



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

## Die Mikrokernhäufigkeit bei institutionalisierten Seniorinnen und Senioren

Verfasserin

Heidemarie Peherstorfer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, September 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Ernährungswissenschaften

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



## INHALTSVERZEICHNIS

I.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	III
II.	TABELLENVERZEICHNIS .....	IV
III.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V
1.	EINLEITUNG .....	1
2.	LITERATURÜBERSICHT .....	2
2.1.	DER CYTOKINESIS-BLOCK MICRONUCLEUS CYTOME ASSAY (CBMN) .....	2
2.2.	DER CBMN ASSAY EINE WELTWEIT ANGEWANDTE FORSCHUNGSMETHODE .....	5
2.2.1.	Mikrokerne in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht .....	8
2.2.2.	Assoziation von Mikrokernen mit neurodegenerativen Krankheiten	12
2.2.3.	Mikrokerne und ernährungsbedingte Faktoren.....	14
2.2.4.	Mikrokerne als Biomarker für ein erhöhtes Krebsrisiko .....	18
2.2.5.	Mikrokerne und körperliche Aktivität.....	20
2.2.6.	Sarkopenie .....	21
3.	Material und Methoden .....	26
3.1.	Studiendesign (von Klemens Krejci).....	26
3.1.1.	Rekrutierung der Probanden .....	26
3.1.2.	Interventionsphase .....	28
3.1.3.	Trainingsintervention.....	28
3.1.4.	Ernährungsintervention .....	29
3.2.	Verwendete Reagenzien und Materialien .....	30
3.3.	Probenaufbereitung.....	31
3.3.1.	Arbeitsanleitung Medium.....	31
3.3.2.	Lymphozytenisolation.....	31

3.3.3. Zellzahlbestimmung .....	32
3.3.4. Inkubation.....	32
3.3.5. Zentrifugation im Cytospin.....	33
3.3.6. Färbung.....	33
3.3.7. Eindeckeln.....	34
3.4. Zählkriterien .....	34
3.4.1. Vorgegebene Zählkriterien für CBMN Assay nach M. Fenech (2007) .....	35
3.4.2. Vereinbarte Punkte der Auszählung:.....	37
3.5. Statistische Auswertung.....	37
4. Ergebnisse am Beginn der Studie zum Zeitpunkt T1 .....	39
4.1. Deskriptive Statistik.....	39
4.2. Darstellende Statistik .....	40
4.2.1. Korrelationen zwischen Alter, Nekrose und MNi Anzahl .....	41
4.2.2. Korrelation von SPPB und BMI .....	44
4.2.3. Korrelationen von BMI, Alter, Nekrose Häufigkeit und MNi total ..	45
4.2.4. Mittelwertvergleiche zu Beginn der Studie (T1).....	48
4.2.5. Geschlechtsspezifische Unterschiede der MNi Frequenz und anderer Parameter.....	51
5. DISKUSSION.....	54
6. SCHLUSSBETRACHTUNG .....	57
7. ZUSAMMENFASSUNG.....	58
8. ABSTRACT .....	60
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	62

## I. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: MNi und NPBs Bildung in BN Zellen nach Blockierung der Zytokinese durch Cytochalasin B. ....	4
Abb. 2: Der Effekt von Alter und Geschlecht auf die MNi Frequenz in PBL. ....	6
Abb. 3: altersabhängige Veränderung der Mni Frequenz bei Männern und Frauen.....	9
Abb. 4: Mechanismen die zu sex chromatin positiven MNi in Abhängigkeit vom Alter führen .....	12
Abb. 5: MNi Frequenz in PBL in Abhängigkeit der Aufnahme der Nährstoffe ...	15
Abb. 6: Metabolismus von Folsäure.....	17
Abb. 7: Korrelation von Alter und Nekrose Häufigkeit zum Zeitpunkt T1.....	41
Abb. 8: Korrelation von MNi Frequenz mit dem Alter zum Zeitpunkt T1.....	42
Abb. 9: Korrelation der MNi total Frequenz zum Zeitpunkt T1 mit dem Alter ....	43
Abb. 10: Korrelation von BMI und SPPB.....	44
Abb. 11: Korrelation von BMI und Alter.....	45
Abb. 12: Korrelation zwischen Nekrose und BMI .....	46
Abb. 13: Vergleich der MNi total in 1000 BN Zellen mit dem BMI .....	47
Abb. 14: Vergleich der Zellzahl aller 3 Gruppen am Beginn der Studie (MW ± SD).....	48
Abb. 16: Anzahl von MNi und MNi total in den einzelnen Testgruppen .....	50
Abb. 17: Unterscheidung von MNi und MNi total in Abhängigkeit vom Geschlecht in 1000BN .....	51
Abb. 18: geschlechtsspezifischer Unterschied von Bridges und Buds in 1000 BN.....	52
Abb. 19: Mittelwert Vergleich von Apoptose und Nekrose .....	53

## II. TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Zusammensetzung von FortiFit .....	30
Tab. 2: verwendete Reagenzien .....	30
Tab. 3: verwendete Materialien .....	30
Tab. 4: Parameter aus CBMN Assay in Abhängigkeit des Geschlechts .....	40

### III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>BMI</b>	Body Mass Index
<b>BN</b>	Binucleare Zellen
<b>CBMN</b>	Cytokinesis-block micronucleus cytome assay
<b>DHEA</b>	Dehydroepiandrosteron
<b>dTMP</b>	Desoxythymidinmonophosphat
<b>dUMP</b>	Desoxyuridinmonophosphat
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>GH</b>	Growth Hormon
<b>GSH</b>	reduzierte Glutathione
<b>GSSH</b>	oxidierte Glutathione
<b>MNi</b>	Mikrokerne
<b>NBUDs</b>	nuclear Buds
<b>NPBs</b>	nucleoplasmic Bridges
<b>NDI</b>	nuclear Division Index
<b>NDCI</b>	nuclear Division cytotoxicity Index
<b>PBL</b>	peripherale Blutlymphozyten
<b>SPPB</b>	Short Physical Performance Battery



## 1. EINLEITUNG

Chromosomale Instabilität und DNA Schäden sind die Ursache vieler Krankheiten, besonders die Entstehung von Krebs wird damit häufig in Verbindung gebracht [Jones et al., 2012].

Wichtige Biomarker der Genom Instabilität sind Mikrokerne, nucleoplasmatische Brücken und Buds, deren Frequenz in der Zweikernzelle durch die Anwendung des CBMN Assay sichtbar wird [Fenech M., 2007].

Die Mikrokern Häufigkeit kann auch durch einen spontanen Anstieg verursacht werden, der in Verbindung gebracht wird mit dem steigenden Alter der Betroffenen [Jones et al., 2012].

Der Frage, wie sich die Mikrokern Frequenz der SeniorInnen mit steigendem Alter verändert, und welchen Einfluss geschlechtsspezifische Unterschiede haben, wird in dieser Diplomarbeit nachgegangen. In diesem Zusammenhang werden auch nucleoplasmatische Brücken und Buds, sowie die Apoptose und Nekrose von Zellen beurteilt. Korrelationen mit den Werten des BMI und des Short Physical Performance Battery (SPPB) der Probanden und den genannten Parametern werden ebenso beobachtet.

Diese Diplomarbeit ist Teil der Studie der Forschungsplattform Active Ageing der Universität Wien zum Thema „Die Auswirkungen von Ernährungsoptimierung und Bewegung auf die Gesundheit und Mobilität älterer Menschen“. Diese randomisierte, Beobachter-blinde, kontrollierte Interventionsstudie wird zwei Jahre durchgeführt und umfasst ein Trainingsprogramm, ein Trainings- und Supplementationsprogramm, oder ein Kognitionsprogramm. Die TeilnehmerInnen wurden nach einer Eingangsuntersuchung zufällig, aber stratifiziert nach SPPB, Geschlecht und Altersgruppe entweder der Gruppe Training, Training&Ernährung oder der Kognitionsgruppe zugewiesen.

Für diese Diplomarbeit wurden die genannten Parameter mittels CBMN Assay in peripheren Blutlymphozyten bestimmt.

Ein Teil (Studiendesign) des Material- und Methodenteils dieser Arbeit wurde gemeinsam mit Klemens Krejci verfasst.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. DER CYTOKINESIS-BLOCK MICRONUCLEUS CYTOME ASSAY (CBMN)

Der Cytokinesis-block micronucleus cytome assay (CBMN Assay) ist eine der am häufigsten angewandten Methoden zur Messung von DNA Schäden. Der Einfluss einer Vielzahl von genotoxisch wirkenden Stoffen auf die Zytokinese kann sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* analysiert werden [El-Zein et al., 2011].

Durch Anwendung des CBMN Assay werden die Zellen zur Mitose angeregt und im Stadium der Zweikernzelle (BN) wird die Zellteilung durch Cytochalasin B gestoppt. DNA Schäden werden als Mikrokerne (MNi), nucleoplasmatische Brücken (NPBs) und nucleoplasmatische Buds (NBUDs) sichtbar und nur in den BN Zellen gezählt, um Störfaktoren zu vermeiden. Zytostatische Effekte werden an der Anzahl der Ein-, Zwei- und Mehrkernzelle erkannt, die Zytotoxizität wird durch das Verhältnis Apoptose zu Nekrose aufgezeigt [Fenech et al., 2011].

MNi entstehen durch Chromosomenbrüche und Malsegregation und sind wichtige Biomarker einer Genominstabilität [Migliore et al., 2011].

Sie bilden sich in der Anaphase der Kernteilung als azentrische Chromosomen Fragmente (Chromosomenbrüche) oder durch Abspaltung eines Chromosoms (Chromosomenverlust).

MNi aus azentrischen Chromosomen Fragmenten entstehen durch fehlerhafte Reparatur nach DNA Doppelstrangbrüchen und, seltener, durch Ausbleiben der Reparaturmechanismen. Dies ist nur der Fall, wenn die DNA Schäden die Reparaturkapazität der Zellen überschreiten.

Auch ungeeignete komplementäre Basen in DNA Abschnitten, anschließende Entfernung dieser und fehlende Spaltfüllung führt zu DNA Doppelstrangbrüchen und damit zu MNi.

Für die Ursache der Chromosomenmalsegregation gibt es mehrere Erklärungen, eine davon ist die Hypomethylierung der Cytosine der DNA.

Die damit verbundene Reduktion von Chromatin beeinflusst die Bindung der Mikrotubuli des Spindelapparats am Kinetochor und an den Chromosomen, dadurch können teilweise Schwesternchromatiden nicht aufgelöst und auch nicht zum Pol des Spindelapparats gezogen werden. Diese Chromosomen verbleiben im Zytoplasma als MNi.

Der Anordnung der Kinetochor Proteine am Centromer kommt eine wesentliche Rolle in der Interaktion zwischen Mikrotubuli und Chromosomen zu. Die, durch die Hypomethylierung der Cytosine verursachten Defekte am Kinetochor sind verantwortlich für die mangelhafte Bindung zu den Mikrotubuli. Weitere Ursachen der MNi Bildung sind abnormale Centrosom Vergrößerung, Mitose Überprüfungsdefekte und Defekte am Spindelapparat.

NPBs bilden sich wenn die Centromere von dizentrischen Chromosomen in der Anaphase zum entgegengesetzten Spindelpol gezogen werden. Die Brücke würde bei Weiterführung der Zytokinese brechen, durch das im CBMN - Assay eingesetzte Cytochalasin B wird die Zellteilung gestoppt und durch die Färbung wird die Brücke sichtbar gemacht.

Die dizentrischen Chromosomen entstehen durch fehlende Reparatur von DNA Strangbrüchen oder durch eine Fusion der Telomere Enden. Verursacht wird diese Verbindung der Telomere durch falsche oder fehlende Proteine an den Telomere Enden und damit der Verlust der Schutzfunktion.

