit Hilfe der Standardlösung konnte der Gehalt und somit das antioxidative Potenzial in $\mu\text{mol/l}$ von GSH und GSSG in der Probe analysiert werden.

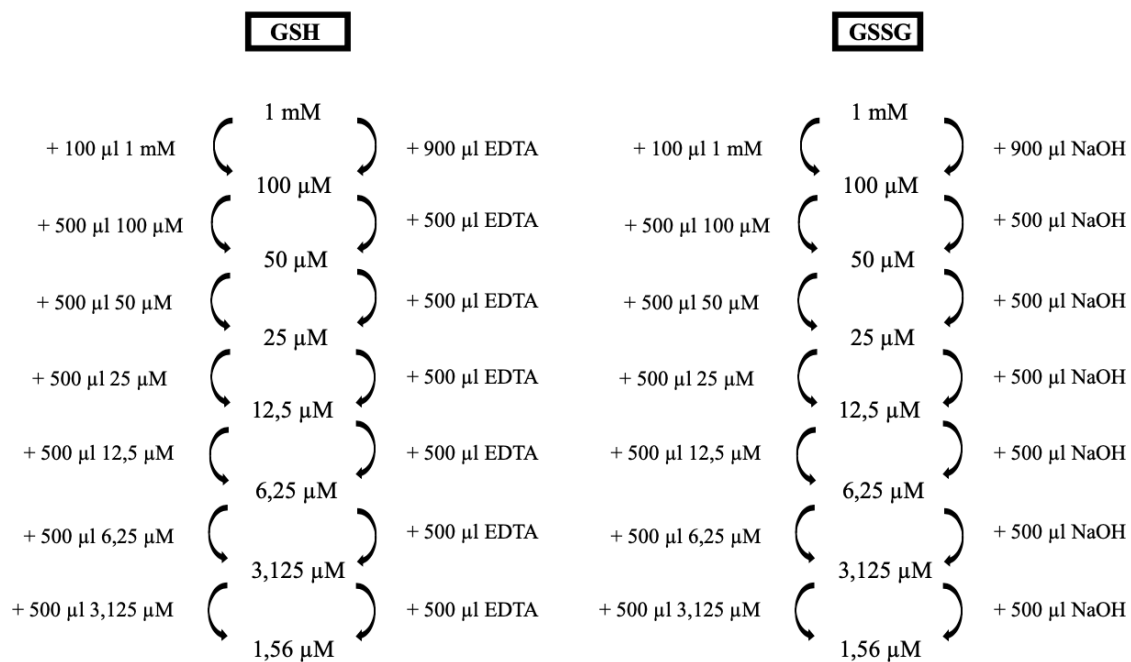


Abbildung 17: Pipettierschema für die Standardgeraden von GSH und GSSG mit bekannter Konzentration im Bereich von 1 mM bis 1,56 μM .

Positivkontrolle Als Positivkontrolle verwendete man stets die gleiche Probe mit bekannter Konzentration. Die Kontrolle musste bei jeder Messung im gleichen Bereich sein, um sicherzustellen, dass bei der Durchführung des Testverfahrens alles erwartungsgemäß funktionierte.

Tabelle 23: Konzentrationsbereich der GSH- und GSSG-Kontrolle in μM .

Kontrolle	Konzentrationsbereich
GSH	140 – 160 μM
GSSG	80 – 100 μM

3.6.4 Geräte und Einstellung

Für die Analyse der GSH/GSSG-Methodik wurde wie bei dem FRAP-Assay der gleiche Mikroplattenleser (BMG Labtech) verwendet. Bei der Fluoreszenzmessung lag die Einstellung der Absorptionswellenlänge bei einem Exzitationswert von 355 nm und einem Emissionsfilter von 420 nm. Die Temperatur musste beim FLOUstar optima nicht eingestellt werden, da die Quantifizierung bei Raumtemperatur ablaufen sollte. Für die Analyse der Proben wurden 96-well Mikrotiterplatten verwendet und die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm MARS Datenanalyse Software (Version 2.41).

Tabelle 24: Auflistung des verwendeten Labormaterials für die GSH- und GSSG-Analyse.

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

Tabelle 25: Einstellung des Programms MARS Datenanalyse Software (Version 2.41) am FLUOstar Optima für die GSH- und GSSG-Analyse.

Einstellung der Software	Eingabe
Reader Configuration:	
Test Setup	Fluorescence Top
Configuration light-wave-cable	Emission: blue Excitation: yellow
Basic Parameters:	
Test name	GSH_GSSG
Microplate	BMG LABTECH 96
Positions delay	0.2 s
Measurement start time	0.0
No of flashes per well	10
No of multichromatics	1

Excitation filter	355
Emission filter	420
Gain	800
Layout:	
Content	S = Standard C = Control B = Blank X = Samples
Replicates	Number 2 (duplicat) Horizontal
Reading direction	↓↓↓
Concentrations, Volume, Shaking:	
Concentrations	0
Volume	0
Shaking	x double orbital shaking with 4
<u>Additional shaking</u>	<u>no shaking</u>

3.6.5 Lösungsherstellung

Tabelle 26: Anleitung zur Herstellung der GSH- und GSSG-Lösungen.

pH-Lösung	Einwaage	Laborbedarf	Anweisung
Natronlauge 0,1 M	1 g NaOH 250 ml Aqua dest.	Messkolben	Auflösung durch Schütteln
Natronlauge 5 M	50 g NaOH 250 ml Aqua dest.	Messkolben	Auflösung durch Schütteln
<u>Sodium-Phosphat-Buffer (SPB)</u>			
Sodium phosphate monobasic 0,1 M	2,069 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 150 ml Aqua dest.	Becherglas Messzylinder Magnetrührer	bei RT mind. 1 Woche haltbar
Sodium phosphate Dibasic 0,1 M	4,935 g Na_2HPO_4 350 ml Aqua dest.	Becherglas Messzylinder pH-Meter 10 ml Pipette	auf pH-Wert 7,4 mit ~120 ml Monobasic
<u>EDTA-Buffer</u>			
Ethylendiamin- tetraessigsäure (EDTA) 5mM	0,3653 g $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ 250 ml SPB-Buffer	Becherglas Messzylinder Messkolben pH-Meter	auf pH-Wert 8,0 mit NaOH bei 4 °C eine Woche haltbar
<u>GSH/GSSG-Lösung</u>			
N-Ethylmaleimide (NEM) 40 mM	10 mg $\text{C}_6\text{H}_7\text{NO}_2$ 2 ml EDTA-Buffer	5 ml Eppi Vortex	Mengenangabe für 5 Platten jeden Tag frisch herstellen auf Eis lagern
o-Phthaldialdehyd (OPA)	4 mg $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$ 4 ml Methanol	5 ml Eppi Vortex	Mengenangabe für 5 Platten jeden Tag frisch herstellen auf Eis lagern

3.6.6 Durchführung

Die GSH/GSSG-Quantifizierung startete mit der Probenaufarbeitung. Alle Aliquote wurden im ersten Schritt aufgetaut, kurz gevortext und darauffolgend bei 4 °C für 5 min und 2200 rpm zentrifugiert. Es war wichtig zu beachten, dass alle drei Termine der Proband*innen am selben Tag analysiert wurden. Während der gesamten Labordurchführung lagen die GSH- und GSSG-Proben auf Eis.

Gleichzeitig wurde kontrolliert, ob der EDTA-Buffer den erwünschten pH-Wert von 8,0 hatte. Die tolerierten Schwankungen am pH-Meter lagen zwischen 8,0 und 8,08. Anschließend wurden OPA und NEM eingewogen, da die Herstellung der Lösungen jeden Tag frisch sein sollte. Für fünf zu analysierende Mikrotiterplatten benötigte man eine Einwaage von 4 mg OPA und 10 mg NEM. OPA wurde mit 4 ml Methanol unter der Abzugshaube vermengt, für die NEM-Lösung benötigte man zusätzliche 2 ml EDTA.

Der darauffolgende Schritt war die Kalibrierung der Verdünnungsreihen. Aus der GSH- und GSSG-Stocklösung, mit einer Konzentration von 1 mM, wurden die Standardreihen hergestellt. Der Konzentrationsbereich der Kalibrationsgerade lag zwischen 1,56 und 50 µM. Die OPA-, NEM- und Standardlösungen mussten, so wie die Proben, während der gesamten Messung auf Eis gelagert werden.

Im weiteren Verlauf wurden die Proben in GSH- und GSSG-Aliquote aufgeteilt. Dem folgend wurde aus den ursprünglichen Proben 70 µl Analyt für die GSSG-Messung in neue Eppis überführt, der Rest diente für die GSH-Bestimmungen.

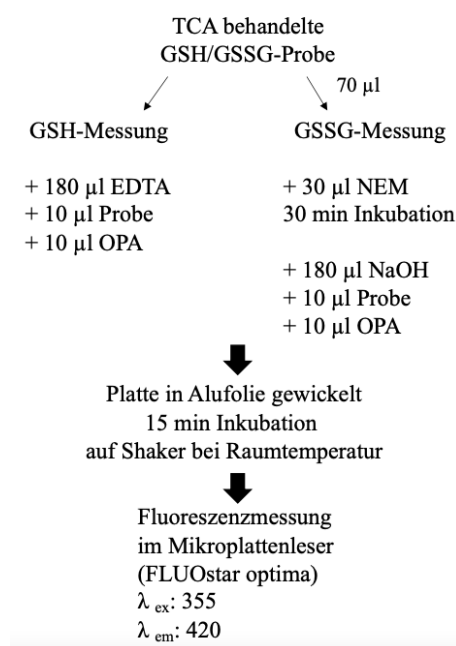


Abbildung 18: Zusammenfassung der jeweiligen GSH- und GSSG-Analyseschritte.

GSH-Analyse Proben, Standards sowie Kontrollen konnten bei der GSH-Messung direkt verwendet werden. Mit der Multipipette wurde in jedes Well der Mikrotiterplatte 180 µl EDTA hinzugefügt. Danach folgten die 10 µl Probe, Standard oder Kontrolle und anschließend 10 µl OPA.

GSSG-Analyse Bei der GSSG-Analyse wurden die 70 µl Aliquote zuerst mit jeweils 30 µl NEM vermischt, kurz gevortext und anschließend im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden alle GSSG-Analyte für die Hydrolyse mit 150 µl NaOH vermengt und wiederum kurz gevortext. Danach erst wurde die GSSG-Platte pipettiert. Jedes Well wurde mit 180 µl NaOH befüllt. Anschließend pipettierte man 10 µl Probe, Standard oder Kontrolle hinzu und zu guter Letzt folgten die 10 µl OPA.

Tabelle 27: GSH-Pipettierschema für die 96-well Befüllung.

Well-Befüllung	Standard	Positivkontrolle	Probe	Blank
EDTA	180 µl	180 µl	180 µl	180 µl
NaOH				
NEM				
OPA	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tabelle 28: GSSG-Pipettierschema für die 96-well Befüllung.

Well-Befüllung	Standard	Positivkontrolle	Probe	Blank
EDTA				
NaOH	180 µl	180 µl	180 µl	180 µl
NEM		30 µl	30 µl	
OPA	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Die fertig pipettierten GSH- und GSSG-Platten wurden nach der OPA-Befüllung in Alufolie eingewickelt und auf einem Shaker (Stärke 2) für 15 min bei Raumtemperatur sanft geschüttelt. Danach beförderte man die Platten direkt in den Mikroplattenleser.

Während der Inkubation der GSH-Platte wurde mit der Befüllung der GSSG-Platte begonnen. In Abbildung 19 und 20 sind die Layouts der GSH- und GSSG-Mikrotiterplatten dargestellt.

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

Abbildung 19: Layout der 96-well Mikrotiterplatten GSH. Standardreihe 1 - 7. Blank (Blindwert), Control (Kontrolle), Plasmaproben.

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

Abbildung 20: Layout der 96-well Mikrotiterplatten GSSG. Standardreihe 1 - 7. Blank (Blindwert), Control (Kontrolle), Plasmaproben.

3.6.7 Auswertung

Aus den jeweiligen Standardkurven (siehe Abb. 21) wurde mithilfe der ermittelten Extinktionswerte das oxidierte GSSG und reduzierte GSH in $\mu\text{mol/l}$ berechnet. Der Konzentrationsbereich der Standardlösungen lag zwischen $1,56 \mu\text{M}$ und $50 \mu\text{M}$. Hierbei musste wieder beachtet werden, dass die ermittelten Extinktionswerte der Blanks subtrahiert wurden. Anschließend konnte dann der in der GSH- und GSSG-Probe gemessene Wert in die Formel der Kalibrierungsgerade übertragen werden.

Berechnung der GSH/GSSG-Standardgerade:

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

y = Extinktion 350 nm und Emission 450 nm

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

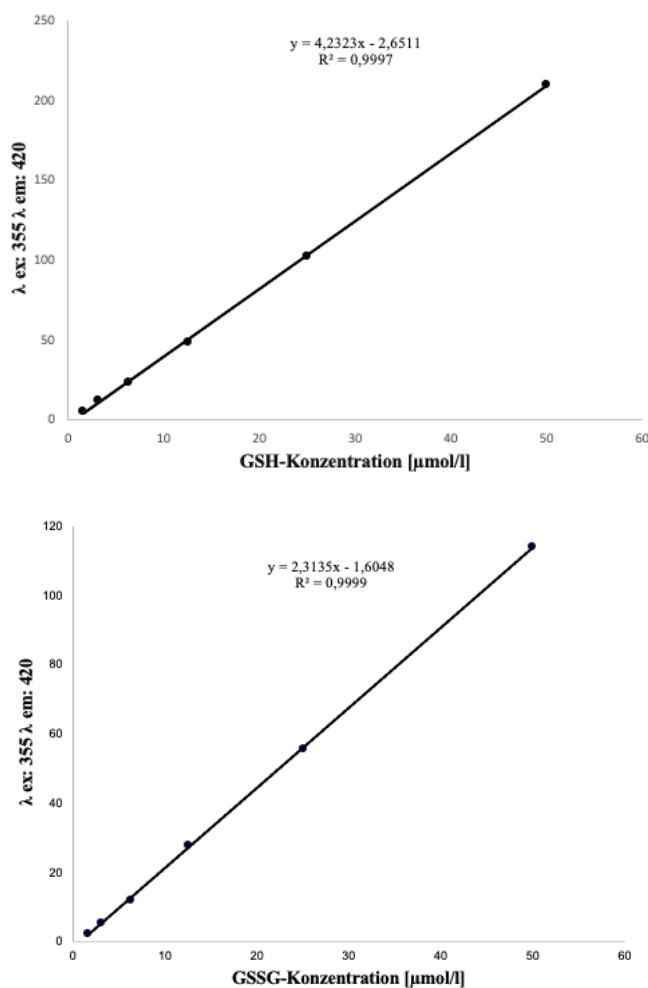


Abbildung 21: GSH- und GSSG-Standardgeraden zur Berechnung der Konzentrationen in $\mu\text{mol/l}$.

3.7 GSH/GSSG-Ratio

3.7.1 Berechnung GSH/GSSG-Ratio

Freies GSH liegt ausschließlich in einer Konzentration von 2 bis 20 µmol in fast allen Körperzellen (meist Erythrozyten) in seiner reduzierten Form vor (Giustarini et al., 2013). Das Enzym – die GSH-Reduktase – regeneriert das GSH, indem es GSSG zu GSH reduziert. Diese Wechselwirkung wird vor allem bei oxidativem Stress induziert und das Verhältnis von reduziertem zu oxidiertem GSH häufig als Marker für Zelltoxizität verwendet. In einer ruhenden Zelle liegt das Redoxpaar meist in einem Verhältnis von 100:1 vor. Es zeigte sich jedoch, dass in verschiedenen Modellen für oxidativen Stress das Verhältnis auf einen Wert von 10:1 auf 1:1 abnehmen kann (Zitka et al., 2012).

Da wir beide Parameter, GSH und GSSG, unabhängig voneinander im Blutplasma gemessen haben, wurde eine zusätzliche Berechnung der GSH/GSSG-Ratio in µmol/l durchgeführt. Das durchschnittliche Verhältnis lag in einem Bereich von 1,96 µmol/l, dies entspricht einem Verhältnis von ungefähr 1:2.

Berechnung der GSH/GSSG-Ratio:

$$\text{GSH/GSSG-Ratio } [\mu\text{mol/l}] = \text{GSH } [\mu\text{mol/l}] / \text{GSSG } [\mu\text{mol/l}]$$

3.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Messdaten erfolgte mithilfe von SPSS 27 für Mac. Durch die deskriptive Statistik ließ sich die Verteilung der Proband*innen nach Geschlecht und Intervention darstellen. Die Analyse beinhaltete drei Messzeitpunkte T1, T2 und T3. Eine Bereinigung der Messdaten von Ausreißern wurde mithilfe von Box-Plot Diagrammen durchgeführt. Um zu gewährleisten, dass alle zu untersuchenden Gruppen zu Beginn der Studie vergleichbar waren, erfolgte die Durchführung einer einfaktoriellen Varianzanalyse (Analysis of Variance, ANOVA) zu jeder abhängigen Variablen an T1. Die Darstellung der Normalverteilung innerhalb des Datensatzes geschah unter Zuhilfenahme des Kolmogorov-Smirnov-Tests sowie Histogrammen zur Unterstützung der grafischen Visualisierung. Obwohl die Voraussetzung der Normalverteilung nicht für alle Datensätze gegeben war, konnten ANOVA-Modelle angewendet werden, da diese als relativ robust gegenüber Verletzungen der Normalverteilungsannahme gelten (Field, 2017).

Die Effekte innerhalb der Gruppe ließen sich mithilfe einer mixed ANOVA und mixed ANCOVA (Analysis of Covariance) anhand der Messwiederholungen bewerten. Ein nach Bonferroni korrigierter Post-Hoc-Test sollte zeigen, ob es einen signifikanten Unterschied innerhalb der Interventionsgruppen gab oder nicht. Alle Testvoraussetzungen; Box-Test (Gleichheit der Kovarianzmatrizen), Mauchly-Test (Sphärizität) und Levene-Test (Varianzhomogenität) wurden durchgeführt und angenommen ($p > 0,05$).

Zusätzlich erfolgten bivariate Korrelationen mit Sekundärdaten aus vorherigen Analysen der NutriAging Protein Studie. Bei parametrischen Variablen zog man die Korrelation nach Pearson heran und bei nicht-parametrischen Variablen wurde die Korrelation nach Spearman durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ als signifikant, bei $p < 0,01$ als höchst signifikant und bei $p < 0,001$ als extrem signifikant angenommen.

Aufgrund der analytischen Zusammenarbeit mit Muriel Harloff erfolgt die statistische Auswertung geschlechterspezifisch. Infolgedessen beziehen sich die Ergebnisse dieser Masterthesis auf den männlichen Teil der Studienpopulation. Am Ende des Ergebnisteils wurden jedoch zusätzlich beide Geschlechter zum Vergleich angeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Ausgangswerte – Männer

Die Stichprobe wurde für die Analyse in Männer und Frauen aufgeteilt. Zum Messzeitpunkt T1 gab es insgesamt 140 Teilnehmer*innen, die wie folgt in drei Gruppen eingeteilt wurden.

Tabelle 29: Anzahl der Frauen und Männer zu Beginn der Studie.

Interventionsgruppe	weiblich	männlich	gesamt
K	27	23	50
Protein Low	21	20	41
Protein High	29	20	49
Gesamt	77	63	140

Die Gruppe der Männer wurde in vier Alterskategorien aufgeteilt. Die meisten Probanden mit jeweils 22 Teilnehmern waren zwischen 65 bis 69,9 und 70 bis 74,9 Jahre alt. Darauf folgte die Altersklasse 75 bis 79,9 Jahre mit 14 Probanden und zuletzt 7 Personen in der Alterskategorie 80 bis 85 Jahre. Da die Verteilung in den Altersgruppen sehr unterschiedlich sowie die Anzahl in den höheren Altersgruppen geringer war, wurden die Ergebnisse nicht nach den verschiedenen Altersklassen analysiert. Da es sich in dieser Masterarbeit nur um den männlichen Teil handelt und nur jene Probanden in die Analyse aufgenommen wurden, bei denen die Erhebung aller drei Untersuchungszeitpunkte (T1, T2, T3) stattfand, wurden letztendlich die Daten von 54 Probanden ausgewertet.

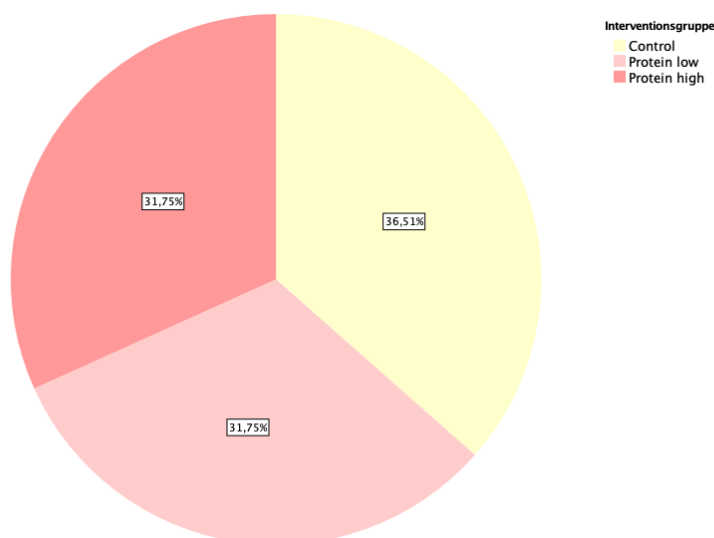


Abbildung 22: Aufteilung der Probanden in die Interventionsgruppen in %.

Das Kreisdiagramm (siehe Abb. 22) soll die prozentuelle Verteilung der Teilnehmer der ausgewerteten Gruppen nochmals deutlich machen. Zu erkennen ist, dass die Verteilung zwischen den Gruppen sehr einheitlich war.

Die drei Gruppen zeigten zum ersten Messzeitpunkt T1 keine signifikanten Unterschiede in den Parametern FRAP, GSH, GSSG und GSG/GSSG-Ratio sowie weiteren wichtigen Parametern (siehe Tab. 30), wodurch von einer Vergleichbarkeit der Gruppen ausgegangen werden kann.

Tabelle 30: Mittelwerte ausgewählter Parameter zum Zeitpunkt T1.

Parameter	K-Gruppe	PL-Gruppe	PH-Gruppe	p-Wert
FRAP [$\mu\text{mol/l}$]	1234 ± 185	1219 ± 166	$1278 \pm 169,03$	0,554
GSH [$\mu\text{mol/l}$]	$16,77 \pm 3,68$	$17 \pm 3,56$	$17,42 \pm 4,56$	0,862
GSSG [$\mu\text{mol/l}$]	$8,61 \pm 1,53$	$8,62 \pm 1,14$	$8,85 \pm 1,39$	0,837
GSH_GSSG-Ratio	$1,96 \pm 0,37$	$1,97 \pm 0,31$	$1,98 \pm 0,43$	0,984
BMI [kg/m^2]	$26,01 \pm 3,62$	$27,52 \pm 4,4$	$26,46 \pm 2,59$	0,415
Muskelmasse [kg]	$32 \pm 3,54$	$33,72 \pm 4,81$	$31,77 \pm 4$	0,353
Protein [g/kg BW/d]	$0,8 \pm 0,27$	$1 \pm 0,25$	$0,89 \pm 0,3$	0,122

Um zu überprüfen, ob die unterschiedliche Ernährungsintervention der Studienteilnehmer erfolgreich war, wurde die Proteinaufnahme der verschiedenen Gruppen mithilfe von 24-h-Recalls erhoben und verglichen.

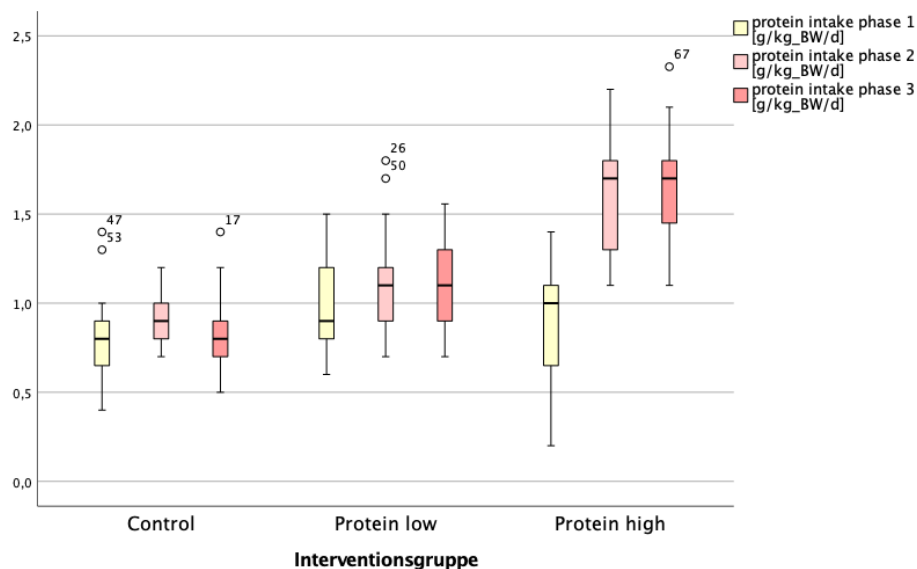


Abbildung 24: Proteinaufnahme in g/kg BW/d in den Gruppen zu den Zeitpunkten T1, T2 und T3 bei den Männern.

Der Unterschied innerhalb der Gruppen war für die Variable Interventionsgruppe signifikant. Dieser Haupteffekt war zeitabhängig ($p = 0,001$), wie in der Studie beabsichtigt.

4.2 FRAP – Männer

Tabelle 31: Durchschnittliche FRAP-Konzentrationen in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3. Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$.

Gruppe	FRAP 1 [$\mu\text{mol/l}$]	FRAP 2 [$\mu\text{mol/l}$]	FRAP 3 [$\mu\text{mol/l}$]
K	1240 $\pm$ 185	1239 $\pm$ 169	1193 $\pm$ 159
PL	1219 $\pm$ 166	1120 $\pm$ 157	1183 $\pm$ 184
PH	1278 $\pm$ 169	1143 $\pm$ 156	1127 $\pm$ 89

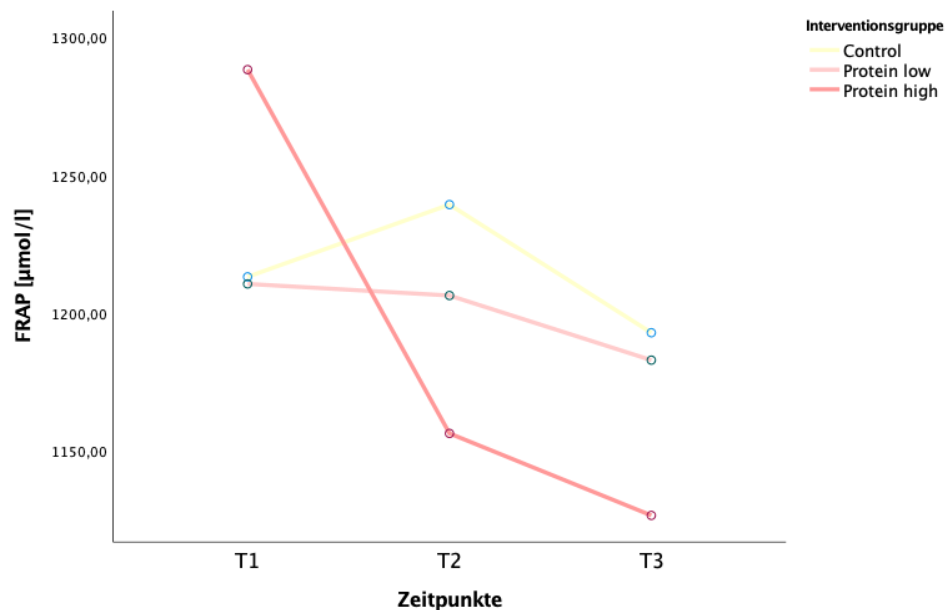


Abbildung 25: Verlauf der FRAP-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 bei den Männern.

In der grafischen Darstellung (Abb. 25) kann man deutlich beobachten, dass es zu einer Reduktion der FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] speziell in der PL- und PH-Gruppe kam. Besonders auffallend war die FRAP-Reduktion in der PH-Gruppe, die zwischen den Messzeitpunkten T1 und T2 ca. 11 % betrug.

Tabelle 32: Innersubjekt- und Zwischensubjekteffekte von FRAP im Studienverlauf.

Testverfahren	Variabel	p-Wert
Innersubjekteffekt	Zeit	0,003*
	Zeit * Interventionsgruppe	0,005*
Zwischensubjekteffekt	Interventionsgruppe	0,862

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

Der statistische Test (mixed ANOVA) zeigte, dass es einen Interaktionseffekt ($p = 0,005$) zwischen den beiden Haupteffekten, der Zeit und der Interventionsgruppe gab. Daraus folgt, dass der zeitliche Studienverlauf und die Intervention der erhöhten Proteinzufuhr sowie das zusätzliche Krafttraining nach acht Wochen einen signifikanten Einfluss auf die antioxidative Gesamtkapazität der Probanden hatten.

Wie zu erwarten, blieb die FRAP-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] in der K-Gruppe über die Messzeitpunkte konstant ($p = 0,90$). In der PL-Gruppe zeigte sich aufgrund der erhobenen Mittelwerte eine Tendenz zur Verringerung der FRAP-Werte (siehe Tab. 31), diese fiel jedoch nicht signifikant aus ($p = 0,679$).

Es gab lediglich einen signifikanten Unterschied ($p = 0,001$) in der PH-Gruppe zwischen den drei Messzeitpunkten. Ein paarweiser Vergleich nach Bonferroni zeigte im Detail, dass es zwischen den Messzeitpunkten T1 und T2 ($p = 0,002$) bzw. T1 und T3 ($p = 0,005$) einen signifikanten Unterschied gab. Hierbei kam es zwischen T1 und T2, also während der erhöhten Proteinzufuhr [2g/kg/KG/d], zu einer Reduktion des FRAP-Wertes (siehe Tab.33). Zwischen T1 und T3 erfolgte das zusätzliche achtwöchige Krafttraining.

Tabelle 33: FRAP zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 in der PH-Gruppe.

Gruppe	Messzeitpunkt (1)	Messzeitpunkt (2)	p-Wert
PH	T1	T2	0,002*
		T3	0,005*
	T2	T3	1,00

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

4.2.1 FRAP-Korrelationen – Männer

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der FRAP-Kapazität und verschiedenen Parametern aus schon existierendem Datenmaterial der Probanden zu bewerten, wurden bivariate Korrelationen zu T1, T2 und T3 berechnet.