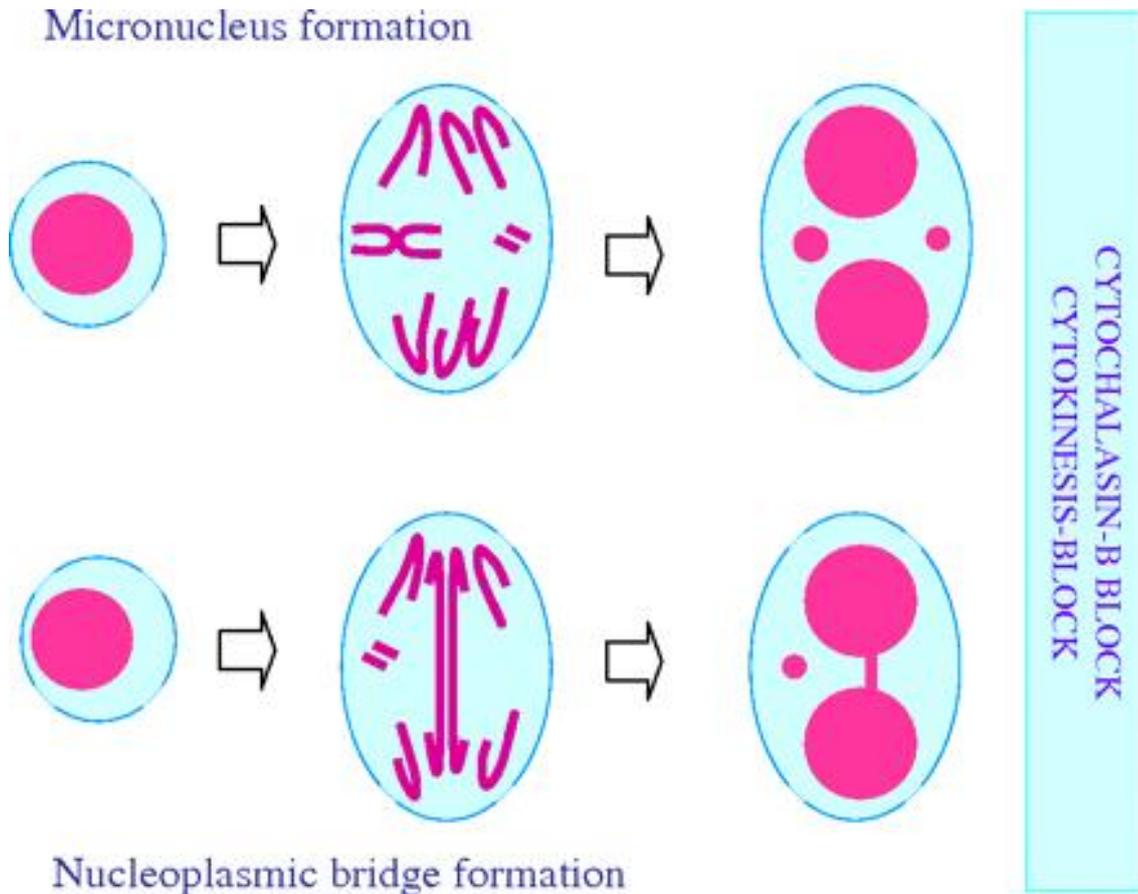


Abb. 1: MNi und NPBs Bildung in BN Zellen nach Blockierung der Zytokinese durch Cytochalasin B.  
[Fenech et al., 2011]

NBUDs entstehen durch verstärkte DNA Bildung, die als Knospung (nuclear budding) am Zellkern der BN Zelle angehaftet ist. DNA Verstärkung resultiert aus dem Rekombinationsprozess der homologen Regionen der Chromosomen. Nucleares budding tritt während der S-Phase des Zellzyklus auf und die NBUDs haben die gleiche Morphologie wie die MNi, sind jedoch durch Stiele mit dem Zellkern verbunden. Es wurde auch beschrieben, dass sich diese Knospen nach einer Y-Bestrahlung vom Kern lösen und dann als MNi gelten. NBUDs bilden sich auch durch Bruch von NPBs und die verbleibenden Reste werden als NBUDs sichtbar [Fenech et al., 2011].

Apoptose ist ein streng geregelter physiologischer Vorgang der dem Abbau und der Entfernung von Zellen dient. Abgestorbene Zellen werden durch Phagozytose entfernt. Es kommt zu keiner Entzündungsreaktion. Durch die

Apoptose werden stark proliferierende Zellen kontrolliert und eliminiert, wie z.B. während der Embryonalentwicklung zur Bildung der Extremitäten, sowie als Antwort auf Immunreaktionen und zum Abbau kranker Zellen (z.B. nach Sonnenbrand). Induziert wird die Apoptose durch TNF- , Glucocorticoide, p-53 Protein und Fas-Liganden.

Nekrose ist ein Zelltod der durch physikalische und chemische Einflüsse verursacht wird. Die Nekrose führt zum Platzen der Zelle und löst oft eine inflammatorische Reaktion aus [Koolman und Röhm, 2003].

Durch den Nuclear Division Index (NDI) wird die Zellteilungsrate proliferierter Zellen angegeben. Die Messung der Mitose Aktivität einer Zelle ist dadurch möglich und cytostatische Reaktionen werden erkannt. Gezählt werden 500 Zellen mit 1,2,3 oder 4 Kernen und der NDI wird mit folgender Formel berechnet:

$$\text{NDI} = (M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4) / N$$

$M_1$  .  $M_4$  gibt die Zellen mit Kernen von 1 . 4 an, N gilt für die Gesamtzahl der gezählten Zellen (ohne Apoptose und Nekrose).

Die Werte liegen in einem Bereich von  $1 < \text{NDI} < 2$ , bei einem Wert von 1 sind alle Zellen mononuclear, d.h. die Zellteilung fand nicht statt, anders bei einem Wert von 2, hier sind alle Zellen binuclear [Fenech M., 2007]

Der Nuclear Division Cytotoxicity Index (NDCI) berücksichtigt außerdem die Anzahl der Apoptosen und Nekrosen im Zellteilungszyklus.

$$\text{NDCI} = (\text{Apo} + \text{Nek} + M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4) / N \text{ [Randa et al., 2010].}$$

## **2.2. DER CBMN ASSAY EINE WELTWEIT ANGEWANDTE FORSCHUNGSMETHODE**

Das internationale Human Micronucleus (HUMN) Projekt wurde 1997 gegründet und ist ein weltweit koordiniertes Forschungsprojekt, das sich mit DNA Schäden und ihren Auswirkungen auf die Mikrokern Frequenz befasst. Diese MNi Tests werden an Lymphozyten und Epithelzellen durchgeführt und sollen die

Auswirkungen verschiedener Umwelteinflüsse auf Chromosomenschäden untersuchen. In den ersten 10 Jahren wurden Richtlinien für die Tests in den Labors festgelegt [Fenech et al., 2011].

Weltweit wird nun der CBMN Assay angewendet, der die Vorgangsweise zur Aufbereitung der Zellen vorgibt. Durch die Koordination verschiedenster Studien wurden Daten gesammelt und die sich daraus ergebenden Einflussfaktoren dienen als Grundlage für weitere Studien.

In diesem Zusammenhang wurde der Einfluss von Alter, Geschlecht, Krebserkrankung und Zigarettenkonsum auf die MNi Häufigkeit an etwa 7000 Personen getestet. Daraus konnte man beobachten, dass die MNi Frequenz bei beiden Geschlechtern mit dem Alter anstieg, am stärksten nach dem dreißigsten Lebensjahr, wobei sich bei Frauen ein 19% höherer Anstieg feststellen ließ [Bonassi et al., 2001].

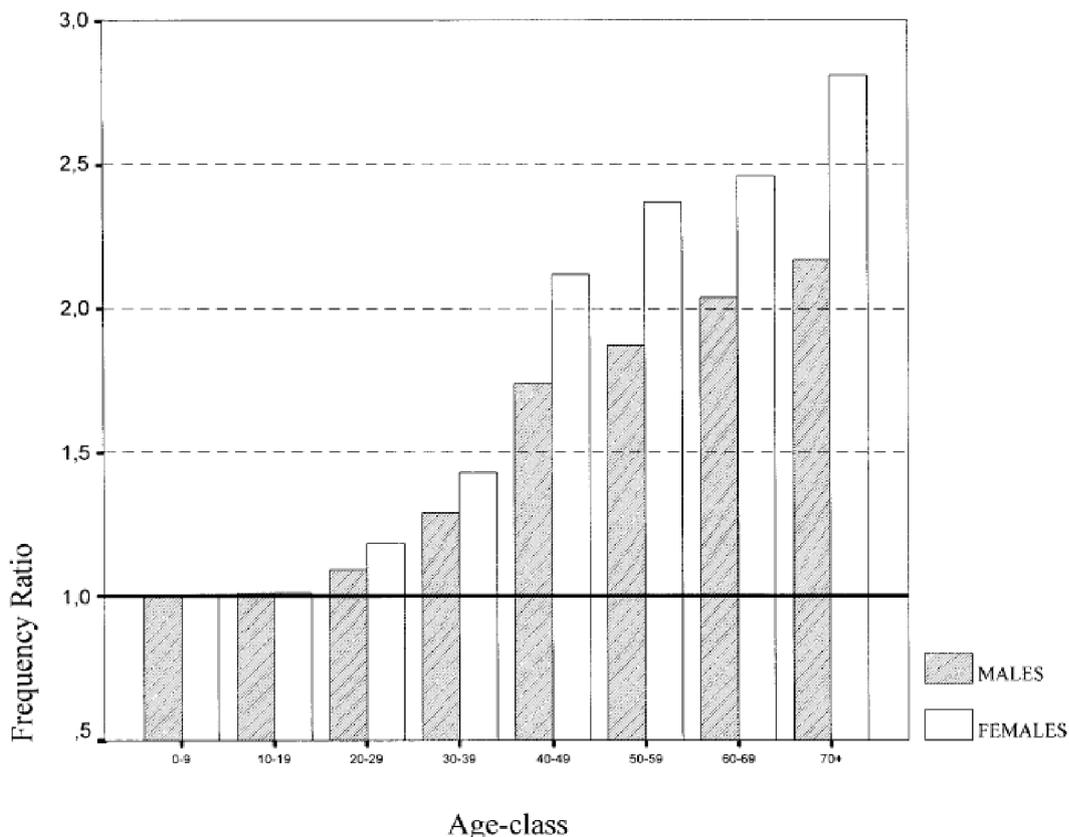


Abb. 2: Der Effekt von Alter und Geschlecht auf die MNi Frequenz in PBL. Alle Altersklassen ab 30 Jahre waren signifikant höher als die Referenzklasse von 0-9 Jahren [Bonassi et al., 2001].

Für die Studie zur Ermittlung eines erhöhten Krebsrisikos, verursacht durch Umwelteinflüsse und Lebensstil und MNi als mögliche Biomarker, wurden Daten des HUMN verwendet. Ein signifikanter Anstieg aller Krebserkrankungen, besonders im urogenital und gastrointestinal Trakt - in Verbindung mit mittlerer bzw. hoher MNi Frequenz - konnte festgestellt werden. Das Resultat dieser Studie bestätigte die Annahme, dass MNi als wichtige Biomarker für ein erhöhtes Krebsrisiko gelten [Bonassi et al., 2007].

Zigarettenkonsum und MNi zeigten eine negative Korrelation, wenn die Anzahl der Zigaretten nicht berücksichtigt wurde. Erst ab einem Konsum von mehr als 30 Zigaretten lässt sich ein Anstieg der MNi feststellen [Bonassi et al., 2003].

Neuere Studien belegen eine Assoziation zwischen Nitrosaminen der Zigaretten und der Zahl an MNi, Buds und NPBs bei Probanden mit Lungenkarzinom. Ob der Tabakkonsum für die Karzinombildung verantwortlich ist, muss noch in Studien mit Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern untersucht werden [El-Zein et al., 2008].

In einigen Studien wurden Schwangerschaftskomplikationen und kardiovaskuläre Erkrankungen mit der MNi Anzahl in Verbindung gebracht.

Über den Einfluss von Diät und Lebensstilfaktoren existieren nur wenige Daten.

Ausführliche Beschreibungen un

Zuordnungen dieser Einflussfaktoren sind erforderlich, um aussagekräftige Ergebnisse zu bekommen.

Bisherige Studien beziehen sich hauptsächlich auf SNPs (single . nucleotide polymorphism), in weiterführenden Studien könnten auch spezielle Gene und damit verbundene MNi untersucht werden [Fenech et al., 2011].

### ***2.2.1. Mikrokerne in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht***

In mehreren Studien wurde der Zusammenhang zwischen Alter und genetischer Instabilität untersucht. Die MNi Frequenz steigt mit dem Alter und ist generell bei Frauen höher als bei Männern [Fenech et al., 2005].

So auch in einer polnischen Studie, bei der die Korrelation einer altersbedingten Veränderung der Hypoploidie und das Auftreten von Mikrokernen beurteilt wurde. Teilgenommen haben 127 Männer und Frauen im Alter von 21-108 Jahren, wobei in der Gruppe der Hundertjährigen 46 Frauen im Alter von 100-108 Jahren und 7 Männer zwischen 100-102 Jahren beteiligt waren. Der Einfluss der Hypoploidie auf die MNi Frequenz in den Lymphozyten aller Altersgruppen konnte beobachtet werden. Bei beiden Geschlechtern konnte ein Anstieg der MNi Häufigkeit bis zum Alter von 68 Jahren festgestellt werden, wobei Frauen allgemein einen geringfügig höheren Anstieg zeigten. In der Gruppe der Frauen von 20-50 Jahren war der Anstieg signifikant. In der Gruppe der 60-110jährigen kam es zu einer negativen Korrelation zwischen Alter und MNi Häufigkeit. Der Grund dafür scheint die langsamere Bildung dieser DNA Schäden zu sein [WOJDA et al., 2007].