FRAP und anthropometrische Messungen – T1

Tabelle 34: Korrelationen zwischen FRAP und anthropometrischen Messungen zum Zeitpunkt T1.

Paramater	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
BMI [kg/m ²]	0,422**	0,001
FFM [kg]	0,415**	0,001
Muskelmasse [kg]	0,274*	0,039
Fettmasse [kg]	0,532**	0,001

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

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

Die Ergebnisse zeigten (siehe Tab. 34), dass es einen positiven Zusammenhang zwischen dem FRAP-Wert und den Parametern BMI [kg/m²] ($r = 0,422$; $p = 0,001$), FFM [kg] ($r = 0,415$; $p = 0,001$) und der Fettmasse [kg] ($r = 0,532$; $p = 0,001$) zu Beginn der Studie gab. Die Muskelmasse [kg] wies zusätzlich einen leicht signifikanten Zusammenhang ($r = 0,274$; $p = 0,039$) bei den Probanden auf (siehe Abb. 26).

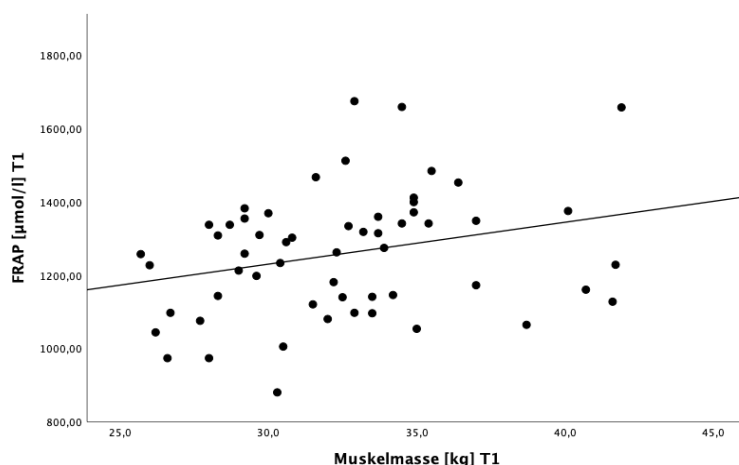


Abbildung 26: Korrelation zwischen FRAP [μmol/l] und der Muskelmasse [kg] zum Zeitpunkt T1.

FRAP und Proteinzufuhr – T1, T2, T3

Tabelle 35: Korrelationen zwischen FRAP und der Proteinzufuhr aller Gruppen zum Zeitpunkt T1, T2 und T3.

Parameter	Gruppe	Messzeitpunkt	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Proteinzufuhr [g/kg BW/d]	K	T1	0,072	0,770
		T2	0,171	0,483
		T3	-0,375	0,113
	PL	T1	0,140	0,578
		T2	-0,001	0,998
		T3	0,084	0,748
	PH	T1	-0,278	0,235
		T2	0,054	0,825
		T3	0,171	0,497

Der Tabelle 35 ist zu entnehmen, dass die beiden Parameter FRAP und Proteinzufuhr im Studienverlauf nicht korrelierten. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang durch die unterschiedlichen Interventionen der Proteinzufuhr beobachtet werden.

FRAP und antioxidativ wirksame Substanzen – T1, T2 und T3

Tabelle 36: Korrelation zwischen FRAP und Harnsäure zum Zeitpunkt T1.

Parameter	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Harnsäure [mg/dl]	0,907**	0.001

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

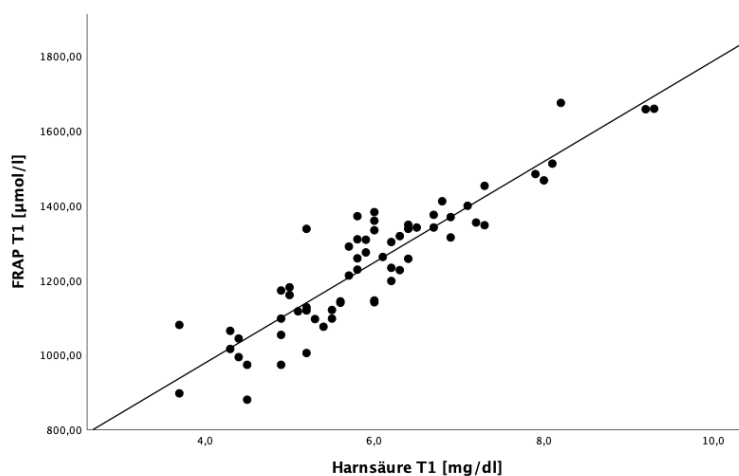


Abbildung 27: Korrelation zwischen FRAP [μmol/l] und Harnsäure [mg/dl] zum Zeitpunkt T1.

Abbildung 27 stellt dar, dass es einen starken positiven Zusammenhang ($r = 0,907$; $p = 0.001$) zwischen dem Harnsäure-Spiegel [mg/dl] und den gemessenen FRAP-Daten zu Beginn der Studie gab.

Tabelle 37: Korrelationen zwischen FRAP und Harnsäure bei allen Gruppen zum Zeitpunkt T1, T2 und T3.

Parameter	Gruppe	Messzeitpunkt	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Harnsäure [mg/dl]	K	T1	0,924**	0,001
		T2	0,898**	0,001
		T3	0,712**	0,001
	PL	T1	0,868**	0,001
		T2	0,902**	0,001
		T3	0,919**	0,001
	PH	T1	0,931**	0,001
		T2	0,898**	0,001
		T3	0,147	0,561

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

Aus Tabelle 37 ergibt sich, dass die signifikanten Zusammenhänge ($p < 0,001$) in allen drei Gruppen auftraten, mit Ausnahme zu Zeitpunkt T3 in der PH-Gruppe ($r = 0,147$; $p = 0,561$), nachdem die Probanden eine 16-wöchige erhöhte Proteinzufuhr [1,6 g/kg/KG/d] sowie das achtwöchige Krafttraining absolviert hatten.

FRAP und funktionelle Parameter – T1

Tabelle 38: Korrelationen zwischen FRAP und den funktionellen Parametern bei allen Gruppen zum Zeitpunkt T1.

Parameter	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Handgrip strength dominant [kg]	-0,009	0,947
Handgrip strength non-dominant [kg]	-0,081	0,528
30-s chair stand [s]	-0,173	0,181
Timed Up & Go [s]	0,391**	0,002
6 min walk [m]	-0,307*	0,015

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

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

Gleichmaßen wurde untersucht, ob die funktionellen Parameter mit den durchschnittlichen FRAP-Werten korrelierten. Hierbei fand die Bewertung zu Messzeitpunkt T1 statt. Auffallend

war die positive Korrelation ($r = 0,391$; $p = 0,002$) beim Timed Up & Go-Test, da der Mobilitätstest eine Beurteilung von Muskelkraft, Gelenkfunktion und Gleichgewicht erlaubt. Des Weiteren konnte man beim Ergebnis des 6-min-Walk-Tests einen negativen Zusammenhang ($r = -0,307$; $p = 0,015$) feststellen.

Die bivariaten Korrelationen der funktionellen Parameter wurden auch innerhalb der K-, PL- und PH-Gruppe analysiert, um festzustellen, ob es Zusammenhänge gab. Hier zeigten sich jedoch keine signifikanten oder relevanten Zusammenhänge.

4.3 GSH – Männer

Tabelle 39: Durchschnittliche GSH-Konzentrationen in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3. Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$.

Gruppe	GSH 1 [$\mu\text{mol/l}$]	GSH 2 [$\mu\text{mol/l}$]	GSH 3 [$\mu\text{mol/l}$]
K	$16,77 \pm 3,68$	$16,47 \pm 3,09$	$16,83 \pm 3,69$
PL	$17 \pm 3,56$	$16,37 \pm 2,48$	$17,07 \pm 2,64$
PH	$17,42 \pm 4,56$	$15,99 \pm 2,79$	$16,12 \pm 3,10$

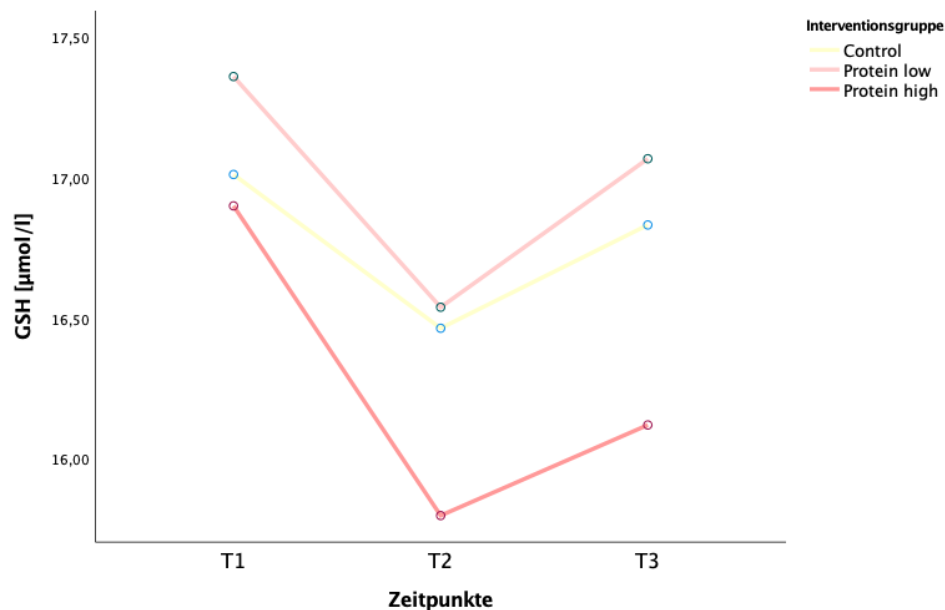


Abbildung 28: Verlauf der GSH-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 bei den Männern.

Aus Abbildung 28 geht hervor, dass sich die GSH-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] im Laufe der Studie leicht veränderten. Es ist ersichtlich, dass es in allen drei Gruppen einen Konzentrationsabfall zwischen den Messzeitpunkten T1 und T2 und im nachfolgenden einen Anstieg der Konzentrationen zwischen den Untersuchungszeitpunkten T2 und T3 gab. In der PH-Gruppe waren die Schwankungen der GSH-Werte am auffälligsten. Zwischen GSH 1 und GSH 2 reduzierte sich der Wert um ca. 8 %.

Die statistische Auswertung (mixed ANOVA) zeigte jedoch keine signifikante Interaktion ($p = 0,930$) zwischen den beiden Haupteffekten, den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten sowie der Protein- und Krafttrainingsintervention, die sich auf die GSH-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] auswirkten. Getrennt betrachtet trat auch kein signifikanter

Haupteffekt ($p = 0,777$) der verschiedenen Interventionen sowie kein signifikantes Niveau ($p = 0,062$) beim zeitlichen Ablauf der Studie auf.

Tabelle 40: Innersubjekt- und Zwischensubjekteffekte von GSH im Studienverlauf.

Testverfahren	Variabel	p-Wert
Innersubjekteffekt	Zeit	0,062
	Zeit * Interventionsgruppe	0,930
Zwischensubjekteffekt	Interventionsgruppe	0,777

4.4 GSSG – Männer

Tabelle 41: Durchschnittliche GSSG-Konzentrationen in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2, T3. Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$.

Gruppe	GSSG 1 [$\mu\text{mol/l}$]	GSSG 2 [$\mu\text{mol/l}$]	GSSG 3 [$\mu\text{mol/l}$]
K	$8,62 \pm 1,53$	$8,63 \pm 1,01$	$8,82 \pm 1,01$
PL	$8,62 \pm 1,14$	$8,85 \pm 0,94$	$9,22 \pm 1,23$
PH	$8,85 \pm 1,51$	$8,28 \pm 1,10$	$8,24 \pm 1,11$

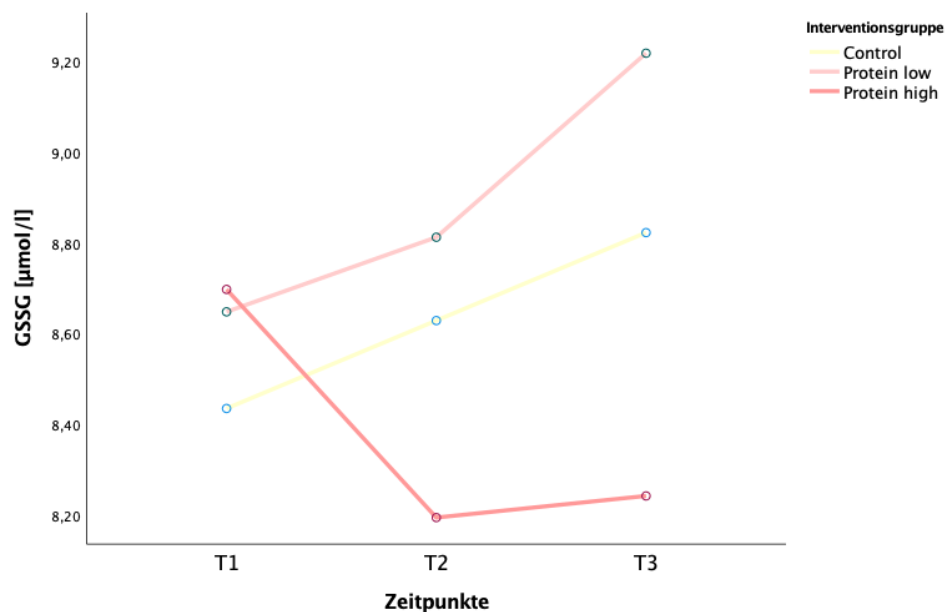


Abbildung 29: Verlauf der GSSG-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 bei den Männern.

Das Diagramm (siehe Abb. 29) gibt Auskunft darüber, wie sich die GSSG-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] während der Studie veränderten. In der K-Gruppe blieben die Konzentrationen wie

erwartet konstant, es gab lediglich einen leichten Anstieg zwischen den Werten GSSG 2 und GSSG 3. In der PL-Gruppe zeigte sich zwischen allen drei Messzeitpunkten eine Konzentrationserhöhung. Besonders zwischen den Untersuchungszeitpunkten T2 und T3 erfolgte ein Anstieg von ungefähr 4,5 %. Wohingegen sich in der PH-Gruppe die GSSG-Werte von T1 bis T3 durch ein Absinken der Konzentrationen bemerkbar machten. Ein etwas stärkerer Abfall von 6 % war zwischen den Messzeitpunkten T1 und T2 auffallend.

Aus der Statistik (mixed ANOVA) wird ersichtlich, dass es auch beim antioxidativen Parameter GSSG zu keinem Interaktionseffekt ($p = 0,096$) kam oder sich ein signifikanter Einfluss ($p = 0,373$) bezüglich des zeitlichen Verlaufs der Studie feststellen ließe. Ebenso wenig zeigten die unterschiedlichen Interventionen eine zusätzliche signifikante Wirkung ($p = 0,300$) auf die GSSG-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$].

Tabelle 42: Innersubjekt- und Zwischensubjekteffekte von GSSG im Studienverlauf.

<u>Testverfahren</u>	<u>Variabel</u>	<u>p-Wert</u>
Innersubjekteffekt	Zeit	0,373
	Zeit * Interventionsgruppe	0,096
<u>Zwischensubjekteffekt</u>	<u>Interventionsgruppe</u>	<u>0,300</u>

4.5 GSH/GSSG-Ratio – Männer

Tabelle 43: Durchschnittliche GSH/GSSG-Ratio in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2, T3. Angabe des Mittelwertes und Standardabweichung.

Gruppe	GSH/GSSG-Ratio 1	GSH/GSSG-Ratio 2	GSH/GSSG-Ratio 3
K	1,96 ± 0,37	1,91 ± 0,31	1,9 ± 0,28
PL	1,97 ± 0,31	1,85 ± 0,23	1,87 ± 0,29
PH	1,98 ± 0,43	1,94 ± 0,3	1,97 ± 0,35

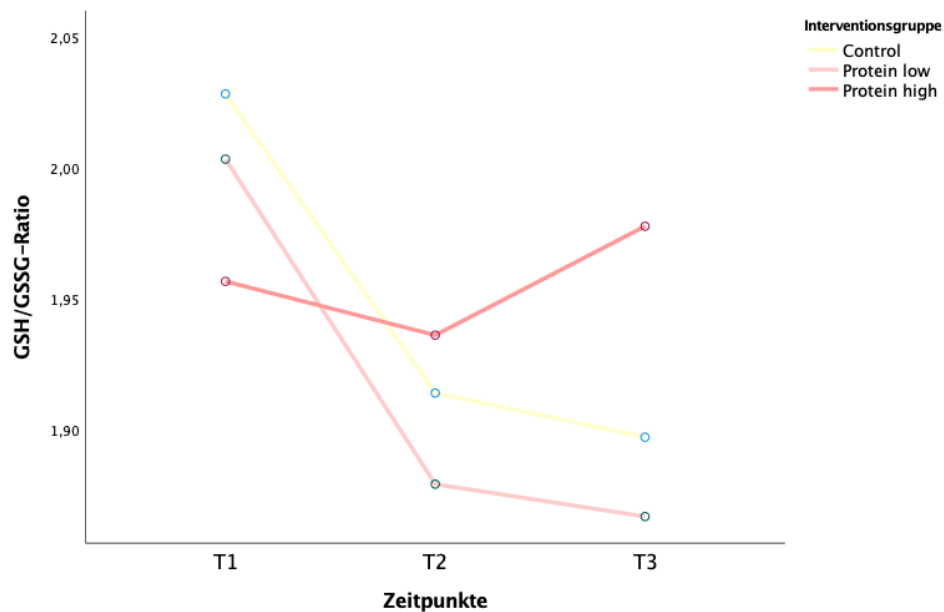


Abbildung 30: Verlauf der GSH/GSSG-Ratio in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 bei den Männern.

In Abbildung 30 ist zu sehen, dass sich die Werte der GSH/GSSG-Ratio in einem Bereich von 1,85 bis 1,98 nur leicht veränderten.

In der K-Gruppe blieben die Verhältnisse konstant, es gab lediglich einen leichten Unterschied zwischen GSH/GSSG-Ratio 1 und GSH/GSSG-Ratio 2, der sich durch einen Konzentrationsabfall bemerkbar machte. In der PL-Gruppe kam es zu einer Reduktion von 6 % zwischen den Messzeitpunkten T1 und T2, der sich leicht bis zum letzten Messzeitpunkt T3 erhöhte. In der PH-Gruppe ließen sich ähnliche Beobachtungen anstellen, allerdings waren hier die Veränderungen der GSH/GSSG-Ratio nicht so stark ausgeprägt wie jene der PL-Gruppe.

Der statistische Test (mixed ANOVA) liefert Informationen darüber, dass die Interventionen der Gruppen ($p = 0,893$) und der zeitliche Ablauf der Studie ($p = 0,069$) auf das GSH/GSSG-Verhältnis keinen signifikanten Einfluss hatten, sodass es auch zu keinem signifikanten Interaktionseffekt ($p = 0,522$) zwischen den beiden Variablen Zeit und Gruppe während der Studie kam.

Tabelle 44: Innersubjekt- und Zwischensubjekteffekte des GSH/GSSG-Ratio im Studienverlauf.

Testverfahren	Variabel	p-Wert
Innersubjekteffekt	Zeit	0,069
	Zeit * Interventionsgruppe	0,522
Zwischensubjekteffekt	Interventionsgruppe	0,893

4.5.1 GSH/GSSG-Ratio-Korrelationen – Männer

Wie zuvor wurden auch hier mögliche Zusammenhänge der GSH/GSSG-Ratio mit weiteren Parametern betrachtet.

GSH/GSSG-Ratio und Alter – T1

Tabelle 45: Korrelation zwischen GSH/GSSG-Ratio und dem Alter [Jahre] zum Zeitpunkt T1.

Paramater	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Alter [Jahre]	-0,328**	0,008

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

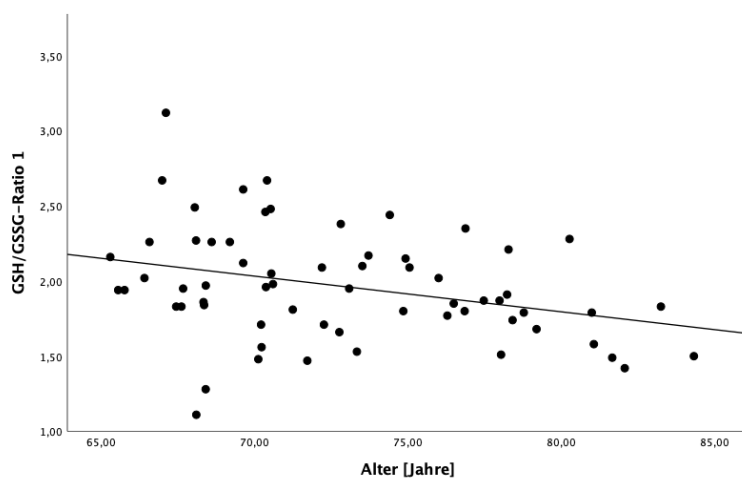


Abbildung 31: Korrelation zwischen GSH/GSSG-Ratio und dem Alter [Jahre] zum Zeitpunkt T1.

Zum Messzeitpunkt T1 konnte eine signifikante Korrelation ($r = -0,328$; $p = 0,008$) zwischen dem Alter und der GSH/GSSG-Ratio beobachtet werden (siehe Tab. 45). Je älter die Probanden waren, desto geringer war die GSH/GSSG-Ratio.

4.6 FRAP – gesamte Kohorte

Tabelle 46: Durchschnittliche FRAP-Konzentrationen in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3. Mittelwert und Standardabweichung in $\mu\text{mol/l}$.

Gruppe (n)	Geschlecht	FRAP 1 [$\mu\text{mol/l}$]	FRAP 2 [$\mu\text{mol/l}$]	FRAP 3 [$\mu\text{mol/l}$]
K	gesamt	1209 $\pm$ 203	1186 $\pm$ 183	1163 $\pm$ 172
	männlich	1234 $\pm$ 185	1239 $\pm$ 169	1193 $\pm$ 159
	weiblich	1183 $\pm$ 218	1146 $\pm$ 187	1140 $\pm$ 181
PL	gesamt	1171 $\pm$ 169	1140 $\pm$ 154	1143 $\pm$ 156
	männlich	1219 $\pm$ 166	1120 $\pm$ 157	1183 $\pm$ 184
	weiblich	1125 $\pm$ 162	1083 $\pm$ 130	1106 $\pm$ 120
PH	gesamt	1174 $\pm$ 197	1061 $\pm$ 178	1029 $\pm$ 167
	männlich	1278 $\pm$ 169	1143 $\pm$ 156	1127 $\pm$ 89
	weiblich	1103 $\pm$ 186	996 $\pm$ 170	958 $\pm$ 168

Trennt man die Ergebnisse geschlechterspezifisch auf, kann man in allen drei Gruppen beobachten, dass die FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] bei den Frauen geringer ausfielen als bei den Männern (siehe Tab 46). In der PH-Gruppe war zum Untersuchungszeitpunkt T2 eine Differenz von 12 % zwischen beiden Geschlechtern zu beobachten, am T3 lag der Unterschied sogar bei ca. 15 %.

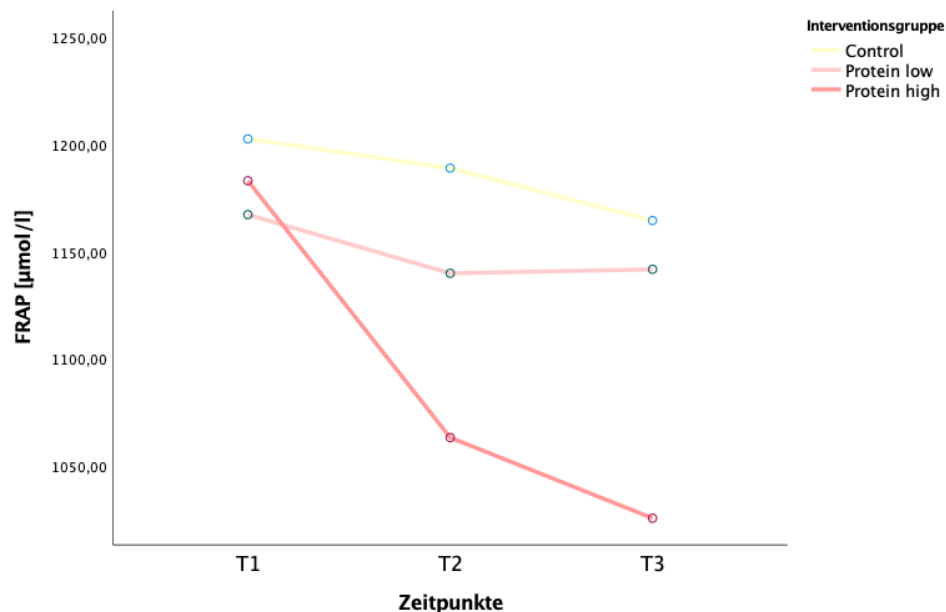


Abbildung 32: Verlauf der FRAP-Konzentration in $\mu\text{mol/l}$ in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 in Bezug auf beide Geschlechter.

Aus Abbildung 32 geht hervor, dass es zu einem starken Abfall der FRAP-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] im Verlauf der Studie, vor allem in der PH-Gruppe bei beiden Geschlechtern kam.

Tabelle 47: Innersubjekt- und Zwischensubjekteffekte von FRAP im Studienverlauf.

Testverfahren	Variabel	p-Wert
Innersubjekteffekt	Zeit	0,001
	Zeit * Interventionsgruppe	0,115
	Zeit * Geschlecht	0,429
	Zeit * Interventionsgruppe *	
	Geschlecht	0,581
Zwischensubjekteffekt	Interventionsgruppe	0,006
	Geschlecht	0,001
	Interventionsgruppe * Geschlecht	0,289

Dies wird auch aus der statistischen Auswertung ersichtlich. Der durchgeführte Test (mixed ANCOVA) weist zwar keinen signifikanten Interaktionseffekt zwischen den Effekten, dem zeitlichen Ablauf der Studie, den verschiedenen Interventionen der Gruppen sowie geschlechterspezifischen Unterschieden auf. Es sind allerdings einzelne signifikante Haupteffekte zu beobachten.

Innerhalb der Gruppen gab es, wie erwartet, zu Messzeitpunkt T1 keinen Unterschied ($p = 1,000$) zwischen den FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$]. Zu Messtermin T2 bestand eine signifikante Differenz ($p = 0,003$) der T2-FRAP-Werte zwischen der K- und PH-Gruppe. Zum Untersuchungszeitpunkt T3 wurden zusätzlich signifikante Unterscheidungen zwischen der K- und PH- Gruppe ($p = 0,001$) sowie zwischen den beiden Interventionsgruppen PL und PH ($p = 0,011$) beobachtet.

Geschlechterspezifische Unterschiede stellte man in der PL- ($p = 0,041$) und PH-Gruppe ($p = 0,001$) fest. Wie bereits erwähnt, war die FRAP-Konzentration beim Frauenanteil in den Interventionsgruppen deutlich vermindert.

Tabelle 48: FRAP zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 in der PH-Gruppe.

Gruppe	Messzeitpunkt (1)	Messzeitpunkt (2)	p-Wert
PH	T1	T2	0,001*
		T3	0,001*
	T2	T3	0,421

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

Wie bei den männlichen Teilnehmern zeigte ein paarweiser Vergleich nach Bonferroni, dass es zwischen den Messzeitpunkten T1 und T2 bzw. T1 und T3 einen signifikanten Unterschied (beide $p = 0,001$) in der PH-Gruppe gab. Hierbei kam es zwischen T1 und T2 während der erhöhten Proteinzufuhr von 1,6 g/kg/KG/d zu einer Reduktion des FRAP-Wertes. Beim T3, als das zusätzliche achtwöchige Krafttraining stattfand, kam es zu einer weiteren Verringerung des FRAP-Wertes gegenüber T1 (siehe Tab. 48). In der K- und PL-Gruppe wies der p-Wert der einzelnen Messzeitpunkte keine Signifikanz auf.

4.6.1 FRAP-Korrelationen – gesamte Kohorte

FRAP und anthropometrische Messungen – T1

Tabelle 49: Korrelationen zwischen FRAP und anthropometrischen Markern der Gesamtgruppe zum Zeitpunkt T1.

Parameter	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
BMI [kg/m ²]	0,383**	0,001
Fettfreie Körpermasse [kg]	0,403**	0,001
Muskelmasse [kg]	0,383**	0,001
Fettmasse [kg]	0,285**	0,001

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

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

Die Ergebnisse zeigen (Tab. 49), dass es einen positiven Zusammenhang zwischen dem FRAP-Wert und den Parametern BMI [kg/m²] ($r = 0,383$; $p = 0,001$), FFM [kg] ($r = 0,403$; $p = 0,001$), Muskelmasse [kg] ($r = 0,383$; $p = 0,001$) und der Fettmasse [kg] ($r = 0,285$; $p = 0,001$) zu Beginn der Studie in der gesamten Stichprobe gab.

FRAP und funktionelle Parameter – T1

Tabelle 50: Korrelationen zwischen FRAP und den funktionellen Parametern der Gesamtgruppe zum Zeitpunkt T1.

Parameter	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Handgrip strength dominant [kg]	0,217**	0,009
Handgrip strength non-dominant [kg]	0,136	0,115
30-s chair stand [s]	0,006	0,943
Timed Up & Go [s]	0,215*	0,011
6 min walk [m]	-0,135	0,114

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

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

Zusätzlich wurde auch in der gesamten Stichprobe untersucht, ob die funktionellen Parameter mit den durchschnittlichen FRAP-Werten korrelierten. Hierbei fand die Untersuchung nur für Messzeitpunkt T1 statt. Auffallend waren die positiven Korrelationen beim Handgrip strength dominant-Test ($r = 0,217$; $p = 0,009$), da dieser Test für Kraft, Ausdauer, Koordination und Beweglichkeit steht. Des Weiteren konnte beim Ergebnis für den Timed Up & Go-Tests ein signifikanter Zusammenhang ($r = 0,215$; $p = 0,011$) festgestellt werden.

FRAP und funktionelle Parameter – T1, T2, T3

Tabelle 51: Korrelationen zwischen FRAP und den funktionellen Parametern innerhalb der PL- und PH-Gesamtgruppen zu den Zeitpunkten T1, T2 und T3.