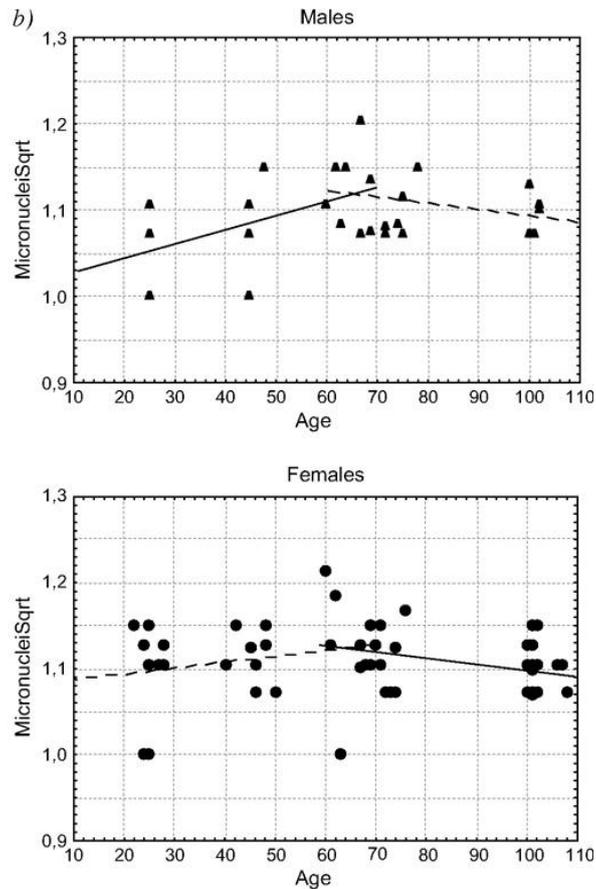


Abb. 3: altersabhängige Veränderung der Mni Frequenz bei Männern und Frauen [WOJDA et al., 2007]

Der Anstieg von MNi ist meist mit einer Erkrankung assoziiert, es wurde aber auch ein sogenannter spontaner Anstieg bei gesunden Testpersonen gefunden. Studien des human micronucleus (HUMN) consortium belegen eine Korrelation zwischen steigendem Alter und spontanem Anstieg der MNi Frequenz. Diese Studien zeigten auch einen geschlechtsspezifischen Unterschied, der zugrunde liegende Mechanismus war nicht bekannt [Fenech et al., 2011]

In einer Zwillings-Studie des Departments of Pathologie und des Departments of Human and Molecular Genetics der Virginia Commonwealth University wurde der Einfluss von genetischen und umweltbezogenen Faktoren auf einen spontanen Anstieg der MNi Frequenz untersucht.

Teilgenommen haben an dieser Studie 145 Personen, davon 63 Zwillingspaare und 19 Einzelpersonen. Die Zwillingspaare waren entweder beide weiblich oder

beide männlich. Das wurde so gewählt, um einen sogenannten „Confounder Effect“ zu vermeiden. Das Alter der Probanden lag zwischen 7 und 85 Jahren. Zur Ermittlung der MNI Frequenz wurde die Lymphozytenisolation - und Färbung nach Fenech durchgeführt. Um gesundheitliche, diätische und Lebensstil bezogene Aspekte zur Beurteilung berücksichtigen zu können, wurde ein „diet history“-Fragebogen von den TeilnehmerInnen ausgefüllt. In diesem Fragebogen wurde nicht nach dem gesamten Verzehr gefragt, sondern nach Häufigkeit der Aufnahme von grünem Blattgemüse, Früchten oder Fruchtsaft, Sojaprodukten, vitaminangereichertem Brot und Vitamin Supplementationen. Demographische Daten, wie Körpergewicht und Größe als auch häufig vorkommende Krankheiten (Hypertonie, Herzerkrankungen, Arthritis, Diabetes, Krebs, Heuschnupfen und Allergie, Kopfschmerzen und Migräne, Asthma, Essstörungen und Darmerkrankungen) wurden ebenfalls abgefragt. Bei den Erwachsenen wurden zusätzlich Punkte wie das Rauchverhalten, der Alkohol- und Drogenkonsum und bei Frauen der Beginn der Menstruation bzw. der Menopause berücksichtigt.

Als Resultat dieser Studie konnte eine höhere Frequenz an MNI mit steigendem Alter festgestellt werden, besonders zwischen dem 60. und 69. Lebensjahr. Ein signifikanter Anstieg war bei Frauen zu beobachten, ebenso signifikant war die Korrelation innerhalb der Zwillingspaare bezüglich der MNI Zahl. Als Ursache dieser Übereinstimmung wird das Alter und das Geschlecht angenommen, da Einflussfaktoren - wie bestimmte Krankheiten - zufällig (randomisiert) vorkamen.

Diätische Maßnahmen brachten eine signifikante Veränderung in der MNI Frequenz. Die Aufnahme von Früchten, grünem Blattgemüse und mit Folsäure angereichertes Brot, mindestens 5x pro Woche, führte zu einer Abnahme der MNI, hingegen brachten Supplementationen von Vitamin E und Multivitaminen eine Vermehrung der Frequenz.

Diätische und Lebensstil beeinflusste Variablen waren auch alters- und geschlechtsbezogen auf die MNI Anzahl. So führte Tabakkonsum nur bei Frauen zu MNI Anstieg, durch Vitamin D Aufnahme kam es zu einer

geringfügigen Verringerung der MNi bei Männern, die Calcium Einnahme brachte einen Anstieg der MNi bei Männern.

Die Beurteilung der Pubertät und der Menopause brachte ein überraschendes Ergebnis. Bei Mädchen als auch bei Burschen wurde nach Beendigung ihrer Pubertät ein signifikanter Anstieg der MNi festgestellt. Bei Frauen nach der Menopause zeigte sich das gleiche Ergebnis.

Gesundheitsbezogene Faktoren hatten unterschiedlichen Einfluss auf die MNi Häufigkeit. Der Body Mass Index brachte kein signifikantes Ergebnis, eine Allergie wiederum verursachte einen signifikanten Anstieg und durch Arthritis waren die MNi signifikant erhöht.

Aus diesen Beurteilungen lässt sich erkennen, dass sowohl genetische als auch bestimmte Umweltfaktoren einen Einfluss auf die spontane MNi Frequenz haben [Jones et al., 2011].

Andere Studien belegten die vermehrte Bildung von MNi bei Zellen mit X und Y Chromosomen mit steigendem Alter, ein deutlicher geschlechtsspezifischer Unterschied konnte nicht gefunden werden.

Der Frage, ob zwischen jungen und älteren Personen eine unterschiedliche Instabilität von X und Y Chromosomen besteht, wurde in einer Studie von Jones et al nachgegangen. Dazu wurden die MNi der binuclearen Zellen von 40 Probanden im Alter zwischen 40-80 Jahren und von jungen Probanden im Alter von 7-39 Jahren ausgewertet. Die Lymphozyten wurden nach Fenech aufbereitet und mit Hilfe der Fluoreszenz in situ Hybridisation (FISH) gezählt. Es ergab sich ein signifikanter Anstieg von multiplen Signalen der älteren Gruppe im Vergleich zur jüngeren. Diese multiplen Signale ergaben sich teils von Einzel MNi pro Zelle oder durch mehrere MNi pro Zelle. In dieser Altersgruppe waren auch stärker Chromosomenverluste an der Bildung von MNi beteiligt, wohingegen bei Jüngeren MNi durch Korrekturversuche an Chromosomen entstanden [Jones et al., 2012].

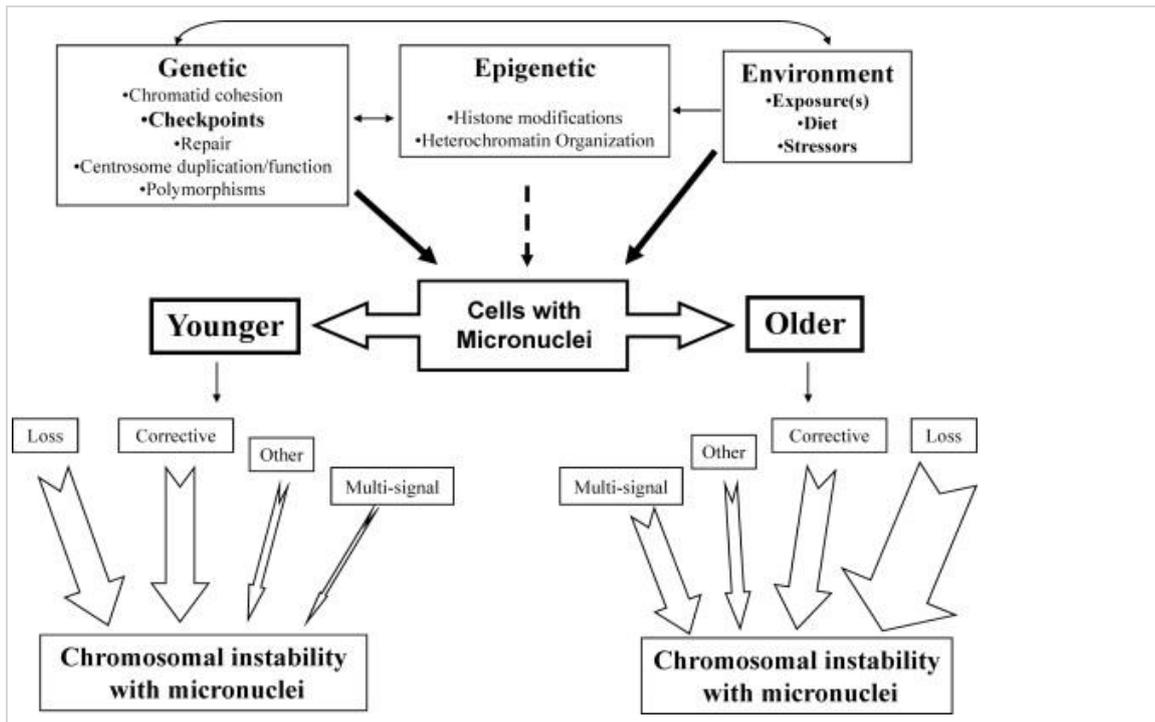


Abb. 4: Mechanismen die zu sex chromatin positiven MNi in Abhängigkeit vom Alter führen [Jones et al., 2012]

Der Zusammenhang zwischen MNi und den X Chromosomen bei Frauen wurde schon sehr früh erkannt. Bis zu 72% der MNi Formationen wurden bei X Chromosomen Defekten gezählt [Hando et al., 1994]

### **2.2.2. Assoziation von Mikrokernen mit neurodegenerativen Krankheiten**

Die Mikrokernhäufigkeit wurde auch in Zusammenhang mit verschiedenen neurodegenerativen Krankheiten untersucht. Studien darüber sind hauptsächlich bezogen auf Alzheimer und Parkinson Erkrankungen, während es für andere neurodegenerative bzw. neurologische Fehlfunktionen nur wenige Daten gibt.

Für die häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson gibt es keine verlässlichen Biomarker [Migliore et al., 2011].

Mit großem Interesse versucht man nun, durch Untersuchung auf Chromosomen Schäden, diese Erkrankungen in einem frühen Stadium zu erkennen und damit präventiv wirken zu können.

In diesem Zusammenhang wurde die Mikrokernhäufigkeit, die als Biomarker für Chromosomenbrüche und Malsegregation gilt, zur Beurteilung herangezogen [Migliore et al., 2011].

Der erste CBMN Assay wurde 1997 durchgeführt und zeigte eine hohe Anzahl an MNi in den Lymphozyten der Alzheimer Patienten [Migliore et al., 1997].

Durch Fluoreszenz in situ Hybridisation zeigte sich eine vermehrte Chromosomen 21 Aneuploidie bei Alzheimer Patienten. Das lässt vermuten, dass mosaicism for Trisomy of Chromosom 21%den Dementia Phenotyp bei Alzheimer Patienten als auch bei älteren Down Syndrom Patienten fördert [Migliore et al., 2011].

Ein ebenfalls verstärktes Auftreten von MNi in peripheralen Lymphozyten bei Parkinson Patienten als Ursache der Chromosomen Brüche wurde in Studien ermittelt. Für andere neurodegenerative Erkrankungen liegen kaum Daten vor, lediglich für neurodegenerative bzw. neurologische Komplikationen, die mit einer frühzeitigen Alterung einhergehen, gibt es einige Studienergebnisse.