Parameter	Gruppe	Messzeitpunkt	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Handgrip strength dominant [kg]	PH	T1	0,370**	0,009
		T2	0,367*	0,018
		T3	0,419**	0,008
Handgrip strength Non dominant [kg]	PH	T1	0,278	0,71
		T2	0,353*	0,022
		T3	0,406*	0,010

Wie zuvor wurden die bivariaten Korrelationen der funktionellen Parameter – auch innerhalb der Gruppen – analysiert, um festzustellen, ob die Interventionen der K-, PL- und PH-Gruppe mit den Mobilitätstest korrelieren. Dabei stellte man Veränderungen fest, die durch die PH-

Interventionen hervorgerufen wurden. Beide Tests (siehe Tab. 51), die für die Analyse der Handkraft durchgeführt wurden, korrelierten ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$) in der PH-Gruppe mit der antioxidativen Gesamtkapazität.

4.7 GSH/GSSG-Ratio – gesamte Kohorte

Tabelle 52: Durchschnittliche GSH/GSSG-Ratio in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3. Angabe des Mittelwertes und Standardabweichung.

Gruppe	Geschlecht	GSH/GSSG-Ratio-1	GSH/GSSG-Ratio-2	GSH/GSSG-Ratio-3
K	gesamt	1,93 ± 0,34	1,96 ± 0,36	1,9 ± 0,35
	männlich	1,96 ± 0,37	1,91 ± 0,31	1,9 ± 0,28
	weiblich	1,91 ± 0,31	1,99 ± 0,4	1,9 ± 0,4
PL	gesamt	2,07 ± 0,31	2 ± 0,4	1,97 ± 0,33
	männlich	1,97 ± 0,31	1,85 ± 0,23	1,87 ± 0,29
	weiblich	2,16 ± 0,29	2,15 ± 0,47	2,07 ± 0,35
PH	gesamt	2 ± 0,38	1,95 ± 0,28	1,96 ± 0,32
	männlich	1,98 ± 0,43	1,94 ± 0,3	1,97 ± 0,35
	weiblich	2,01 ± 0,35	1,97 ± 0,27	1,94 ± 0,31

Tabelle 52 ist zu entnehmen, dass die geschlechterspezifische Trennung in der K-, PL- und PH-Gruppe keine Auffälligkeiten erkennen ließ. Die GSH/GSSG-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] wiesen zu allen drei Messterminen (T1, T2, T3) keine auffälligen Unterschiede auf.

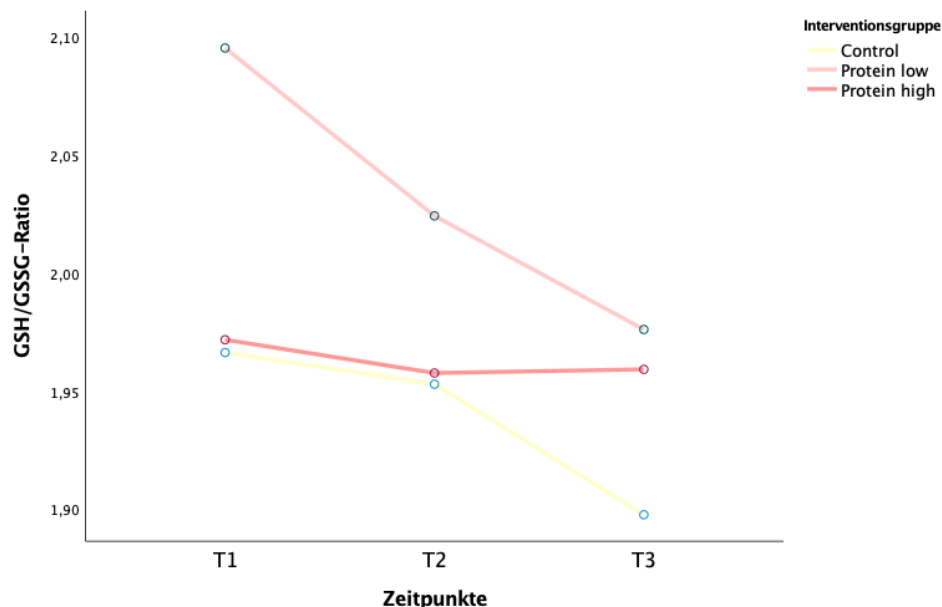


Abbildung 33: Verlauf der GSH/GSSG-Ratio in allen drei Gruppen zu den Messzeitpunkten T1, T2 und T3 in Bezug auf beide Geschlechter.

Abbildung 33 zeigt, dass die höchste Ratio zu allen Messzeitpunkten in der PL-Gruppe gemessen wurde. In der K- und PH-Gruppe war der Konzentrationsverlauf zwischen T1 und T2 des GSH/GSSG-Verhältnisses sehr ähnlich, verlief jedoch nach dem Messzeitpunkt T2 in verschiedene Richtungen, da es zu einem leichtem Abfall in der K-Gruppe kam.

Der statistische Test (mixed ANCOVA) lieferte Informationen darüber, dass es zu keiner signifikanten Interaktion ($p > 0,05$) zwischen dem zeitlichen Ablauf, dem Geschlecht und der Intervention der Gruppen kam. Bei den einzelnen Haupteffekten wurde zusätzlich kein signifikantes Ergebnis ($p > 0,05$) beobachtet.

Tabelle 53: Innersubjekt- und Zwischensubjekteffekte des GSH/GSSG-Ratio im Studienverlauf.

Testverfahren	Variabel	p-Wert
Innersubjekteffekt	Zeit	0,229
	Zeit * Interventionsgruppe	0,815
	Zeit * Geschlecht	0,234
	Zeit * Interventionsgruppe *	
	Geschlecht	0,728
Zwischensubjekteffekt	Interventionsgruppe	0,062
	Geschlecht	0,175
	Interventionsgruppe * Geschlecht	0,159

4.7.1 GSH/GSSG-Ratio-Korrelationen – gesamte Kohorte

GSH/GSSG-Ratio und Alter – T1

Tabelle 54: Korrelationen zwischen GSH/GSSG-Ratio und dem Alter in der Gesamtgruppe zum Zeitpunkt T1.

Parameter	Geschlecht	Korrelationskoeffizient (r)	p-Wert
Alter [Jahre]	weiblich	0,050	0,669
	männlich	-0,328**	0,008
	beide Geschlechter	-0,117	0,167

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

Zum Untersuchungszeitpunkt T1 konnte eine negative Korrelation ($r = -0,328$; $p = 0,008$) zwischen dem Alter und der GSH/GSSG-Ratio bei den Männern beobachtet werden (siehe

Tab. 54). Wenn nur die Frauen ($r = 0,050$; $p = 0,669$) oder beide Geschlechter ($r = -0,117$; $p = 0,167$) analysiert wurden, war dieser Zusammenhang nicht mehr zu beobachten.

Da die einzelnen Parameter GSH und GSSG keine statistisch relevanten Ergebnisse in der gesamten Stichprobe lieferten, wurde auf weitere Ausführungen verzichtet und stattdessen nur das Verhältnis beider Thiole veranschaulicht.

5 Diskussion

Die vorliegende Masterarbeit befasst sich mit der Fragestellung, ob eine erhöhte Protein- und Krafttrainingsintervention einen Einfluss auf das antioxidative Potenzial bei älteren Personen aufweist. Es handelt sich bei dieser empirischen Arbeit um einen Teil der NutriAging Studie.

Die Berechnung des antioxidativen Potenzials erfolgte über photometrische Bestimmungen der antioxidativen Parameter FRAP, GSH, GSSG und der daraus resultierenden GSH/GSSG-Ratio.

In den letzten Jahren erschienen einige klinische Studien, die sich mit den Auswirkungen einer erhöhten Protein- und Bewegungsintervention auf das antioxidative System bei älteren Menschen beschäftigt haben. Die erhöhte Proteinzufuhr erfolgte hier jedoch meistens durch Supplementierungen (Nabuco et al., 2019) und nicht durch eine herkömmliche Nahrungszufuhr mit ausgewählten proteinreichen Lebensmitteln wie in der vorliegenden Studie. Außerdem wurde das antioxidative Potenzial meist durch oxidative Schädigungen von RONS gemessen (Franzke et al., 2015) oder durch Enzyme des antioxidativen Schutzsystems (SOD, KAT, GPx) (Shahar et al., 2013).

In der randomisierten Kontrollstudie von Nabuco et al. wurde der Effekt eines Krafttrainings mit zusätzlicher Supplementation von Molkeproteinen auf das antioxidative Potenzial bei älteren Frauen untersucht. Die Intervention hatte einen Einfluss auf die Harnsäure-Konzentration, jedoch keinen signifikanten Effekt auf die antioxidative Enzymaktivität oder andere oxidative Blutmarker (Nabuco et al., 2019).

Bei Sharar et. al führte das körperliche Training und die Proteinsupplementation bei älteren Personen, die an Sarkopenie erkrankt sind, zu einer Reduktion des Körpergewichts. Jedoch wurde kein Einfluss auf die Muskelmasse und -kraft beobachtet. Weitere Ergebnisse waren, dass einerseits die antioxidativen Enzyme eine Verringerung aufwiesen, die möglicherweise durch die Produktion der belastungsinduzierten RONS hervorgerufen wurde, andererseits erhöhte die Proteinsupplementation aber die Konzentration der antioxidativen Enzyme (Shahar et al., 2013).

Im Zuge der Literaturrecherche zeigte sich, dass diese empirische Arbeit die erste ist, die sich – unter Berücksichtigung der oben angeführten Interventionen – mit der antioxidativen Gesamtkapazität (FRAP) und dem antioxidativen Redoxpaar (GSH und GSSG) bei älteren Menschen auseinandersetzt.

Die vorliegende Arbeit konnte hinsichtlich der antioxidativen Gesamtkapazität, gemessen mittels FRAP, einen signifikanten Einfluss durch die Intervention einer erhöhten Proteinzufuhr sowie zusätzlichem Krafttraining zeigen. Demgegenüber wurde jedoch in der Analyse von GSH, GSSG oder dem GSH/GSSG-Quotienten keine Beeinflussung des antioxidativen Systems durch die studienbezogene Intervention gemessen.

FRAP – Männer Am Verlauf der FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] lässt sich deutlich erkennen, dass in der PH-Gruppe die antioxidative Gesamtkapazität am stärksten variierte. Durch die Intervention der erhöhten Proteinzufuhr, die in der PH-Gruppe 2g/kg/KG/d betrug, war eine signifikante Reduzierung zwischen den Messzeitpunkten T1 und T2 zu beobachten. Der Konzentrationsabstieg ist eventuell auf die Zunahme des Energieverbrauchs zurückzuführen, der mit einer steigenden Thermogenese sowie einem erhöhten Sauerstoffverbrauch einhergeht. Gerade Proteine verursachen eine höhere und länger andauernde nahrungsinduzierte Thermogenese als andere Makronährstoffe (Keller, 2011). Die metabolischen Prozesse benötigen einen verstärkten ATP-Verbrauch, der unter anderem für die Synthese von Peptidbindungen bei der Proteinbiosynthese, für den Harnstoffwechsel oder für die Glukoneogenese erforderlich ist. Eiweiße besitzen den höchsten thermogenetischen Effekt. Es werden 25 bis 30 % der Proteine durch die nahrungsinduzierte Thermogenese in Wärme umgewandelt (Biesalski et al., 2017).

Des Weiteren hat überschüssiges Protein im menschlichen Körper keinen verfügbaren Speicherort und muss deswegen bei erhöhter Aufnahme abgebaut werden. Bei diesem Vorgang steigt die Oxidation der Proteine an. Und eine erhöhte Oxidation von Aminosäure, besonders Cystein, kann die Erzeugung mitochondrialer RONS steigern, was wiederum zu oxidativem Stress führen kann (Diamanti-Kandarakis et al., 2017).

Mohanty et al. stellten schon 2002 fest, dass eine verstärkte Proteinzufuhr die Erhöhung von RONS durch mononukleäre Zellen (v.a. Lymphozyten und Monozyten) und Granulozyten postprandial hervorrufen kann (Mohanty et al., 2002). Eine erst kürzlich erschienene Tierstudie an Ratten zeigte gleiche Ergebnisse. Hier wurde den Tieren eine achtwöchige proteinreiche Diät verabreicht, die zu einem Ungleichgewicht des anti- und oxidativen Systems im Gehirn führte (Żebrowska et al., 2019).

Die Konzentration der antioxidativen Gesamtkapazität unterschied sich zu Beginn der Studie (T1) von dem Wert zum Untersuchungszeitpunkt T3 signifikant. Interessanterweise fiel die Reduktion zwischen den Messzeitpunkten T2 und T3 – in der Phase, in der das zusätzliche

Krafttraining stattgefunden hat – viel geringer aus. Auch Soares et al. untersuchten die Auswirkungen eines intensiven Trainings auf das antioxidative System bei älteren Männern zwischen 40 bis 74 Jahren. Zu beobachten war, dass sich der Total Antioxidant Capacity-Wert (TAC-Wert) in der Interventionsgruppe erhöhte (Soares et al., 2015).

Ähnliche Ergebnisse fanden Mesquita et al. in ihrer erst kürzlich erschienen Studie zur Reduktion von oxidativem Stress durch progressives Widerstandstraining und Erdnussprotein-Supplementationen bei gesunden Männern im Alter von 64 ± 9 Jahren. Das sechswöchige Training (2x wöchentlich) veränderte die Anzahl von enzymatischen und nicht-enzymatischen AO signifikant. Auffallend war, dass das Krafttraining die enzymatische Aktivität der KAT und den TAC-Wert erhöhte, sich durch die Intervention die GPx-Aktivität allerdings verringerte. Die Gruppe, die zusätzlich die Erdnuss-Supplementation erhielt, wies einen geringeren Anstieg des TAC-Wertes auf (Mesquita et al., 2021). Aus diesem Grund kann man schließen, dass Krafttraining die Konzentration der antioxidativen Gesamtkapazität und eine erhöhte Proteinsupplementation die antioxidative Schutzabwehr beeinflussen können.

Des Weiteren gab es eine Anzahl positiver Zusammenhänge, in Bezug auf Sekundärparameter der Probanden, die mit den FRAP-Werten einhergingen.

So korrelierten mehrere anthropometrische Messungen, die an Messtermin T1 erhoben wurden und die mit der Bewegungs- und Muskelkraft der Probanden in Zusammenhang gebracht werden können, mit einem gesteigerten FRAP-Wert. Je höher der BMI [kg/m^2] und die FFM [kg] der Probanden, desto stärker war das gemessene antioxidative Gesamtpotenzial ausgeprägt. Die Muskelmasse [kg] als besonders wichtiger Parameter wies zusätzlich eine positive Korrelation auf. Die Entdeckung, dass Krafttraining beim Menschen mit der Bildung von RONS in Verbindung gebracht werden kann, wurde schon 1978 von Dillard et al. beschrieben (Dillard et al., 1978). Es ist inzwischen bewiesen, dass sich bei trainierten Personen, unter gleicher Belastungsintensität, die Aktivität antioxidativer Schutzsysteme anpasst und sich weniger freie Radikale generieren als bei Untrainierten (Powers et al., 2020). Wie erwartet beobachtete man einen starken Zusammenhang zwischen der Harnsäure und dem FRAP-Wert. So verdeutlichten die unterschiedlichen Harnsäurekonzentrationen [mg/dl] der Probanden, welche starke antioxidative Wirkung diese Verbindung mit sich bringt. Kellogg und Fridovich (1977) beschrieben schon in den 70er Jahren die hohe Effizienz der Xanthinoxidase (katalysiert Xanthin zu Harnsäure) als Radikalfänger, genau wie Benzie und Strain (1966) in ihrem FRAP-Assay den Beitrag der Harnsäure auf 60 % schätzten. Die

Korrelationskoeffizienten wurden vom Messzeitpunkt T1 bis zum Zeitpunkt T3 immer schwächer, da sich, wie bereits erwähnt, die FRAP-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] im Laufe der Studie bei den Männern verringerte.