So fand man in Zellen von Patienten mit Werners Syndrom, Ataxia telangiectasia, Cockayne Syndrome ein vermehrtes Auftreten von MNi, was eine Abhängigkeit zwischen frühzeitiger Vergreisung und DNA Schäden vermuten lässt [Migliore et al., 2011].

Als Ursache für neurovegetative Erkrankungen werden oxidativer Stress und Folsäuremangel genannt.

Oxidativer Stress, eine Imbalanz von freien Radikalen und Elimination dieser durch Antioxidantien, führt zu einer Genom Instabilität, die in einer erhöhten MNi Anzahl und vermehrter Apoptose resultiert [Mancuso et al., 2006].

Ein Folsäuremangel wiederum bewirkt eine Akkumulation von dUMP und damit eine geringere Bildung von dTMP, ein essentieller Bestandteil für die DNA

Synthese und Reparatur. Dadurch kommt es zu DNA Strangbrüchen und damit zu steigender MNi Häufigkeit [Migliore et al., 2011].

Durch weitere Studien soll nun die Möglichkeit einer frühzeitigen Erkennung von neurovegetativen Erkrankungen durch abnormale MNi Anzahl gegeben sein.

### **2.2.3. Mikrokerne und ernährungsbedingte Faktoren**

Die Aufnahme von Mikronährstoffen und ihre Wirkung auf die Genom Stabilität ist Ziel vieler interessanter Forschungsprojekte. Der Mikronährstoff Status spielt eine wichtige Rolle in der Prävention als auch in der Reduktion von DNA Schäden. Mikronährstoffe gelten als Co Faktoren wichtiger Enzyme, die für DNA Reparatur und Methylovorgänge der Genome verantwortlich sind. Sowohl ein Mangel als auch ein Überschuss können die Genom Integrität und damit die genetische Konstitution beeinflussen [Thomas et al., 2011].

Messungen an PBL zeigten in mehreren Studien eine signifikante Assoziation von MNi und der Plasmakonzentration bestimmter Mikronährstoffe [Fenech et al., 2011].

In einer von Fenech et al durchgeführten Studie wurden die Plasmakonzentration von Vitamin E, Calcium, Folsäure, Retinol, Nikotinsäure,  $\beta$ -Carotin, Riboflavin, Pantothen säure und Biotin und ihre Wirkung auf die MNi Frequenz untersucht. Verglichen wurden jeweils die höchsten und mittleren Aufnahmewerte dieser Nährstoffe mit den niedrigsten.

Bei einem Teil der 400 StudienteilnehmerInnen wurde die Wirkung von  $\beta$ -Carotin, Vitamin C, Vitamin E und dem Spurenelement Zink und ihr schützender Effekt auf die Genom Stabilität getestet. Dazu wurde einer Gruppe von 97 Personen diese Vitamine und das Spurenelement für 6 Monate als Supplement verabreicht. Diese Teilnehmer erhielten eine Tablette mit 18mg  $\beta$ -Carotin, 900mg Ascorbinsäure, 250mg d- Tocopherol und 12mg Zink, im Gegensatz zur Kontrollgruppe (93 Personen) die keine Supplementation bekam. Nach Ablauf der Studienzeit wurde in der Kontrollgruppe keine Veränderung der MNi Frequenz festgestellt, in der Interventionsgruppe jedoch eine 13%ige Reduktion beobachtet. Zu beachten bei diesem Ergebnis ist, dass durch die

Supplementation die täglich empfohlene Zufuhr um ein Vielfaches überschritten wird.

Bei den übrigen Studienteilnehmern wurden die oben genannten Mikronährstoffe durch die tägliche Ernährung aufgenommen und durch FFQ (food frequency questionnaire) protokolliert

Die Wechselwirkung zwischen der Aufnahme von Mikronährstoffen und der MNI Frequenz wurde mittels multivariater Regressionsanalyse beschrieben.

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der MNI bei höherer Aufnahme von Vitamin E, Calcium, Folsäure, Retinol, Nikotinsäure im Vergleich zur niedrigsten. Anders bei Riboflavin und Pantothenensäure, hier war die Steigerung der MNI besonders zwischen dem untersten und dem mittleren Level erkennbar. Die Aufnahme von Biotin im oberen Terzil war auch verbunden mit einem höheren Prozentsatz an MNI. Durch die mittlere Aufnahme (4000-6000µg) von  $\beta$ -Carotin ließ sich eine Reduktion feststellen, hingegen hatte eine erhöhte Zufuhr den gegenteiligen Effekt.

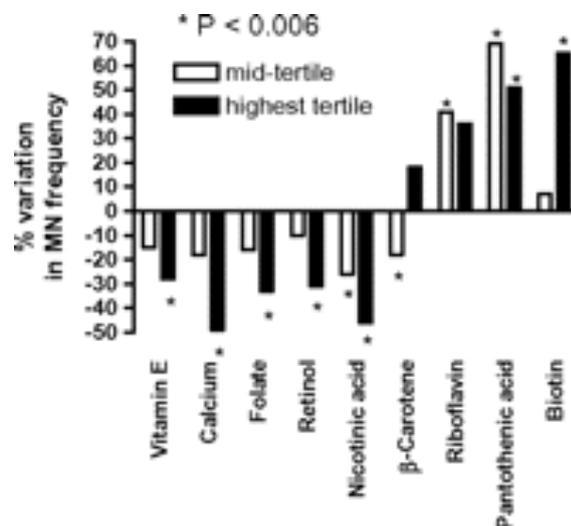


Abb. 5: MNI Frequenz in PBL in Abhängigkeit der Aufnahme der Nährstoffe [Fenech et al., 2005].

Weitere Tests befassten sich mit dem Effekt einer kombinierten Gabe von Calcium und Folat, da in einigen Studien diesen Stoffen eine krebspräventive Wirkung zugeschrieben wurde [Fenech et al., 2005].

Tatsächlich konnte auch in dieser Studie ein DNA Schutz festgestellt werden, der im höchsten Terzil an Calcium und Folat eine 60%ige Verringerung der MNi brachte. Negativen Einfluss auf die Genom Stabilität hat Riboflavin, das bei hohem Level und gleichzeitigem niedrigen Folat Status zu einer 42%igen Steigerung der MNi Häufigkeit führt.

Daraus kann man erkennen, dass das Dosis. Wirkungsprinzip beachtet werden muss, um Einfluss auf die Genstabilität ausüben zu können [Fenech et al., 2005].

Eine Über- oder Unterschreitung der empfohlenen Tagesdosis kann jedoch zu gesundheitlichen Problemen führen, ein erhöhtes Krebsrisiko wird häufig damit in Verbindung gebracht [Fenech et al., 2011].

Besonders zu beachten ist die Folatzufuhr, da die empfohlene Tagesdosis von 400 µg als Schutz vor kardiovaskulären Krankheiten und Krebs gilt.

Folsäure und Vitamin B12 erfüllen eine wichtige Funktion als Methylgruppen-Donatoren. Folsäure ist notwendig für die Synthese von Deoxythymidin Monophosphat (dTMP) aus Deoxyuridin Monophosphat (dUMP). Durch Folatmangel kommt es zur Akkumulation von dUMP und dadurch wird vermehrt Uracil anstatt Thymidin in die DNA eingebaut. Diese Veränderung verursacht Einzel- und Doppelstrangbrüche, Chromosomenbrüche und MNi Formationen.

Vitamin B12 ist ebenfalls Bestandteil dieses Methylgruppen Übertragungsmechanismus, indem es aus Homocystein Methionin bildet, mit Hilfe der freiwerdenden CH<sub>3</sub> Gruppe aus 5-Methyl Tetrahydrofolat. Methionin reagiert weiter zu S-Adenosylmethionin (SAM), das als Folge der Rückreaktion zu Homocystein eine CH<sub>3</sub> Gruppe freisetzt und damit zur Methylierung der DNA beiträgt. Daraus lässt sich die Wechselwirkung zwischen Folsäure und Vitamin B12 erkennen und erklärt deren Funktion im DNA Aufbau [Thomas et al., 2011].

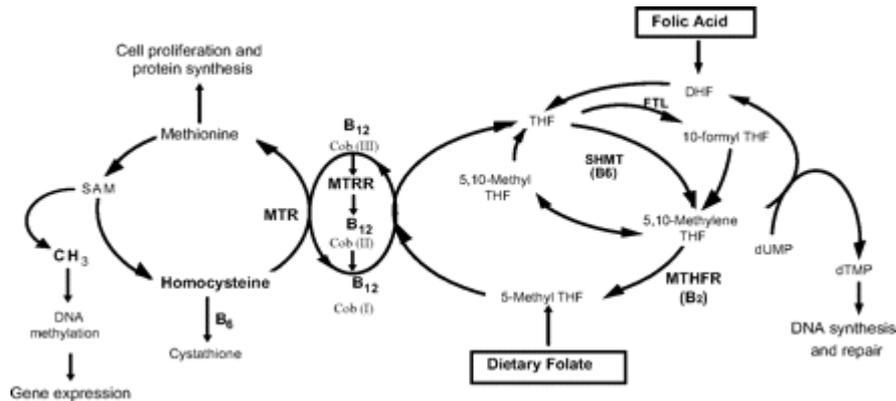


Abb. 6: Metabolismus von Folsäure  
[Thomas et al., 2011]

In vivo Studien zeigten, dass ein Vitamin B12 Defizit und hohe Homocystein Plasmawerte signifikant mit der MNI Bildung korrelieren. Interventionsstudien stellten eine Reduktion der DNA Schäden und damit verbundenen MNI Häufigkeit bei einer Folat Konzentration in den Erythrozyten von >700nmol/l, einer Plasmakonzentration von Vitamin B12 von >300pmol/l und einem Plasma Homocystein Wert von < 7,5µmol/l fest. Um diese Konzentrationen zu erhalten sind allerdings Aufnahmemengen weit über den DACH Referenzwerten notwendig.

Nach Abschluss einer Placebo kontrollierten Studie wurde die Gabe von 700µg Folsäure/Tag und 7µg Vitamin B12/Tag zur Aufrechterhaltung der Genomstabilität empfohlen. Mit steigendem Alter ist eine Aufnahme über den RDI aufgrund metabolischen Dysfunktionen besonders zu empfehlen [Fenech et al., 2001].

In einer späteren Studie wurde die Wirkung einer Supplementation von Folsäure und Vitamin B12 an Dialysepatienten getestet. Neben urämischen Toxinen wurde auch ein hoher Homocystein Wert festgestellt.

Das Ziel der Studie war zu erforschen, ob diese Supplementationen eine Verbesserung der Genom Schäden dieser Haemodialyse Patienten brachte. Eine Reduktion der DNA Schäden, gemessen an der MNI Anzahl der PBL, konnte nach Beendigung der Studie festgestellt werden [Stopper et al., 2008].

Über die Aufnahme von Makronährstoffen und ihre Wirkung auf die MNi Häufigkeit in PBL existieren keine Daten.

Es konnte jedoch in zwei Studien eine signifikante Assoziation zwischen der MNi Anzahl und dem Quecksilbergehalt im Blut der Probanden festgestellt werden. Als Ursache gilt der Konsum von Fisch aus Gebieten mit erhöhtem Quecksilbergehalt.

Die Aufnahme von Isoflavonoiden durch Sojaprodukte brachte nur in vitro eine vermehrte MNi Bildung, in vivo wurde keine Veränderung beobachtet [Fenech et al., 2011].

#### **2.2.4. Mikrokerne als Biomarker für ein erhöhtes Krebsrisiko**

Veränderungen in der Chromosomen Struktur und Chromosomen Zahl, als auch Genom Instabilität sind wichtige Determinanten der Krebsentstehung.

Studien belegen, dass MNi wichtige Biomarker für ein erhöhtes Krebsrisiko darstellen. Malsegregation von Chromosomen führen zu Aneuploidie und DNA Hypomethylierung und gelten als Initiatoren von Krebs. Diese DNA Schäden sind anhand der steigenden MNi Anzahl messbar [Fenech et al., 2005].

Für diese Messung und Beurteilung eines Krebsrisikos wird der CBMN Assay angewandt. Es ist eine einfache, schnelle und sensitive Testmethode, die häufig für klinische und epidemiologische Studien verwendet wird. Die Analyse von Subgruppen (Hochrisikogruppen z.B. Raucher/Nichtraucher) und multiplen Korrelationsmarkern - wie Alter, Geschlecht, Lebensstil, Umwelteinflüsse, berufliche Tätigkeit - wird in der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt und ermöglicht damit aussagekräftige Beurteilungen [El-Zein et al., 2011].