Bei den funktionellen Parametern zeigten der Timed Up & Go-Test einen positiven sowie der 6 min walk-Test einen negativen Zusammenhang. Im Alter scheint besonders bei den Männern der Timed Up & Go-Test einen Einfluss auf die FRAP-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] zu haben. Gerade der Timed Up & Go-Test ist für eine Beurteilung der Beweglichkeit sowie für das Gleichgewicht bei älteren Menschen von großer Bedeutung.

GSH, GSSG, GSH/GSSG-Ratio – Männer Zwischen den Gruppen kam es zu keinem statistisch signifikanten Unterschied in Bezug auf die GSH-, GSSG-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] und GSH/GSSG-Ratio. Daraus kann man schließen, dass die Intervention der erhöhten Proteinzufuhr und das zusätzliche Krafttraining keinen Einfluss auf das Redoxpaar, GSH und GSSG, der Männer hatte.

Auffallend waren allerdings die Schwankungen der GSH-Werte in der PH-Gruppe. Zwischen den Messzeitpunkten T1 und T2 reduzierte sich die Konzentration an GSH um 8 %, was die Annahme zulässt, dass die erhöhte Proteinzufuhr von 1,6 g/kg/KG/d die GSH-Werte leicht schwanken ließ, die jedoch nicht ausreichend genug war, um ein signifikantes Niveau zu erreichen. Ähnliches beobachtete man auch zwischen den Messzeitpunkten T1 und T2 bei der GSSG-Analyse. Hier machte sich ein Absinken des antioxidativen Parameters in der PH-Gruppe mit 6 % bemerkbar. Daraufhin stieg die Konzentration beider Thiole zwischen den Messzeitpunkten T2 und T3 leicht an. Bei der Berechnung des GSH/GSSG-Quotienten konnte man beobachten, dass es in der PL-Gruppe zu den auffälligsten Schwankungen zwischen den drei Messzeitpunkten kam. Außerdem zeigte die negative Korrelation, dass das Alter einen signifikanten Zusammenhang mit dem Verhältnis von GSH und GSSG ausübt, wodurch der Schluss nahe liegt, dass je älter die Probanden waren, desto geringer fiel die GSH/GSSG-Ratio aus.

Die von Kretzschmar et. al durchgeführte Studie zeigte schon 1991, dass Alter und körperliches Training einen Einfluss auf die Plasma-GSH-Konzentration und auf die Lipidperoxidation bei Männern haben können. Bei trainierten und untrainierten Teilnehmern im Alter von 22 bis 57 Jahren nahm die Konzentration an GSH mit zunehmendem Alter signifikant ab. Des Weiteren wurde eine Verringerung der GSH-Konzentration sowie der Lipidperoxidation bei den trainierten Probanden beobachtet. Der GSSG-Wert blieb unverändert (Kretzschmar et al., 1991).

Elokda und Nielson untersuchten in ihrer Studie nach einer ähnlichen Forschungshypothese. Sie analysierten die oxidative Modifikation von oxidierten GSSG, reduzierten GSH und dem GSH/GSSG-Verhältnis nach einem 6-wöchigen progressiven Aerobic- und Krafttraining bei den zu untersuchenden Personen im mittleren Alter (32 ± 7 Jahre). Blutplasmaanalysen wurden vor und nach dem Belastungstest entnommen. Die Trainingseffekte zeigten, dass es zu einer signifikanten Abnahme der GSSG-Konzentration und zu einer signifikanten Zunahme der GSH- und des GSH/GSSG-Verhältnisses kam (Elokda & Nielsen, 2007). Dadurch lässt sich die Vermutung äußern, dass belastungsinduzierter oxidativer Stress einen Einfluss auf das antioxidative GSH und GSSG-System im menschlichen Organismus haben kann. Jedoch handelte es sich in der hier vorliegenden Arbeit um eine ältere Stichprobe mit zusätzlich erhöhter Proteinzufuhr, die bei Elokda und Nielson sowie bei Kretzschmar et. al. nicht durchgeführt wurde.

FRAP – gesamte Kohorte Die Auswertung der Daten verhielt sich in der gesamten Stichprobe ähnlich zu der der männlichen Probanden. Die statistische Auswertung zeigte signifikante Differenzen zwischen der Kontroll- und den beiden Interventionsgruppen. Die FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] variierten in der PH-Gruppe am auffälligsten. Durch die Intervention der erhöhten Proteinzufuhr, die in der PH-Gruppe $1,6 \text{ g/kg/KG/d}$ betrug, war eine signifikante Reduktion zwischen den Messzeitpunkten T1 und T2 zu beobachten. Wodurch wieder der Schluss nahe liegt, dass die erhöhte Zufuhr von Protein das antioxidative Gesamtpotenzial, durch den gesteigerten Metabolismus sowie die Oxidation überschüssiger Proteine, beeinträchtigt (siehe oben).

Zwischen den Messzeitpunkten T1 und T3 verringerte sich die Konzentration des FRAP-Wertes wieder signifikant. Dagegen fiel die Reduktion zwischen den Messzeitpunkten T2 und T3, zwischen denen das zusätzliche Krafttraining stattgefunden hatte, erneut viel geringer aus. Ähnliche Ergebnisse fanden Vezzoli et al. in ihrer Studie zur Reduktion von oxidativem Stress und verbesserter Muskelkraft durch ein progressives Widerstandstraining bei Frauen und Männern. Eine mäßige Trainingsintensität steigerte die Muskelmasse sowie -kraft und beeinflusste den TAC-Wert positiv bei älteren Proband*innen, die an Sarkopenie erkrankt waren (Vezzoli et al., 2019).

Die geschlechterspezifischen Unterschiede waren in der PL- und PH-Gruppe am auffälligsten, da die FRAP-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] bei den Frauen in den Interventionsgruppen deutlich niedriger waren als bei den männlichen Probanden. Zwar ist die Lebenserwartung von Frauen höher als die von Männern, jedoch ist der Status des antioxidativen Schutzmechanismus stark

abhängig vom Geschlecht und Alter und weist bei Frauen gewisse Nachteile auf. So zeigt die Studie von Pinchuk et al., dass die antioxidative Kapazität bei Männern altersunabhängig ist. Bei Frauen beobachtet man jedoch eine altersabhängige Verringerung des antioxidativen Status, welche auf die Menopause zurückzuführen ist. So wirkt Östrogen in hoher Konzentration antioxidativ, bei niedriger Konzentration weist es jedoch aufgrund seiner Katecholstruktur prooxidative Wirkungen auf (Pinchuk et al., 2019).

Bei den bivariaten Korrelationen der funktionellen Parameter ergaben beide Handgrip-Tests (dominant und non-dominant) signifikante Zusammenhänge in der PH-Gruppe. Dadurch lässt sich die Annahme tätigen, dass die Interventionen einen starken Einfluss auf die FRAP-Konzentrationen [$\mu\text{mol/l}$] sowie auf die Erfassung der Muskelfunktion aufweisen.

GSH/GSSG-Ratio – gesamte Kohorte Die geschlechterspezifische Trennung ließ keine Unterschiede in der GSH/GSSG-Ratio erkennen. Dies ließ sich mit einem nicht signifikanten Niveau, der Variable Geschlecht, bestätigen.

Bei der Auswertung der gesamten Stichprobe wurde zusätzlich kein signifikantes Interaktionsergebnis sowie kein einzelner Haupteffekt beobachtet.

Auffallend ist, dass die Konzentrationen des GSH/GSSG-Verhältnisses in der gesamten Gruppe stetig nicht signifikant abfielen. Im Gegensatz zu den Männern, bei denen in der Interventionsgruppe die GSH/GSSG-Ratio nach dem Messzeitpunkt T2, also nachdem das wöchentliche Krafttraining durchgeführt wurde, wieder anstieg.

Wie bereits berichtet, zeigten die bivariate Korrelation zwischen dem Alter und der GSH/GSSG-Ratio nur bei den Männern einen negativen Zusammenhang. Bei den Frauen war dieser Effekt nicht zu beobachten. Ebenso wenig in der gesamten Stichprobe, was es wiederum plausibel erscheinen lässt, dass sich das Verhältnis des Redoxpaares nur bei den Männern im hohen Alter signifikant verringerte.

6 Schlussbetrachtung

In der vorliegenden Arbeit wurde die FRAP-Analyse zur Bestimmung der antioxidativen Gesamtkapazität sowie des antioxidativen Potenzials am Gehalt von GSH und GSSG im Blutplasma älterer Menschen, mit Hilfe des photometrischen Mikroplattenreader FLUOstar Optima, durchgeführt.

Das FRAP-Assay ist ein einfaches und schnelles Testverfahren und beruht auf der Eisenreduktionsfähigkeit antioxidativ wirksamer Substanzen im Blutplasma. Als Positivkontrolle wurde in dieser Arbeit Trolox verwendet, welches sich als guter wasserlöslicher Analog antioxidativer Verbindungen bewährte.

Das GSH/GSSG-Assay beruht darauf, dass OPA als fluoreszierender Wirkstoff wirkt sowie der Verwendung von NEM als Inhibitor der Autooxidation von GSH zu GSSG.

Durch den Einsatz von 96-well-Platten und die kurze Reaktionskinetik ermöglichte die Durchführung beider Assays eine hohe Probendurchsatzrate pro Tag.

Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob eine erhöhte Proteinzufuhr sowie ein zusätzliches progressives Krafttraining das antioxidative Potenzial bei älteren Personen beeinflusst. Für die Messungen wurden die Parameter FRAP, GSH, GSSG und das GSH/GSSG-Verhältnis analysiert. Die NutriAging Studie erzielte einen wesentlichen Beitrag zum heutigen wissenschaftlichen Stand, da die Intervention der erhöhten Proteinzufuhr durch herkömmliche Lebensmittel passierte und so gut wie keine Supplementationen stattfanden.

Eine deutliche Beeinflussung des antioxidativen Gesamtpotenzials konnte mithilfe des FRAP-Assay festgestellt werden. So reduzierte die erhöhte Proteinzufuhr von 1,6 g/kg/KG/d der PH-Gruppe die Konzentration antioxidativ wirksamer Substanzen im Blutplasma der Proband*innen. Durch das zusätzliche Krafttraining fiel die FRAP-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] weithin ab, jedoch verlief diese Reduktion in einem geringeren Ausmaß. Diese Auswirkung konnte man bei beiden Geschlechtern beobachten. Trennte man die Ergebnisse geschlechterspezifisch auf, stellte man fest, dass die FRAP-Konzentrationen bei den Frauen geringer ausfielen als bei den Männern.

Bei GSH, GSSG und beim GSH/GSSG-Quotienten konnte man keine signifikante Veränderung des antioxidativen Potenzials durch die Interventionen beobachten. Es ließ sich jedoch ein geschlechterspezifischer Unterschied beim GSH/GSSG-Verhältnis feststellen, da

ausschließlich die Männer mit steigendem Alter einen niedrigeren Quotienten des antioxidativen Redoxpaares aufwiesen.

Aufgrund der Tatsache, dass im Alter zum einen die RONS-Bildung ansteigt und durch intensives und längeres Training zusätzlich der oxidative Stress gefördert wird, und dass zum anderen jedoch ein gewisses Ausmaß an körperlicher Betätigung mit einer ausreichenden Menge an Proteinen pro Tag bei älteren Menschen unentbehrlich ist, wird diese Thematik weiterhin kontrovers diskutiert werden. Ein zukünftig zu vertiefendes Forschungsthema – um die Auswirkungen von prooxidativen Stressreaktionen bei Menschen im höheren Alter besser verstehen zu können – stellt die Beobachtung dar, dass zeitgleich die mitochondriale Biogenese und die Neusynthese antioxidativer Schutzsysteme durch ein körperliches Training stimuliert werden und eine erhöhte Proteinzufuhr die Muskelmasse sowie -kraft fördert.

Die Limitation der vorliegenden Arbeit war, dass durch die geschlechterspezifische Trennung der Stichprobenumfang auf einem kleinen Umfang reduziert wurde. Dies wirkte sich speziell auf die Subgruppenanalyse und die statistische Auswertung einschränkend aus.

7 Zusammenfassung

Der komplexe Prozess des Alterns ist das Ergebnis vieler biochemischer Mechanismen, die sich im Laufe des Lebens akkumulieren und die Seneszenz des Körpers verursachen. Unter den Kennzeichen des Alterns gehören unter anderem die genomische Instabilität mit einhergehendem Verlust der Genfunktion, die im steigenden Alter fortschreitende Verkürzung der Telomere, epigenetische Veränderungen, die deregulierte Nährstoffwahrnehmung und für diese Arbeit am relevantesten; die Akkumulierung von RONS. Die Free Radical Theory of Aging beruht auf dem Anstieg freier Radikale mit zunehmender Lebenszeit, welcher oxidativen Stress auslösen kann und letztlich zu Organ- und Funktionsstörungen führt. Angesichts der steigenden Lebenserwartung ist es gerade für ältere Menschen besonders wichtig, auf einen gesunden Lebensstil zu achten, der den pro- und antioxidativen Haushalt im Gleichgewicht hält. Eine gesunde Ernährungsweise sowie regelmäßige körperliche Bewegung sind zwei wichtige Schlüsselemente, die das Wohlbefinden, die Leistungsfähigkeit und die Unabhängigkeit bei älteren Menschen aufrechterhalten können. Die Lebensmittelauswahl sollte sich deswegen bei älteren Personen auf protein- und nährstoffreiche Produkte konzentrieren. Die DGE gibt derzeit einen Schätzwert von 1 g/kg/KG/d Protein für Menschen ab 65 Jahren an. Zusätzlich sollte ein abgestimmtes Krafttrainingsprogramm zwei bis drei Mal die Woche durchgeführt werden, sodass der Erhalt an Muskelmasse und -kraft beibehalten wird. Des Weiteren kann Krafttraining die Anpassung des antioxidativen Schutzsystems verbessern und folglich die Auswirkungen von oxidativem Stress bei gesunden älteren Menschen mildern. Ziel dieser Masterarbeit war es, den Effekt einer erhöhten Proteinzufuhr allein und in Kombination mit Krafttraining bei älteren Personen auf die antioxidative Kapazität zu untersuchen. Für dieses Vorhaben wurde einerseits das FRAP-Assay eingesetzt, um die antioxidative Gesamtkapazität der Proband*innen zu analysieren. Dieser Test bestimmt die antioxidative Aktivität von allen Verbindungen im Hinblick auf ihre eisenreduzierende Fähigkeit. Andererseits wurde zusätzlich der Gehalt an reduziertem GSH und oxidiertem GSSG detektiert sowie das Verhältnis beider Thiole berechnet, um zusätzlich das antioxidative Potenzial zu quantifizieren. Die Teilnehmer*innen wurden randomisiert in drei Gruppen aufgeteilt. Es gab eine K-Gruppe, deren Ernährungsweise und übliche sportliche Aktivität sich nicht verändern sollte.

Die PL-Gruppe musste sich an die D-A-CH-Referenzwerte für die empfohlene Proteinzufuhr für 65 Jahre und älter, also 1 g/kg/KG/d Protein, halten, bei der PH-Gruppe gab es eine deutlich erhöhte Gabe von 1,6 g/kg/KG Protein am Tag. Beide Interventionsgruppen nahmen nach sechs Wochen Ernährungsintervention an einem achtwöchigen Krafttraining zweimal pro Woche teil. Es gab drei Messzeitpunkte, an denen medizinische, anthropometrische und funktionelle Erhebungen erfasst worden sind: T1 zu Beginn der Studie, T2 nach achtwöchiger Proteinintervention und T3 nach weiterführender Proteinintervention mit zusätzlicher achtwöchiger Krafttrainingsintervention.

Ein Ergebnis war, dass die erhöhte Proteinzufuhr in der PH-Gruppe die FRAP-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] bei den Männern signifikant ($p = 0,002$) reduzierte. Selbiges beobachtete man auch bei der Gesamtgruppe ($p = 0,001$).

Durch das zusätzliche Krafttraining reduzierte sich die FRAP-Konzentration [$\mu\text{mol/l}$] in geringem Maße (nicht signifikant). Diese Auswirkungen konnte man bei den Männern sowie bei beiden Geschlechtern beobachten. Frauen wiesen im Allgemeinen jedoch eine geringere antioxidative Gesamtkapazität auf als Männer.

Bei GSH, GSSG und beim GSH/GSSG-Quotienten konnte man keine signifikanten Veränderungen des antioxidativen Potenzials durch die Ernährungs- und Bewegungsinterventionen bei beiden Geschlechtern beobachten. Es gab ausschließlich eine geschlechterspezifische Korrelation ($r = -0,328$; $p = 0,008$) des GSH/GSSG-Verhältnisses, da nur die Männer im steigenden Alter einen niedrigeren Quotienten des antioxidativen Redoxpaares aufwiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine zu hohe Proteinzufuhr das antioxidative Gesamtpotenzial in ein Ungleichgewicht bringen kann. Dies lässt sich jedoch durch körperliche Betätigung kompensieren, wie man es den FRAP-Werten der PH-Gruppe entnehmen kann.

Um die Auswirkungen von oxidativem Stress durch vorprogrammierte RONS-Bildung im hohen Alter sowie die belastungsinduzierte Produktion freier Radikale besser zu verstehen, sind weitere Untersuchungen nötig. Selbiges lässt sich in Bezug auf die erhöhte Proteinzufuhr bei Menschen ab 65 feststellen.

8 Summary

The complex process of aging is a result of various biochemical mechanisms that accumulate throughout life and cause senescence of the body. The interacting hallmarks of aging include, amongst other things, the genomic instability with accompanying loss of gene function, telomere attrition with increasing age, epigenetic changes, deregulated nutrient sensing and most important to this work; the accumulation of RONS. The Free Radical Theory of Aging is based on the increased levels of free radicals and related prooxidants that can cause damage to cellular constituents, which, over the time, results in oxidative stress leading to structural and functional impairments of the body.

In view of the increasing life expectancy, it is especially important for older people to follow a healthy lifestyle to keep the pro- and antioxidant homeostasis in balance. A healthy diet and regular physical activity are two key elements that can maintain well-being, performance and independence of the older generation.

Nutritional choices should therefore focus on protein- and nutrient-rich products in the elderly; the DGE currently gives an estimated value of 1 g/kg/KG/d of protein for people 65 years and older. In addition, a coordinated resistance training program should be performed 2 to 3 times a week to maximize muscle adaptation.

Furthermore, resistance training may improve the adaptation of the antioxidant protection system and consequently mitigate the effects of oxidative stress in healthy elderly people. The aim of this master's thesis was to investigate the effect of increased protein intake alone and in combination with resistance training on antioxidant capacity in elderly individuals. For this project, on the one hand, the FRAP assay was used to analyze the TAC of the subjects. This assay determines the antioxidant activity in terms of their iron-reducing capacity. On the other hand, the content of reduced GSH and oxidized GSSG was detected, and the ratio of both thiols was calculated to quantify the antioxidant potential.

The participants were randomly divided into three groups. There was a control group which diet and physical activity were not to change. The PL group had to focus on the D-A-CH reference values for recommended protein intake for 65 years and older, i.e., 1 g/kg/KG/d protein while the PH group had a notable increased intake of 1,6 g/kg/KG protein per day. Both intervention groups participated in an eight-week resistance training program twice per week after six weeks of dietary intervention. There were three measurement time points for medical, anthropometric, and functional surveys: T1 at baseline, T2 after eight weeks of

protein intervention, and T3 after continuing protein intervention with additional eight weeks of strength training intervention.

The results showed that the increased protein intake in the PH group, significantly ($p = 0.002$) reduced FRAP concentration [$\mu\text{mol/l}$] in males and the total group ($p = 0.001$).

The additional strength training decreased the FRAP concentration [$\mu\text{mol/l}$] non significantly. The effects were observed for males as well as for both sexes. However, women generally have a lower total antioxidant capacity than men.

For GSH, GSSG, and the GSH/GSSG-quotient, no significant changes in antioxidant potential were observed by the dietary and exercise interventions in either sex. There was exclusively a negative correlation ($r = -0.328$; $p = 0.008$) of the GSH/GSSG-ratio, as only males showed a lower ratio of the antioxidant redox couple at increasing age.

In conclusion, excessive protein intake may imbalance the total antioxidant potential.

However, this can be compensated by physical exercise, as seen by the FRAP values of the PH group.

Further studies are needed to better understand the effects of oxidative stress through pre-programmed RONS generation in older individuals as well as exercise-induced free radical production. The same can be said about the increased protein intake for people aged 65 and older.

Afanas'ev, I. (2010). Signaling and Damaging Functions of Free Radicals in Aging—Free Radical Theory, Hormesis, and TOR. *Aging and Disease*, 1(2), 14.

Agarwal, E., Miller, M., Yaxley, A., & Isenring, E. (2013). Malnutrition in the elderly: A narrative review. *Maturitas*, 76(4), 296–302. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.07.013>

Atamna, H., Cheung, I., & Ames, B. N. (2000). A method for detecting abasic sites in living cells: Age-dependent changes in base excision repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 686–691.

Barclay, L. R. C., Basque, M. C., Stephenson, V. C., & Vinqvist, M. R. (2003). Photooxidations initiated or sensitized by biological molecules: Singlet oxygen versus radical peroxidation in micelles and human blood plasma[para]. *Photochemistry and Photobiology*, 78(3), 248–255.

Bauer, J., Wirth, R., Volkert, D., Werner, H., & Sieber, C. (2008). Malnutrition, Sarkopenie und Kachexie im Alter—Von der Pathophysiologie zur Therapie. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 133(7), 305–310. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1046711>

Baum, J. I., Kim, I.-Y., & Wolfe, R. R. (2016). Protein Consumption and the Elderly: What Is the Optimal Level of Intake? *Nutrients*, 8(6), 359. <https://doi.org/10.3390/nu8060359>

Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

Biesalski, H. K., Pirlich, M., Bischoff, S. C., & Weimann, A. (2017). *Ernährungsmedizin: Nach dem Curriculum Ernährungsmedizin der Bundesärztekammer*. Georg Thieme Verlag.

Boeing, H., Bechthold, A., Bub, A., Ellinger, S., Haller, D., Kroke, A., Leschik-Bonnet, E., Müller, M. J., Oberritter, H., Schulze, M., Stehle, P., & WatzlV, B. (2012). *Gemüse und Obst in der Prävention ausgewählter chronischer Krankheiten*. 56.

Brieger, K., Schiavone, S., Miller Jr., F. J., & Krause, K.-H. (2012). Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Medical Weekly*, 142(3334).
<https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>

Bulmer, A. C., Ried, K., Blanchfield, J. T., & Wagner, K.-H. (2008). The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 658(1), 28–41.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.05.001>

Carlson, A., Braun, H., Großhauser, M., König, D., Lampen, A., Mosler, S., Nieß, A., Oberritter, H., Schäbethal, K., Schek, A., Stehle, P., Virmani, K., Ziegenhagen, R., & Heseker, H. (2019). Minerals and vitamins in sports nutrition. Position of the working group sports nutrition of the German Nutrition Society (DGE). *Ernährungs Umschau*, 66(12), 250–257. <https://doi.org/10.4455/eu.2019.050>

Clegg, M. E., & Williams, E. A. (2018). Optimizing nutrition in older people. *Maturitas*, 112, 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.04.001>

Cohn, V. H., & Lyle, J. (1966). A fluorometric assay for glutathione. *Analytical Biochemistry*, 14(3), 434–440. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90286-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90286-7)

Cruz-Jentoft, A. J., Dawson Hughes, B., Scott, D., Sanders, K. M., & Rizzoli, R. (2020). Nutritional strategies for maintaining muscle mass and strength from middle age to later life: A narrative review. *Maturitas*, 132, 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2019.11.007>

da Costa, J. P., Vitorino, R., Silva, G. M., Vogel, C., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. (2016). A synopsis on aging—Theories, mechanisms and future prospects. *Ageing Research Reviews*, 29, 90–112. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.005>

Deutsche Gesellschaft für Ernährung e. V. © 2021 DGE.
<https://www.dge.de/wissenschaft/referenzwerte/protein/?L=0> (Zugegriffen: 04.06.2021)

Diamanti-Kandarakis, E., Papalou, O., Kandaraki, E. A., & Kassi, G. (2017). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Nutrition as a mediator of oxidative stress in metabolic and reproductive disorders in women. *European Journal of Endocrinology*, 176(2), R79–R99. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0616>

Dillard, C. J., Litov, R. E., Savin, W. M., Dumelin, E. E., & Tappel, A. L. (1978). Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation. *Journal of Applied Physiology*, 45(6), 927–932. <https://doi.org/10.1152/jappl.1978.45.6.927>

Dodig, S., Dodig, S., Čepelak, I., & Pavić, I. (2019). Hallmarks of senescence and aging. *Biochemia Medica*, 29(3), 0–0. <https://doi.org/10.11613/BM.2019.030501>

Elokda, A. S., & Nielsen, D. H. (2007). Effects of exercise training on the glutathione antioxidant system. *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation*, 14(5), 630–637. <https://doi.org/10.1097/HJR.0b013e32828622d7>

Fernandez-Panchon, M. S., Villano, D., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2008). Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From In Vitro Results to In Vivo Evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(7), 649–671. <https://doi.org/10.1080/10408390701761845>

Field, A. (2017). *Discovering statistics using IBM SPSS statistics* (5th edition). SAGE Publications.

Finaud, J., Lac, G., & Filaire, E. (2006). Oxidative Stress. *Sports Medicine*, 36(4), 327–358. <https://doi.org/10.2165/00007256-200636040-00004>

Fontana, L., Partridge, L., & Longo, V. D. (2010). Extending Healthy Life Span—From Yeast to Humans. *Science*, 328(5976), 321–326. <https://doi.org/10.1126/science.1172539>

Fragala, M. S., Cadore, E. L., Dorgo, S., Izquierdo, M., Kraemer, W. J., Peterson, M. D., & Ryan, E. D. (2019). *Resistance Training for Older Adults: Position Statement From the National Strength and Conditioning Association*. 34.

Francis, P., Mc Cormack, W., Toomey, C., Norton, C., Saunders, J., Kerin, E., Lyons, M., & Jakeman, P. (2017). Twelve weeks' progressive resistance training combined with protein supplementation beyond habitual intakes increases upper leg lean tissue mass, muscle strength and extended gait speed in healthy older women. *Biogerontology*, 18(6), 881–891.

<https://doi.org/10.1007/s10522-016-9671-7>

Franzke, B., Halper, B., Hofmann, M., Oesen, S., Jandrasits, W., Baierl, A., Tosevska, A., Strasser, E.-M., Wessner, B., Wagner, K.-H., & Vienna Active Ageing Study Group. (2015). The impact of six months strength training, nutritional supplementation or cognitive training on DNA damage in institutionalised elderly. *Mutagenesis*, 30(1), 147–153.

<https://doi.org/10.1093/mutage/geu074>

Gaucher, C., Boudier, A., Bonetti, J., Clarot, I., Leroy, P., & Parent, M. (2018). Glutathione: Antioxidant Properties Dedicated to Nanotechnologies. *Antioxidants*, 7(5).

<https://doi.org/10.3390/antiox7050062>

Giustarini, D., Dalle-donne, I., Milzani, A., Fanti, P., & Rossi, R. (2013). Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nature Protocols*, 8(9), 1660–1669.

<http://dx-doi-org.uaccess.univie.ac.at/10.1038/nprot.2013.095>

Gonzalez, A. M., Mangine, G. T., Fragala, M. S., Stout, J. R., Beyer, K. S., Bohner, J. D., Emerson, N. S., & Hoffman, J. R. (2014). Resistance training improves single leg stance performance in older adults. *Aging Clinical and Experimental Research*, 26(1), 89–92.

<https://doi.org/10.1007/s40520-013-0126-6>

Granacher, U., Lacroix, A., Muehlbauer, T., Roettger, K., & Gollhofer, A. (2013). Effects of Core Instability Strength Training on Trunk Muscle Strength, Spinal Mobility, Dynamic Balance and Functional Mobility in Older Adults. *Gerontology*, 59(2), 105–113.

<https://doi.org/10.1159/000343152>

Green, D. R., Galluzzi, L., & Kroemer, G. (2011). Mitochondria and the Autophagy–Inflammation–Cell Death Axis in Organismal Aging. *Science*, 333(6046), 1109–1112.

<https://doi.org/10.1126/science.1201940>

- Gyurászová, M., Kovalčíková, A., Janšáková, K., Šebeková, K., Celec, P., & Tóthová, Ľ. (2018). Markers of Oxidative Stress and Antioxidant Status in the Plasma, Urine and Saliva of Healthy Mice. *Physiological Research*, 921–934. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933866>
- Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298–300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(61\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(61)90192-6)
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., & Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 44(2), 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>
- Hissin, P. J., & Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74(1), 214–226. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2)
- Hoeijmakers, J. H. J. (2009). DNA Damage, Aging, and Cancer. *New England Journal of Medicine*, 361(15), 1475–1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804615>
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841–1856. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>
- Jäger, R., Kerksick, C. M., Campbell, B. I., Cribb, P. J., Wells, S. D., Skwiat, T. M., Purpura, M., Ziegenfuss, T. N., Ferrando, A. A., Arent, S. M., Smith-Ryan, A. E., Stout, J. R., Arciero, P. J., Ormsbee, M. J., Taylor, L. W., Wilborn, C. D., Kalman, D. S., Kreider, R. B., Willoughby, D. S., Antonio, J. (2017). International Society of Sports Nutrition Position Stand: Protein and exercise. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 14(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12970-017-0177-8>
- Jin, K. (2010). Modern Biological Theories of Aging. *Aging and Disease*, 1(2), 3.

Keller, U. (2011). *Nahrungsproteine bei Adipositas und Diabetes*. 6.

Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, 464(7288), 504–512.

<https://doi.org/10.1038/nature08980>

Kim, J. E., O'Connor, L. E., Sands, L. P., Slobodnik, M. B., & Campbell, W. W. (2016).

Effects of dietary protein intake on body composition changes after weight loss in older adults: A systematic review and meta-analysis. *Nutrition Reviews*, 74(3), 210–224.

<https://doi.org/10.1093/nutrit/nuv065>

Kim, S.-H., Kim, S.-H., Lee, J.-H., Lee, B.-H., Yoon, H. J., Shin, D. H., Park, S. S., Jang, S.

B., Park, J.-S., & Jee, Y.-K. (2015). Superoxide Dismutase Gene (SOD1, SOD2, and SOD3) Polymorphisms and Antituberculosis Drug-induced Hepatitis. *Allergy, Asthma & Immunology Research*, 7(1), 88–91. <https://doi.org/10.4168/aair.2015.7.1.88>

König, D., Carlsohn, A., Braun, H., Großhauser, M., Lampen, A., Mosler, S., Nieß, A., & al., et. (2020). Proteins in sports nutrition. Position of the working group sports nutrition of the German Nutrition Society (DGE). *Ernährungs Umschau*, 67(7), 132–139.