Die Assoziation zwischen MNi Häufigkeit und Krebs Entstehung wird hauptsächlich erklärt durch:

- (i) die MNi Anzahl steigt mit der Krebsanfälligkeit bei angeborenen Krankheiten,
- (ii) die Korrelation von genotoxisch, MNi induzierenden Stoffen und Karzinogenität und (iii) durch Vergleiche der MNi mit der Blutkonzentration von Mikronährstoffen [Bonassi et al., 2006].

Geringe Veränderungen in der Aufnahme von Mikronährstoffen zeigen schon Abweichungen der MNI Häufigkeit und deshalb kann die Bestimmung von Aufnahmelevels zur Prävention von Krebs beitragen.

In einer großangelegten Studie (6718 TeilnehmerInnen), unter Beteiligung von 10 Ländern und Ausarbeitung in 20 Labors wurde zwischen 1980 und 2002 die Krebshäufigkeit anhand der MNI Anzahl gemessen. Als Beurteilungsmethode wurden für alle Labors die MNI Häufigkeit in Terzile (<33%, 34-66%, >66%), eingeteilt und diese als niedrig, mittel oder hoch bezeichnet..

Ein signifikanter Anstieg der Krebserkrankung konnte bei mittlerer und hoher MNI Zahl festgestellt werden. Diese Assoziation stimmte mit den Ergebnissen aller Länder überein, betraf alle Krebsarten, besonders urogenital und gastrointestinal Krebs. Dieses Forschungsergebnis bestätigte die Annahme, dass MNI als Zeichen für ein erhöhtes Krebsrisiko gelten. Diese Erkenntnisse können für präventive Maßnahmen genutzt werden [Bonassi et al., 2006].

In einer serbischen Studie wurde die spontane genetische Veränderung von Krebspatienten an PBL untersucht. Unter Verwendung des CBMN Assays wurde der Effekt auf die MNI Häufigkeit bestimmt. Einflussfaktoren wie Alter, Geschlecht, Tabakkonsum, Lebensgewohnheiten und unterschiedliche Arten der Krebserkrankung wurden berücksichtigt. Das Alter der 44 Frauen und Männer in der Testgruppe lag zwischen 42 und 81 Jahren, ihre Krebserkrankung war gerade diagnostiziert worden und die Behandlung hatte noch nicht begonnen. Verglichen wurde mit 40 gesunden Personen der Kontrollgruppe im Alter von 31 bis 70 Jahren.

Die statistische Analyse zeigte einen signifikanten Anstieg an MNI bei Krebspatienten, aber keinen signifikanten Unterschied bei Rauchern und Nichtrauchern beider Gruppen. Zwischen Alter, Geschlecht, Krebsart und MNI Häufigkeit wurde kein signifikanter Zusammenhang festgestellt [Milosevic-Djordjevic et al., 2010].

In einer früheren Studie von Murgia et al, konnte keine Korrelation zwischen MNI Anzahl und Krebserkrankung beobachtet werden. Zu beachten ist, dass beide Studien mit geringer Probandenzahl durchgeführt wurden.

Durch eine Meta-Analyse von Iarmarcovai et al. erhielt man mehr Informationen über die Evidenz von MNi Bildung und das damit verbundene Krebsrisiko.

Dazu wurden 37 Publikationen der Medline/Pubmed Datenbank ausgewertet und das gemeinsame Studiendesign beinhaltete eine Klassifizierung der Studien in drei Gruppen:

- a) Studien von unbehandelten Krebspatienten versus gesunder Kontrollgruppe
- b) Studien von Schilddrüsenkrebs Erkrankten nach Radiojodtherapie versus Basiswerten
- c) Studien aus Messungen der Radiosensitivität der Lymphozyten von unbehandelten Krebspatienten versus gesunder Kontrollgruppe.

Ein signifikanter Anstieg der MNi Häufigkeit wurde anhand der Frequenz Ratio ( $FR_i = \text{MNi Patient} / \text{MNi Kontrolle}$ ) für die unbehandelten Krebspatienten und die Schilddrüsenkrebs Patienten nach der Radiojodtherapie beurteilt. In der dritten Gruppe konnte ein negativer Trend der  $FR_i$  - abhängig von der Dosis der radioaktiven Strahlung - festgestellt werden.

Dieses Ergebnis bestätigt die Funktion der MNi in der Karzinogenese und zeigt somit, dass unbehandelte Krebspatienten ein höheres Level an MNi haben als gesunde Personen [Iarmarcovai et al., 2008].

### **2.2.5. Mikrokerne und körperliche Aktivität**

Die Beeinflussung der MNi Häufigkeit durch körperliche Aktivität ist Inhalt einiger Forschungsobjekte. In einer Studie von Pittaluga et al. wurden verschiedene Trainingsstufen mit dem Level des oxidativen Stress und dessen Auswirkung auf bestimmte Parameter verglichen. Gemessen wurde der oxidative Stress an folgenden Parametern:

- Total antioxidativer Status (TAS)
- Vitamin C Status
- Glutathione GSH/ GSSG Verhältnis
- Konjugierte Diene und Hämolyse
- Hsp 70 Protein Expression

- Apoptose und Nekrose
- MNi Häufigkeit

Tests wurden an 12 untrainierten und 6 professionellen Athleten durchgeführt. Mit dem Ergebnis, dass bei Untrainierten höhere Werte an oxidiertem GSSG, Hämolyse und MNi analysiert wurden. Probanden im niedrigsten Trainings Level zeigten eine bessere Balance an den untersuchten Parametern im Vergleich zu den übrigen Studienteilnehmern

[I Pittaluga et al., 2006].

In einer weiteren Studie wurde der Effekt der körperlichen Aktivität und anderer Lebensstilfaktoren an der MNi Anzahl in den Lymphozyten gemessen.

Beteiligt an der Studie waren 208 japanische Metallarbeiter, die je nach Lebensstil (gut, moderat, schlecht) in drei Gruppen eingeteilt wurden. Die Einteilung erfolgte nach Beantwortung von 8 gesundheitsrelevanten Fragen, deren Gesamtbeurteilung als Health Practice Index (HPI) angegeben wurde. Zur genaueren Betrachtung wurden auch die Einzelkomponenten analysiert und die MNi Häufigkeit in den PBL untersucht. Erwartungsgemäß war der HPI negativ korreliert mit der MNi Häufigkeit. Eine körperliche Betätigung weniger als 2 x pro Woche korreliert mit einem Anstieg an MNi, gleiches gilt für Ernährungsunbalancen, Schlaf unter 6 Stunden, Arbeitszeiten über 9 Stunden/Tag und starker Tabakkonsum. Mentaler Stress, Alkoholkonsum und tägliches Frühstück hatten keinen Effekt auf die MNi Zahl [Huang et al., 2009].

### **2.2.6. Sarkopenie**

#### **a) Definition**

Der erste, der den Begriff Sarkopenie mit dem Verlust der Muskelmasse in Verbindung brachte, war I.H. Rosenberg [Rosenberg, 1989].

Sarkopenie leitet sich vom griechischen *ssarx* für Fleisch und *spenia* für Mangel ab [Rosenberg, 1997].

Der Verlust der Muskelmasse und Muskelkraft schließt häufig einen Funktionsverlust der Muskeln mit ein, besonders bei Spitalspatienten, nach Knochenbrüchen und bei verminderter Beweglichkeit. Ein Muskelmasseverlust beginnt etwa mit dem 40. Lebensjahr. Bis zum 70. Lebensjahr werden schätzungsweise pro Dekade 8% und ab dem 70. Lebensjahr 15% pro Dekade an Muskelmasse abgebaut.

Der Abbau der Muskelkraft ist noch dramatischer. Bis zum Alter von 70 Jahren werden pro Dekade 10-15%, danach 25-40% an Muskelkraft verloren [Goodpaster et al., 2006].

Der Muskelmasseverlust tritt häufiger bei Männern auf als bei Frauen [Iannuzzi-Sucich et al., 2002].

Die Tatsache, dass ältere Menschen weniger hungrig und schneller satt sind, erklärt die damit verbundene Malnutrition, die als eine Ursache einer verminderten Muskelmasse erklärt wird. Dem Anstieg der Cytokine, wie IL-6, wird eine wesentliche Rolle zugeschrieben, da es bei einem Übermaß dieses Botenstoffs einerseits zu Appetitlosigkeit und andererseits zu katabolen Prozessen der Muskeln kommt.

## **b) Diagnostik**

Eine einheitliche Messmethode bei der Diagnose der Sarkopenie wird nicht angegeben.

Magnetresonanztomographie (MRI), Dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) und Bioelectrical impedance analysis (BIA) kommen als Tests zum Einsatz.

MRI ist eine sehr genaue, spezifische Testmethode, die die gesamte und segmentale Berechnung der Muskelmasse als auch deren Fettqualität ermöglicht. Sie wird nicht routinemäßig angewendet, auf Grund der damit verbundenen hohen Kosten und des speziell geschulten Personals, das dafür notwendig ist.

DEXA wird zur Analyse der Körperzusammensetzung, des Fettgehalts und der Knochendichte Messung verwendet und kommt häufig in Kombination mit der BIA zum Einsatz.

Die BIA dient der Messung der Körperzusammensetzung und wird durch ihre einfache Anwendung auch zur Berechnung der Muskelmasse verwendet. Sie ist die beste Lösung für den Einsatz bei Feldstudien [Malafarina et al., 2011].

Funktionelle Tests, wie der Short Physical Performance Battery (SPPB), werden zur Beurteilung der körperlichen Leistungsfähigkeit angewendet. Die Einteilung erfolgt in 3 Levels:

SPPB 0. 6 Low Performance

SPPB 7. 9 Intermediate Performance

SPPB 10. 12 High Performance

[Cruz-Jentoft et al.,2010].

### **c) Pathophysiologie**

Als Ursachen der Sarkopenie werden neurologische, muskuläre, endokrine und diätische Faktoren genannt.

Altersabhängige Veränderungen des motorischen Nervensystems - im speziellen der Verlust eines alpha Motoneurons und damit einer motorischen Einheit - resultieren in geringerer Effizienz der Muskulatur und raschen Ermüdungserscheinungen bei alten Menschen. Der Neuronenverlust führt zu geringerer Koordination und Präzision der Muskulatur [Roubenoff R., 2011].

Die altersbedingte Atrophie der Typ II Muskelfaser (schnelle Muskelfasern) verursacht eine verzögerte Muskelkontraktion. Gleichzeitig kommt es zu einer geringeren Proteinsynthese in den Muskeln und den Mitochondrien. Dieser veränderte Proteinumsatz, erkennbar als Abbauprozess der Proteine, wird durch verstärkte Apoptose Rate sichtbar [Rice et al., 2006].

Cytokine, TNF-alpha, IL-6, IL-1, C-reaktives Protein, sind bei älteren Menschen erhöht und führen einerseits zum Anstieg von Glucocorticoiden und Catecholaminen und andererseits zu einer Verminderung der Sexual- und Wachstumshormone [Thomas D.R., 2010].

Pro inflammatorische Cytokine, besonders IL-6 und TNF-alpha, werden durch ihre Proteolyse fördernde Wirkung als auslösende Faktoren der Sarkopenie beschrieben. Der Abbau der Proteine bzw. deren verminderte Aufnahme wird

mit dem Verlust der Muskelmasse und Muskelkraft assoziiert [Visser et al., 2002].

Im Alter verändert sich die Körperzusammensetzung durch den Abbau der lean body mass, wodurch es zur Reduktion der Muskelmasse kommt. Der BMI kann daher aber unverändert sein durch gleichzeitigen Anstieg der Fettmasse, bei Frauen im Hüftbereich, bei Männern im Bauchbereich [Sieber C.C., 2009].

Bei Patienten mit Sarkopenie und Fettleibigkeit wurde eine vermehrte Zunahme der Fettmasse auf Kosten der Muskelmasse beobachtet [Burton et al., 2010].

Durch Übergewicht und Fettleibigkeit wird die IL-6 Produktion besonders angeregt und führt in Folge zu erhöhter Fettmasse. Der Hormonsstatus spielt hier eine wesentliche Rolle in der Veränderung der Körperzusammensetzung. Niedrige Testosteron- und Wachstumshormonwerte werden mit dem Anstieg von Fettmasse assoziiert [Jensen G.L., 2008].

Sarkopenie wird auch bei Patienten diagnostiziert, die an Anorexie und/oder Unterernährung leiden; beide Formen treten häufig bei Älteren auf. Soziale und medizinische Faktoren zeichnen dieses Krankheitsbild aus.

Bewegungsarmut, insbesondere Bettlägrigkeit, führen bei älteren Personen rascher zu verminderter Muskelmasse als bei jüngeren [Kortebein et al., 2007].

Sarkopenie wird häufig mit Kachexie verglichen, wobei hier ein starker Gewichtsverlust neben einer Grundkrankheit auftritt. Besonders entzündliche Prozesse bewirken eine katabole Stoffwechsellage, führen zur Auszehrung und Verlust der Fett- und Muskelmasse. Eine genaue Trennung beider Erkrankungen ist oft nicht möglich, da kachektische Patienten auch an Muskelschwund, verminderter Muskelkraft und funktionellen Defiziten leiden [Drey M. und Kaiser M.J., 2011].

#### **d) Behandlung**

Positiv beeinflusst wird die Muskelmasse und Muskelstärke durch körperliches Training, wobei dies nicht ausreicht um den Defizit zu beheben.

Diätische Maßnahmen - im speziellen eine proteinreiche Diät - dient der Prävention und Behandlung und ist in Kombination mit physikalischen Übungen die bevorzugte Therapiemethode [Taaffe DR., 2006].

Verschiedene pharmazeutische Möglichkeiten werden getestet, wie z.B. Growth Hormon (GH), Testosteron, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Vitamin D.

Wachstumshormon Supplementationen bewirken einen Anstieg der Muskelmasse, reduzieren Fett und verringern die Knochendemineralisierung.

Sie führen nicht zu einer Verbesserung der Muskelkontraktion und -funktion und sind gekennzeichnet durch eine Reihe schwerer Nebenwirkungen.

Ähnliches gilt für das Steroidhormon Testosteron, das zur Erhöhung der Muskelmasse führt, jedoch wegen verschiedener nachteiliger Effekte kontraindiziert ist.

Die Wirkung von DHEA, dem Vorläufer der Sexualhormone, beruht auf einer Verbesserung der Knochendichte, eine Veränderung der Muskelmorphologie konnte nicht festgestellt werden.

Der Vitamin D Status ist bei älteren Personen allgemein niedrig und wird assoziiert mit geringer Muskelstärke und Statin induzierter Myopathie. Supplementationen verbessern die Funktionalität und Stärke der Muskeln und verringern damit das Sturzrisiko älterer Personen [Malafarina et al., 2011].

Sarkopenie ist nicht eindeutig definiert, die Entstehung der Erkrankung ist nicht einheitlich beschrieben. Hauptverantwortlich scheinen entzündliche Prozesse zu sein, für die ältere Menschen besonders prädisponiert sind. Die Wirkung von anti-inflammatorischen Behandlungsmethoden wurde bisher nicht berücksichtigt und sollte erforscht werden. Eine frühzeitige Diagnose sollte dazu beitragen, dass alte Menschen länger unabhängig leben können und Krankenhausaufenthalte vermieden werden.

Welchen Einfluss Supplemente auf die Entwicklung von Sarkopenie nehmen können sollte noch weiter erforscht werden [Malafarina et al., 2011].

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Studiendesign (von Klemens Krejci)**

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

Die Studie ist eine randomisierte, Beobachter-blinde, kontrollierte und monozentrische Interventionsstudie mit 3 Parallelgruppen. Die teilnehmenden ProbandInnen wurden jeweils einer Gruppe zugeteilt, die sich wie folgt zusammensetzen: Gruppe Krafttraining, Gruppe Krafttraining&Ernährung, Kognitionsgruppe. Im Rahmen der Studie wurden viele Biomarker analysiert, in dieser Arbeit wird das Mikrokernvorkommen mit der CBMN . Methode ermittelt. Die Ethikkommission der Stadt Wien genehmigte die Durchführung der Studie

##### ***3.1.1. Rekrutierung der Probanden***

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

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

Projekt gewonnen werden und somit wurde auch die gewünschte Personenzahl erreicht.

Die StudienteilnehmerInnen mussten folgende Kriterien erfüllen:

**Einschlusskriterien:**

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

**Ausschlusskriterien:**

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

Um die körperliche Leistungsfähigkeit und die Eignung der ProbandInnen für die Untersuchungen zu ermitteln, wurden anthropometrische Daten (Größe,

Gewicht, Körperfett) erfasst, ein 6min Walkingtest und funktionelle Krafttests zur Feststellung des allgemeinen Kraftniveaus durchgeführt. Der SPPB bestand aus einem Koordinationstest, einem Ganggeschwindigkeitstest und dem chair raise test als Krafttest der unteren Extremitäten.

### **3.1.2. Interventionsphase**

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

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

### **3.1.3. Trainingsintervention**

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

#### **Ablauf des Trainings:**

- Aufwärmen: - Balancetraining  
-10 Minuten
- Hauptteil: - Stabilisationstraining mit eigenem Körpergewicht  
-Übungen mit dem Theraband  
-30 Minuten
- Abschluss: -Abwärmen  
-Entspannung

-10 Minuten

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

### **3.1.4. Ernährungsintervention**

Eine Trainingsgruppe erhielt neben dem Krafttraining zusätzlich eine Ernährungsintervention in Form von FortiFit der Firma Nutricia. Dieses Produkt enthält eine hohe Konzentration von Leucin und weiteren essentiellen Aminosäuren. Dies soll die Muskelproteinsynthese fördern und die Kraft und Funktion der Muskeln unterstützen und einer Sarkopenie entgegenwirken.

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

In den Heimen erfolgte die Zubereitung durch das Küchenpersonal und wurde von den TeilnehmerInnenInnen 7x/Woche zum Frühstück eingenommen.

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

Tab. 1: Zusammensetzung von FortiFit

### 3.2. Verwendete Reagenzien und Materialien

<b>Sodium</b>	<b>Einheit</b>	<b>Hersteller</b>
RPMI 1640 steril	500ml	PAA
Fetal Bovine Serum (FBS)	500ml	Sigma
Sodium. L. Pyruvat steril	100ml	Sigma
L-Glutamin steril	20ml	Sigma
Dulbecco% <sub>6</sub> Phosphate Buffered saline steril (PBS)	500ml	Sigma
Trypanblau		Sigma
Phytohaemoglutinin (PHA)	10ml	PAA
Cytochalasin B		Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)		Sigma
Diff Qick Staining Set		Medion Diagnostics
Entellan		Merck

Tab. 2: verwendete Reagenzien

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

Tab. 3: verwendete Materialien

### **3.3. Probenaufbereitung**

Vor Beginn der Lymphozytenisolation wird das Medium vorbereitet.

#### ***3.3.1. Arbeitsanleitung Medium***

Die im Wasserbad erwärmten Chemikalien (RPMI, FBS, Natrium-L-Pyruvat, L-Glutamin ) werden unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet.

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

#### ***3.3.2. Lymphozytenisolation***

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

Dazu werden die Heparinröhrchen 5x geschwenkt und 6-7ml Vollblut in Leucosep Röhrchen überführt. Pro Probe werden zwei Röhrchen mit Pasteur Pipette befüllt und bei 1000 relative centrifugal force (rcf/g) bzw. 2400 Umdrehungen pro Minute (rpm) 15 min bei 16° ohne Bremse zentrifugiert.

Für die nächsten Schritte auf Eis arbeiten.

Nach der Zentrifugation die Lymphozytenschicht (Schicht zwischen Plasma und Separationsmedium) mit Pasteur Pipette abnehmen, in Zentrifugenröhrchen überführen, mit PBS auf 15ml auffüllen, 5x über Kopf schwenken um Zellsuspension herzustellen und anschließend zentrifugieren bei 304rcf (1300 rpm) 15 min bei 4° mit Bremse.

Überstand absaugen, Pellet mit 1ml PBS lösen, gut schwenken und auf 10ml auffüllen, 5x über Kopf schwenken, zentrifugieren bei 304rcf (1300 rpm) 15 min bei 4° mit Bremse.

Überstand absaugen, auf 1ml mit PBS auffüllen, schwenken um Pellet zu lösen. Für die Zellzahlbestimmung wird der Doppelansatz der ursprünglichen Proben in ein Röhrchen vereint.

### **3.3.3. Zellzahlbestimmung**

In ein Cup werden 40µl PBS und 20 µl Zellsuspension pipettiert, dabei Pipettenspitze eintauchen und 1x spülen.

Die Zellzahl mittels Countess bestimmen.

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

### **3.3.4. Inkubation**

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

Falconröhrchen im Doppelansatz mit Medium und Zellsuspension laut Berechnung befüllen.

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

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

Mit der Inkubationszeit von 44 Stunden wird die mitotische Zellteilung stimuliert, dies geschieht bei 37 °C und unter 5% CO<sub>2</sub> Luftgemisch.

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

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

Darauf folgt eine weitere Inkubationszeit von 28 Stunden.

### ***3.3.5. Zentrifugation im Cytospin***

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

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

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

### ***3.3.6. Färbung***

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

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

### **3.3.7. Eindeckeln**

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

### **3.4. Zählkriterien**

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

Insgesamt wurden pro Probe 2000 Zweikernzellen (BN) gezählt, aufgeteilt auf 4 Objektträger.

Bis 250 Zweikernzellen wurden folgende Parameter gezählt:

- ❖ Einkernzellen (MONO)
- ❖ Mehrkernzellen (MULTI)
- ❖ Apoptosen
- ❖ Nekrosen
- ❖ BN mit MNi und MNi insgesamt in einer BN (MNi total)
- ❖ BN mit NPBs
- ❖ BN mit NBUDs

Ab 250 BN bis 500 BN wurden nur BN und deren Parameter gezählt:

- ❖ BN mit MNi und MNi insgesamt in einer BN (MNi total)
- ❖ BN mit NPBs
- ❖ BN mit NBUDs

### **3.4.1. Vorgegebene Zählkriterien für CBMN Assay nach M. Fenech (2007)**

#### **Zweikernzellen (BN):**

- zwei Kerne mit intakter Kernmembran innerhalb der gleichen zytoplasmatischen Grenze
- beide Kerne ungefähr gleiche Größe, Färbung und Intensität der Farbe
- Kerne können sich berühren, idealerweise nicht überlappen, Überlappung darf gezählt werden, wenn die Grenzen der beiden Kerne gut sichtbar sind
- Grenzen der zytoplasmatischen Membran der BN sollen intakt und klar zu unterscheiden von benachbarten BN sein

#### **Mikrokerne (MNI):**

- der Durchmesser der MNI liegt zwischen einem 1/16 und 1/3 des mittleren Durchmessers der Hauptkerne bzw. 1/256 und 1/9 eines ganzen Hauptkerns
- MNI sind rund oder oval
- MNI sind nicht refractil (lichtbrechend), daher gut unterscheidbar von gefärbten Partikeln
- MNI sind nicht verknüpft oder verbunden mit dem Hauptkern
- MNI können den Hauptkern berühren aber nicht überlappen und die Grenzen der MNI müssen erkennbar sein
- MNI haben gleiche Farbintensität (manchmal sogar stärkere) wie die Hauptkerne

#### **Nucleoplasmatische Brücken (NPBs):**

- kontinuierliche Verbindung zwischen den Kernen der BN Zelle
- die Breite der NPBs kann sehr unterschiedlich sein, normalerweise nicht breiter als 1/4 des Durchmessers der Kerne der BN Zelle
- NPBs haben die gleiche Farbcharakteristik wie die Hauptkerne
- mehrere NPBs kommen selten vor (werden gezählt als eine)

- BN Zellen können MNi und NPBs enthalten
- NPBs sind schwer erkennbar, wenn sich die Kerne berühren, daher kann die Zählung der NPBs in BN- Zellen auf Kerne beschränkt sein, die deutlich voneinander getrennt sind (vereinbaren)

### **Nucleoplasmatische Buds (NBUDs):**

- mit Brücken am Kern verbunden (dünn oder kaum schmaler als der Durchmesser der Buds)
- als Vakuole am Kern
- selbe Farbintensität wie MNi

### **Apoptose:**

Frühe Phase:

- Chromatin Kondensation innerhalb des Kerns mit intakter Kern- und Zytoplasmamembran

Späte Phase:

- Kernfragmentationen (Bildung von Kernkörperchen), intaktes Zytoplasma und Zytoplasmamembran (Zytoplasmaschrumpfung bzw. Bildung von Vakuolen kommen auch in anderer Literatur vor)
- Farbintensität ist in Kern, Kernfragmenten und Zytoplasma normalerweise stärker

### **Nekrose:**

Frühe Phase:

- helles Zytoplasma mit zahlreichen Vakuolen (einige auch im Zellkern), beschädigte Zytoplasmamembran und fast intakter Kern

Späte Phase:

- teilweiser oder kompletter Verlust von Zytoplasma, unregelmäßig beschädigte Kernmembran, nur teilweise intakte Kernstruktur (undichte Kernmembran)
- Farbintensität von Kern und Zytoplasma ist normalerweise geringer als in lebenden Zellen

### **3.4.2. Vereinbarte Punkte der Auszählung:**

- mittlerer Durchmesser der kurzen Seite der BN (im Zweifelsfall dazu zählen, wenn etwas größer als kurze Seite)
- MNi nicht wirklich rund bzw. heller, daher undichte Punktierungen, nicht zählen
- MNi nicht verwechseln mit Brücke, wenn zwischen zwei Kernen
- mehrere Buds pro BN gelten als 1
- Abschnürung der Buds entweder durch sichtbare Brücke oder als deutliche Knospe ohne Brücke
- mehrere Brücken pro BN gelten als 1
- Berührung von BN gilt nicht als Brücke
- Apoptose mit hellem Zytoplasma gilt nicht
- Frühe Phase der Apoptose beachten: Kern mit hellen Einschlüssen (Vakuolen) und beginnender Auflösung
- Späte Phase der Nekrose: nur mehr Zellkernmaterial wird nicht gezählt, Zytoplasma hellblau bis rosa mit Einschlüssen wird gezählt
- Apoptose oder Nekrose fraglich, dann Nekrose zählen
- Bud oder MN, dann MN zählen

### **3.5. Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung der Daten wurde SPSS Statistics 17.0 verwendet.

Nachdem alle Daten normal verteilt waren wurde der Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest verwendet.