<https://doi.org/10.4455/eu.2020.039>

Kretzschmar, M., Müller, D., Hübscher, J., Marin, E., & Klinger, W. (1991). Influence of Aging, Training and Acute Physical Exercise on Plasma Glutathione and Lipid Peroxides in Man*. *International Journal of Sports Medicine*, 12(02), 218–222. <https://doi.org/10.1055/s-2007-1024671>

Lang, T., Streeper, T., Cawthon, P., Baldwin, K., Taaffe, D. R., & Harris, T. B. (2010).

Sarcopenia: Etiology, clinical consequences, intervention, and assessment. *Osteoporosis International*, 21(4), 543–559. <https://doi.org/10.1007/s00198-009-1059-y>

Lacroix, A., Kressig, R. W., Muehlbauer, T., Gschwind, Y. J., Pfenninger, B., Bruegger, O., & Granacher, U. (2016). Effects of a Supervised versus an Unsupervised Combined Balance and Strength Training Program on Balance and Muscle Power in Healthy Older Adults: A Randomized Controlled Trial. *Gerontology*, 62(3), 275–288.

<https://doi.org/10.1159/000442087>

- LeBrasseur, N. K., Schelhorn, T. M., Bernardo, B. L., Cosgrove, P. G., Loria, P. M., & Brown, T. A. (2009). Myostatin Inhibition Enhances the Effects of Exercise on Performance and Metabolic Outcomes in Aged Mice. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 64A(9), 940–948. <https://doi.org/10.1093/gerona/glp068>
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. (2018). Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging, Volume 13*, 757–772. <https://doi.org/10.2147/CIA.S158513>
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The Hallmarks of Aging. *Cell*, 153(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
- Lu, T., Pan, Y., Kao, S.-Y., Cheng, L., & al, et. (2004). Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 429(6994), 883–891. <http://dx-doi-org.uaccess.univie.ac.at/10.1038/nature02661>
- Lynch, H., Johnston, C., & Wharton, C. (2018). Plant-Based Diets: Considerations for Environmental Impact, Protein Quality, and Exercise Performance. *Nutrients*, 10(12), 1841. <https://doi.org/10.3390/nu10121841>
- Martins, R., Lithgow, G. J., & Link, W. (2016). Long live FOXO: Unraveling the role of FOXO proteins in aging and longevity. *Aging Cell*, 15(2), 196–207. <https://doi.org/10.1111/accel.12427>
- Medvedev ZA. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biol Rev Camb Philos Soc.* (1990) ;65(3):375-98. doi: 10.1111/j.1469-185x.1990.tb01428.x. PMID: 2205304
- Mesquita, P. H. C., Lamb, D. A., Godwin, J. S., Osburn, S. C., Ruple, B. A., Moore, J. H., Vann, C. G., Huggins, K. W., Fruge, A. D., Young, K. C., Kavazis, A. N., & Roberts, M. D. (2021). Effects of Resistance Training on the Redox Status of Skeletal Muscle in Older Adults. *Antioxidants*, 10(3). <https://doi.org/10.3390/antiox10030350>

Messina, M., Lynch, H., Dickinson, J. M., & Reed, K. E. (2018). No Difference Between the Effects of Supplementing With Soy Protein Versus Animal Protein on Gains in Muscle Mass and Strength in Response to Resistance Exercise. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 28(6), 674–685. <https://doi.org/10.1123/ijsnem.2018-0071>

Milani, A., Basirnejad, M., Shahbazi, S., & Bolhassani, A. (2017). Carotenoids: Biochemistry, pharmacology and treatment: Carotenoids: pharmacology and treatment. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1290–1324. <https://doi.org/10.1111/bph.13625>

Mohanty, P., Ghanim, H., Hamouda, W., Aljada, A., Garg, R., & Dandona, P. (2002). Both lipid and protein intakes stimulate increased generation of reactive oxygen species by polymorphonuclear leukocytes and mononuclear cells. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(4), 767–772. <https://doi.org/10.1093/ajcn/75.4.767>

Morrison, D., Hughes, J., Della Gatta, P. A., Mason, S., Lamon, S., Russell, A. P., & Wadley, G. D. (2015). Vitamin C and E supplementation prevents some of the cellular adaptations to endurance-training in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 89, 852–862. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.10.412>

Moskalev, A. A., Shaposhnikov, M. V., Plyusnina, E. N., Zhavoronkov, A., Budovsky, A., Yanai, H., & Fraifeld, V. E. (2013). The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Research Reviews*, 12(2), 661–684. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.001>

Nabuco, H. C. G., Tomeleri, C. M., Fernandes, R. R., Junior, P. S., Venturini, D., Barbosa, D. S., Deminice, R., Sardinha, L. B., & Cyrino, E. S. (2019). Effects of pre- or post-exercise whey protein supplementation on oxidative stress and antioxidant enzymes in older women. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 29(8), 1101–1108. <https://doi.org/10.1111/sms.13449>

Nabuco, H. C. G., Tomeleri, C. M., Sugihara Junior, P., Fernandes, R. R., Cavalcante, E. F., Antunes, M., Ribeiro, A. S., Teixeira, D. C., Silva, A. M., Sardinha, L. B., & Cyrino, E. S. (2018). Effects of Whey Protein Supplementation Pre- or Post-Resistance Training on Muscle Mass, Muscular Strength, and Functional Capacity in Pre-Conditioned Older Women: A Randomized Clinical Trial. *Nutrients*, 10(5), 563. <https://doi.org/10.3390/nu10050563>

Nicholson, V. P., McKean, M. R., & Burkett, B. J. (2015). Low-load high-repetition resistance training improves strength and gait speed in middle-aged and older adults. *Journal of Science and Medicine in Sport*, 18(5), 596–600.

<https://doi.org/10.1016/j.jsams.2014.07.018>

Nwachukwu, I. D., & Aluko, R. E. (2019). Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. *Journal of Food Biochemistry*, 43(1), e12761.

<https://doi.org/10.1111/jfbc.12761>

Padayatty, S. J., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.-H., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Dutta, S. K., & Levine, M. (2003). Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, 22(1), 18–35.

<https://doi.org/10.1080/07315724.2003.10719272>

Papa, E. V., Dong, X., & Hassan, M. (2017, Juni 13). *Resistance training for activity limitations in older adults with skeletal muscle function deficits: A systematic review*. Clinical Interventions in Aging; Dove Press. <https://doi.org/10.2147/CIA.S104674>

Pamukoff, D. N., Haakonssen, E. C., Zaccaria, J. A., Madigan, M. L., Miller, M. E., & Marsh, A. P. (2014, April 17). *The effects of strength and power training on single-step balance recovery in older adults: A preliminary study*. Clinical Interventions in Aging; Dove Press.

<https://doi.org/10.2147/CIA.S59310>

Paulsen, G., Cumming, K. T., Holden, G., Hallén, J., Rønnestad, B. R., Sveen, O., Skaug, A., Paur, I., Bastani, N. E., Østgaard, H. N., Buer, C., Midttun, M., Freuchen, F., Wiig, H., Ulseth, E. T., Garthe, I., Blomhoff, R., Benestad, H. B., & Raastad, T. (2014). Vitamin C and E supplementation hampers cellular adaptation to endurance training in humans: A double-blind, randomised, controlled trial. *The Journal of Physiology*, 592(8), 1887–1901.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.267419>

Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 30(1), 11–26. <http://dx-doi-org.uaccess.univie.ac.at/10.1007/s12291-014-0446-0>

Pinchuk, I., Weber, D., Kochlik, B., Stuetz, W., Toussaint, O., Debaq-Chainiaux, F., Dollé, M. E. T., Jansen, E. H. J. M., Gonos, E. S., Sikora, E., Breusing, N., Gradinaru, D., Sindlinger, T., Moreno-Villanueva, M., Bürkle, A., Grune, T., & Lichtenberg, D. (2019). Gender- and age-dependencies of oxidative stress, as detected based on the steady state concentrations of different biomarkers in the MARK-AGE study. *Redox Biology*, 24, 101204. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101204>

Pleyer, B., & Raidl, A. (2017). *Ernährung im Alter: Praxishandbuch mit Checklisten für Pflege und Betreuung*. Springer-Verlag.

Poljsak, B., Šuput, D., & Milisav, I. (2013). Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2013/956792>

Pomatto, L. C. D., & Davies, K. J. A. (2018). Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radical Biology and Medicine*, 124, 420–430. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.016>

Powers, E. T., Morimoto, R. I., Dillin, A., Kelly, J. W., & Balch, W. E. (2009). Biological and Chemical Approaches to Diseases of Proteostasis Deficiency. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 959–991. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.114844>

Powers, S. K., Deminice, R., Ozdemir, M., Yoshihara, T., Bomkamp, M. P., & Hyatt, H. (2020). Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe? *Journal of Sport and Health Science*, 9(5), 415–425. <https://doi.org/10.1016/j.jshs.2020.04.001>

Powers, S. K., Duarte, J., Kavazis, A. N., & Talbert, E. E. (2010). Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation. *Experimental Physiology*, 95(1), 1–9. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.050526>

Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Reviews*, 88(4), 1243–1276. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>

Powers, S. K., Radak, Z., & Ji, L. L. (2016). Exercise-induced oxidative stress: Past, present and future. *The Journal of Physiology*, 594(18), 5081–5092. <https://doi.org/10.1113/JP270646>

Prior, R. L., & Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: Comparison of different analytical methods¹. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(11), 1173–1181. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00203-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00203-8)

Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. <https://doi.org/10.1021/jf0502698>

Reeg, S., & Grune, T. (2015). Protein Oxidation in Aging: Does It Play a Role in Aging Progression? *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(3), 239–255. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6062>

Robert Koch-Institut. (2008). Oxidativer Stress und Möglichkeiten seiner Messung aus umweltmedizinischer Sicht: Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 51(12), 1464–1482. <https://doi.org/10.1007/s00103-008-0720-5>

Russell, S. J., & Kahn, C. R. (2007). Endocrine regulation of ageing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(9), 681–691. <http://dx-doi-org.uaccess.univie.ac.at/10.1038/nrm2234>

Schultz, M. B., & Sinclair, D. A. (2016). When stem cells grow old: Phenotypes and mechanisms of stem cell aging. *Development*, 143(1), 3–14. <https://doi.org/10.1242/dev.130633>

Sen, P., Shah, P. P., Nativio, R., & Berger, S. L. (2016). Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell*, 166(4), 822–839. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.050>

Shahar, S., Norshafarina, Badrasawi, M., Noor, Abdul Manaf, Z., Zaitun Yassin, M., & Joseph, L. (2013). Effectiveness of exercise and protein supplementation intervention on body composition, functional fitness, and oxidative stress among elderly Malays with sarcopenia. *Clinical Interventions in Aging*, 1365. <https://doi.org/10.2147/CIA.S46826>

Shaw, A. C., Joshi, S., Greenwood, H., Panda, A., & Lord, J. M. (2010). Aging of the innate immune system. *Current Opinion in Immunology*, 22(4), 507–513.

<https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.05.003>

Singh, V., Gera, R., Purohit, M., Patnaik, S., & Ghosh, D. (2017). Fluorometric Estimation of Glutathione in Cultured Microglial Cell Lysate. *BIO-PROTOCOL*, 7(11).

<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2304>

Soares, J. P., Silva, A. M., Oliveira, M. M., Peixoto, F., Gaivão, I., & Mota, M. P. (2015). Effects of combined physical exercise training on DNA damage and repair capacity: Role of oxidative stress changes. *AGE*, 37(3), 61. <https://doi.org/10.1007/s11357-015-9799-4>

Sung, C.-C., Hsu, Y.-C., Chen, C.-C., Lin, Y.-F., & Wu, C.-C. (2013). Oxidative Stress and Nucleic Acid Oxidation in Patients with Chronic Kidney Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2013/301982>

Thomas, D. R. (2002). Distinguishing starvation from cachexia. *Clinics in Geriatric Medicine*, 18(4), 883–891. [https://doi.org/10.1016/S0749-0690\(02\)00032-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0690(02)00032-0)

Tieland, M., Dirks, M. L., van der Zwaluw, N., Verdijk, L. B., van de Rest, O., de Groot, L. C. P. G. M., & van Loon, L. J. C. (2012). Protein Supplementation Increases Muscle Mass Gain During Prolonged Resistance-Type Exercise Training in Frail Elderly People: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Journal of the American Medical Directors Association*, 13(8), 713–719. <https://doi.org/10.1016/j.jamda.2012.05.020>

Valavanidis, A., Vlachogianni, T., & Fiotakis, C. (2009). 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 27(2), 120–139.

<https://doi.org/10.1080/10590500902885684>

Vezzoli, Mrakic-Sposta, Montorsi, Porcelli, Vago, Cereda, Longo, Maggio, & Narici. (2019). Moderate Intensity Resistive Training Reduces Oxidative Stress and Improves Muscle Mass and Function in Older Individuals. *Antioxidants*, 8(10), 431.

<https://doi.org/10.3390/antiox8100431>

Vikberg, S., Sörlén, N., Brandén, L., Johansson, J., Nordström, A., Hult, A., & Nordström, P. (2019). Effects of Resistance Training on Functional Strength and Muscle Mass in 70-Year-Old Individuals With Pre-sarcopenia: A Randomized Controlled Trial. *Journal of the American Medical Directors Association*, 20(1), 28–34.

<https://doi.org/10.1016/j.jamda.2018.09.011>

Volkert, D. (2004). Körperzusammensetzung im Alter. *Aktuelle Ernährungsmedizin*, 29(2), 69–77. <https://doi.org/10.1055/s-2003-814859>

White, T. A., & LeBrasseur, N. K. (2014). Myostatin and Sarcopenia: Opportunities and Challenges - A Mini-Review. *Gerontology*, 60(4), 289–293.

<https://doi.org/10.1159/000356740>

Withee, E. D., Tippens, K. M., Dehen, R., Tibbitts, D., Hanes, D., & Zwickey, H. (2017). Effects of Methylsulfonylmethane (MSM) on exercise-induced oxidative stress, muscle damage, and pain following a half-marathon: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 14(1), 24.

<https://doi.org/10.1186/s12970-017-0181-z>

Yang, Y., Bazhin, A. V., Werner, J., & Karakhanova, S. (2013). Reactive Oxygen Species in the Immune System. *International Reviews of Immunology*, 32(3), 249–270.

<https://doi.org/10.3109/08830185.2012.755176>

Zahner, L., Donath, L., Faude, O., & Bopp, M. (2014). *Krafttraining im Alter: Hintergründe, Ziele und Umsetzung*. 6.

Żebrowska, E., Maciejczyk, M., Żendzian-Piotrowska, M., Zalewska, A., & Chabowski, A. (2019). High Protein Diet Induces Oxidative Stress in Rat Cerebral Cortex and Hypothalamus. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7).

<https://doi.org/10.3390/ijms20071547>

Zhu, Y., Liu, X., Ding, X., Wang, F., & Geng, X. (2019). Telomere and its role in the aging pathways: Telomere shortening, cell senescence and mitochondria dysfunction.

Biogerontology, 20(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s10522-018-9769-1>

Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., Trnkova, L., Kruseova, J., Eckschlager, T., & Kizek, R. (2012). Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology Letters*, 4(6), 1247–1253. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.931>