Für die Mittelwertvergleiche wurde der T-Test für zwei unabhängige Variablen bei Normalverteilung angewendet.

Die Korrelationen zwischen den Variablen wurden nach Pearson bei Normalverteilung der Daten durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wurde dargestellt mit \* $p=0,05$  für signifikant und \*\* $p=0,01$  für hoch signifikant.

## **4. Ergebnisse am Beginn der Studie zum Zeitpunkt T1**

### **4.1. Deskriptive Statistik**

Im Folgenden werden die Werte präsentiert, die mit Hilfe des CBMN Assays ermittelt wurden. Die Mittelwerte der Gesamtzellzahl, der Apoptosen und Nekrosen, der MNi und MNi total, sowie der NPBs und NBUDs wurden berechnet und in Beziehung mit dem Alter, Geschlecht, BMI und SPPB gebracht und durch Korrelationen und Diagramme dargestellt. Die Auswertung gilt für den Zeitpunkt T1 und legt damit den Status vor der Intervention fest.

Tabelle 4 zeigt die Parameter des CBMN Assay mit Unterteilung der Probanden in männlich und weiblich. Die Unterschiede werden durch Diagramme verdeutlicht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern konnte nicht festgestellt werden, aber eine deutliche Tendenz zu erhöhter MNi und Nekrose Häufigkeit bei Frauen kann ausgesagt werden.

	Geschlecht	N	Mittelwert	Standardabweichung	Standardfehler des Mittelwertes	Sig. (2-seitig)
Zellzahl	männlich	9	656	35,5	11,8	,475
	weiblich	26	669	49,0	9,62	
BN	männlich	9	76,8	4,14	1,38	,500
	weiblich	26	75,5	5,26	1,03	
Apoptose	männlich	9	,992	,841	,280	,824
	weiblich	26	,937	,552	,108	
Nekrose	männlich	9	,636	,409	,136	,105
	weiblich	26	,937	,485	,095	
NDI	männlich	9	2,00	,078	,026	,044
	weiblich	26	1,92	,101	,020	
NDCI	männlich	9	1,99	,076	,025	,040
	weiblich	26	1,91	,103	,020	
MNI	männlich	9	20,3	9,96	3,32	,210
	weiblich	26	27,8	16,6	3,25	
MNI total	männlich	9	23,3	10,6	3,54	,201
	weiblich	26	33,0	21,4	4,20	
NPBs	männlich	9	1,72	,667	,222	,230
	weiblich	26	2,19	1,08	,211	
NBuds	männlich	9	5,89	2,50	,832	,334
	weiblich	26	7,31	4,06	,796	

Tab. 4: Parameter aus CBMN Assay in Abhängigkeit des Geschlechts

#### 4.2. Darstellende Statistik

Die Zusammenhänge für den Alterungsprozess wichtiger Parameter werden hier graphisch dargestellt.

#### 4.2.1. Korrelationen zwischen Alter, Nekrose und MNi Anzahl

Die Analyse zeigt einen signifikanten negativen Zusammenhang zwischen den Nekrose Zellen und dem Alter der Probanden. Mit zunehmendem Alter sinkt die Nekrose Häufigkeit.

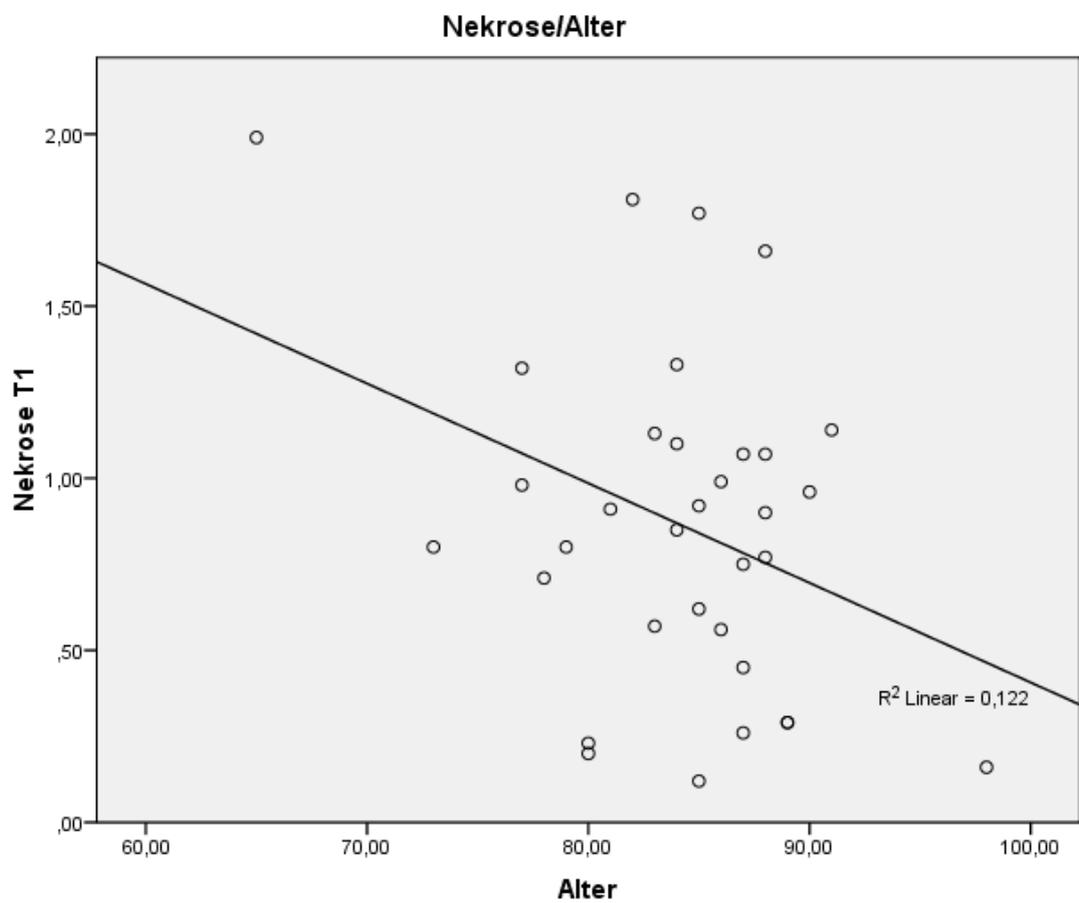


Abb. 7: Korrelation von Alter und Nekrose Häufigkeit zum Zeitpunkt T1

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

\* $p = 0,034$

Es besteht ein negativer linearer Zusammenhang zwischen MNi Frequenz und dem Alter ( $r = -0,324$ ;  $p = 0,058$ ). Es konnte kein signifikanter Zusammenhang beobachtet werden, eine deutliche Tendenz der Verringerung der MNi mit zunehmendem Alter ist jedoch ersichtlich. Eine größere Stichprobe könnte hier möglicherweise signifikante Ergebnisse bringen.

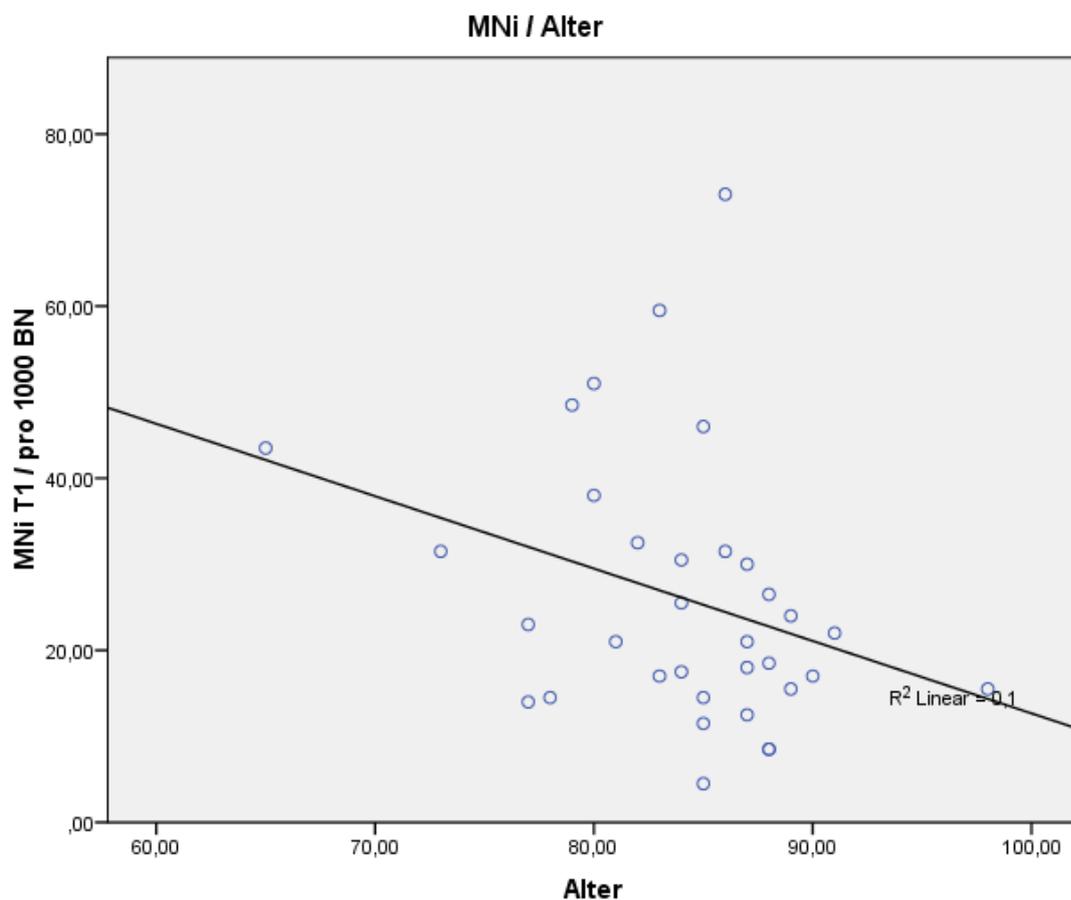


Abb. 8: Korrelation von MNi Frequenz mit dem Alter zum Zeitpunkt T1  
 $p = 0,058$

Zu einem ähnlichen Ergebnis kam man beim Vergleich der gesamten MNi Anzahl mit dem Alter ( $r = -0,273$ ;  $p = 0,113$ ). Auch hier besteht keine signifikante Korrelation, aber eine Tendenz der Abnahme der MNi total mit dem Alter ist zu erkennen.

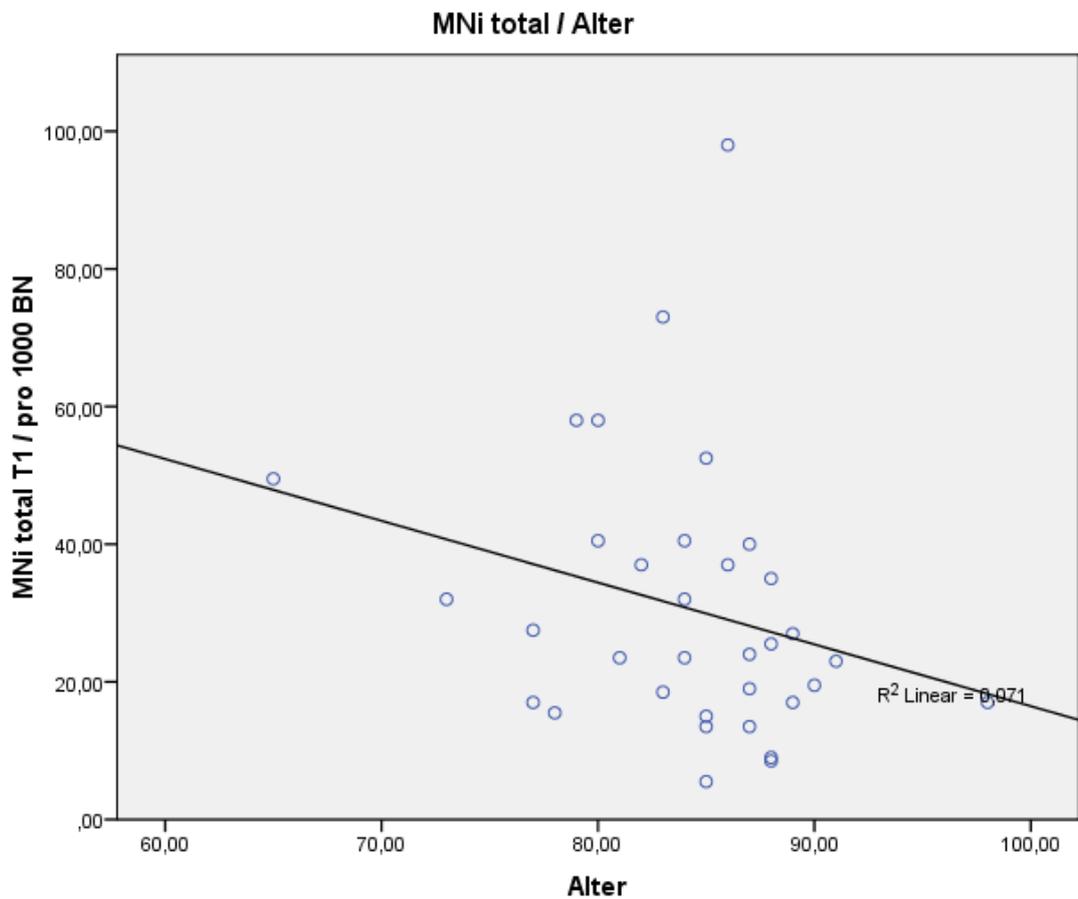


Abb. 9: Korrelation der MNi total Frequenz zum Zeitpunkt T1 mit dem Alter  
 $p = 0,113$

#### 4.2.2. Korrelation von SPPB und BMI

Eine signifikante Korrelation konnte zwischen SPPB und dem BMI festgestellt werden. Probanden mit höherer SPPB Werten hatten einen niedrigeren BMI.

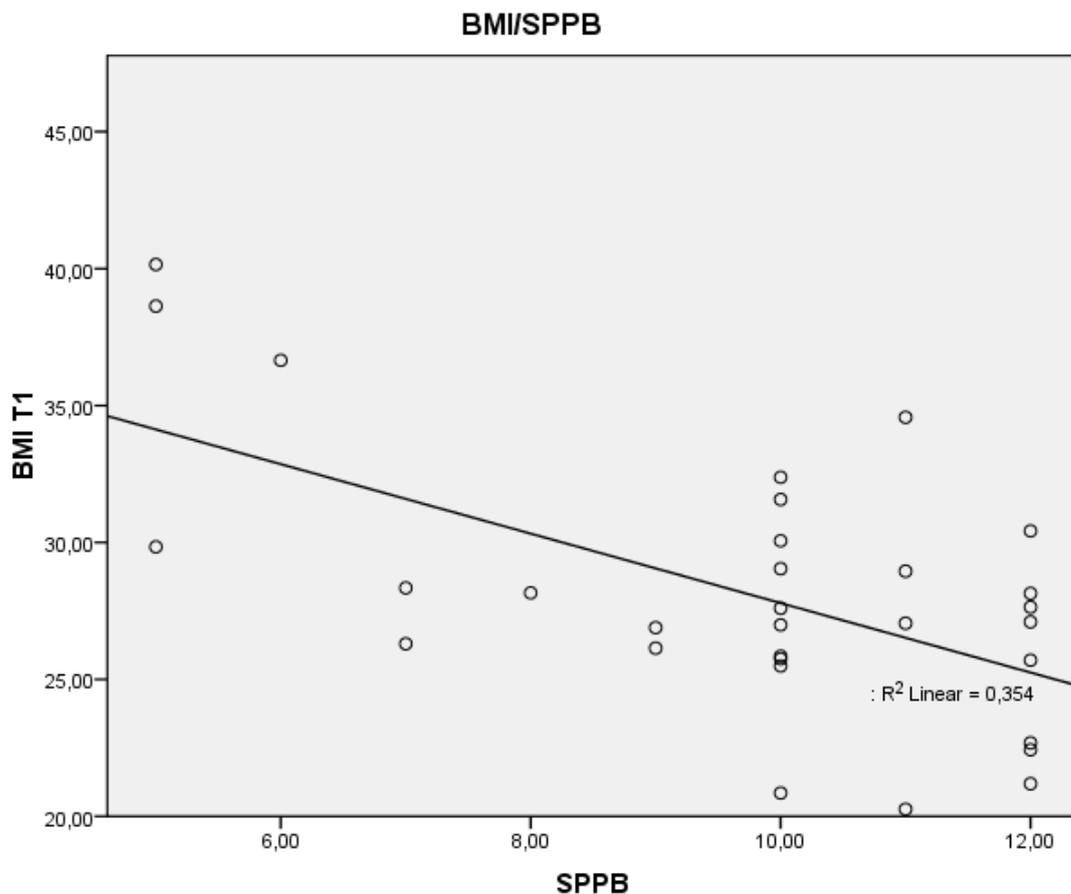


Abb. 10: Korrelation von BMI und SPPB

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

\*\*p = 0,000

Korrelationen zwischen SPPB, MNI und MNI total gemessen in 1000 BN Zellen werden nicht dargestellt, da wenig aussagekräftige Ergebnisse der MNI ( $p=0,606$ ) und MNI total ( $p=0,616$ ) beobachtet werden konnten.

#### 4.2.3. Korrelationen von BMI, Alter, Nekrose Häufigkeit und MNI total

Es besteht kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem BMI und dem Alter der TeilnehmerInnen, jedoch wurde eine Abnahme des BMI im Verlauf des Alters sichtbar.

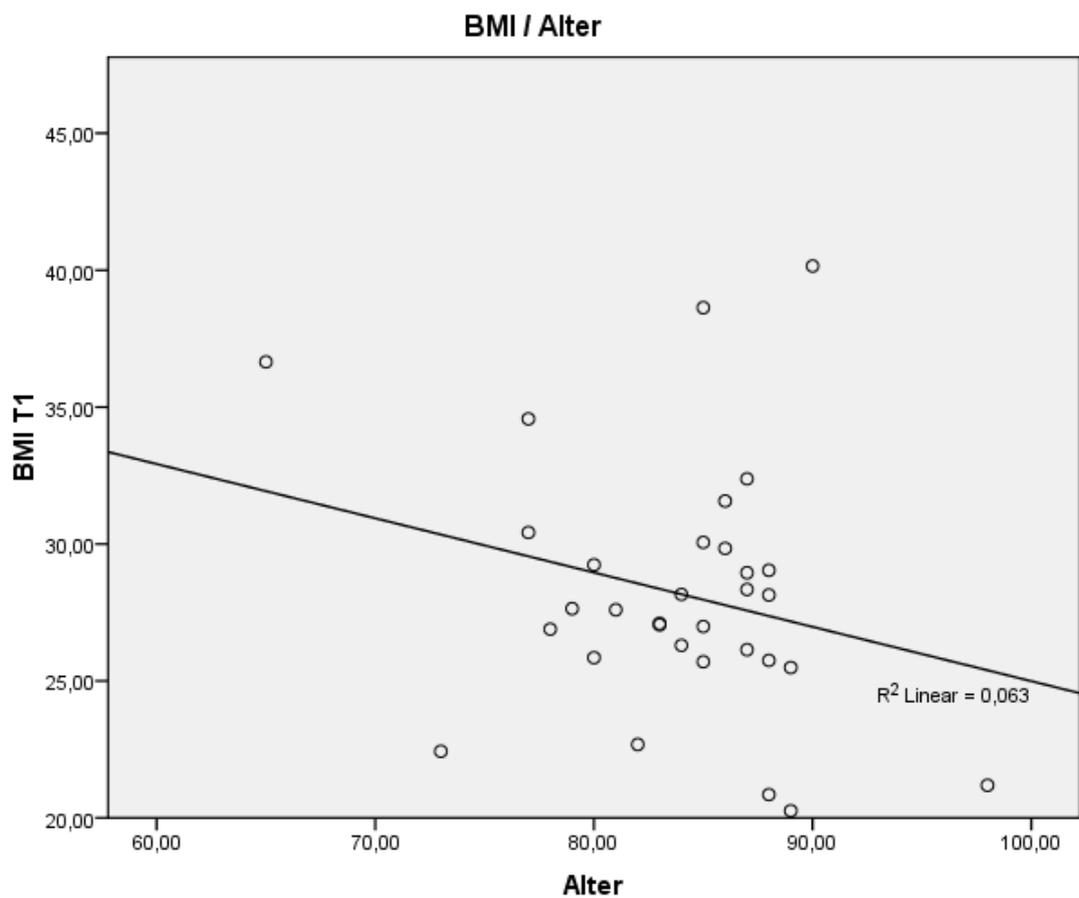


Abb. 11: Korrelation von BMI und Alter  
 $p=0,166$

Der Zusammenhang zwischen Nekrose und BMI wird durch eine positive Korrelation dargestellt. Der Anstieg der Nekrose ist nicht signifikant, eine Tendenz jedoch erkennbar. Eine größere Stichprobe könnte auch hier zu einem signifikanten Ergebnis führen.

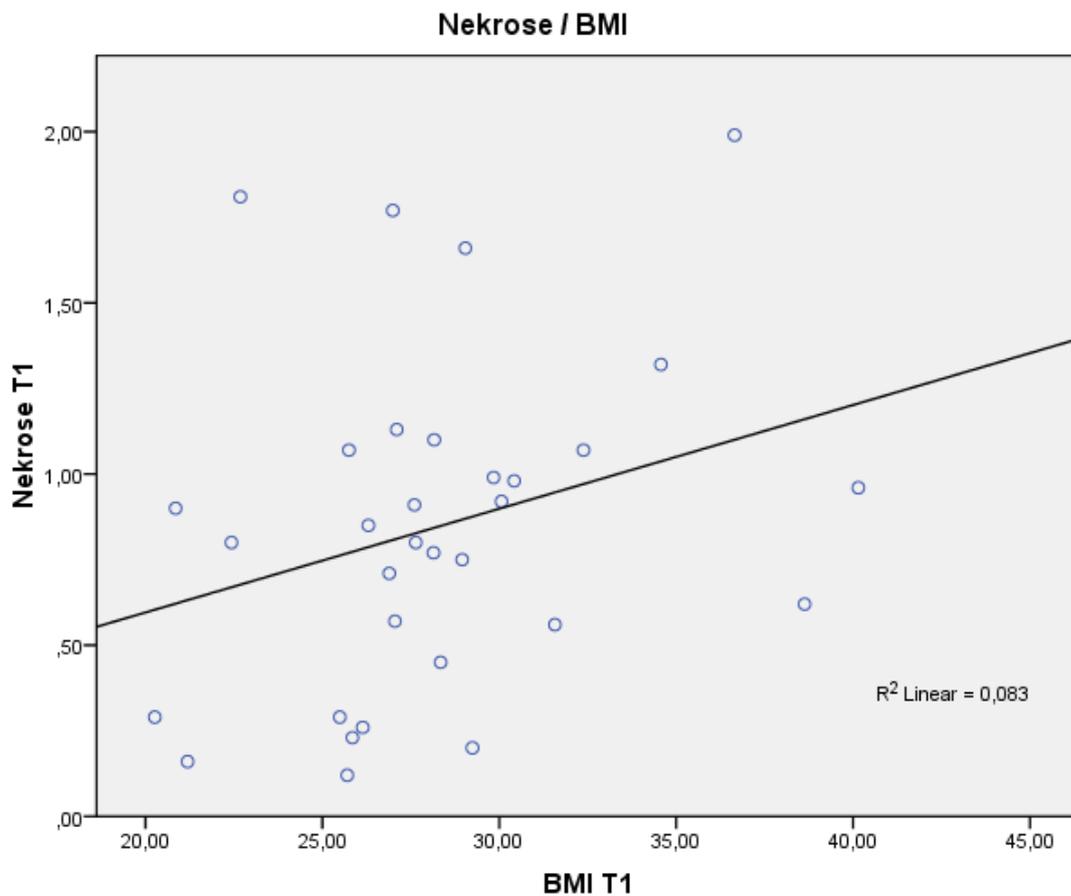


Abb. 12: Korrelation zwischen Nekrose und BMI  
 $p=0,109$

Es lässt sich keine Tendenz zu einer höheren MNi Anzahl bei höheren BMI Werten erkennen.

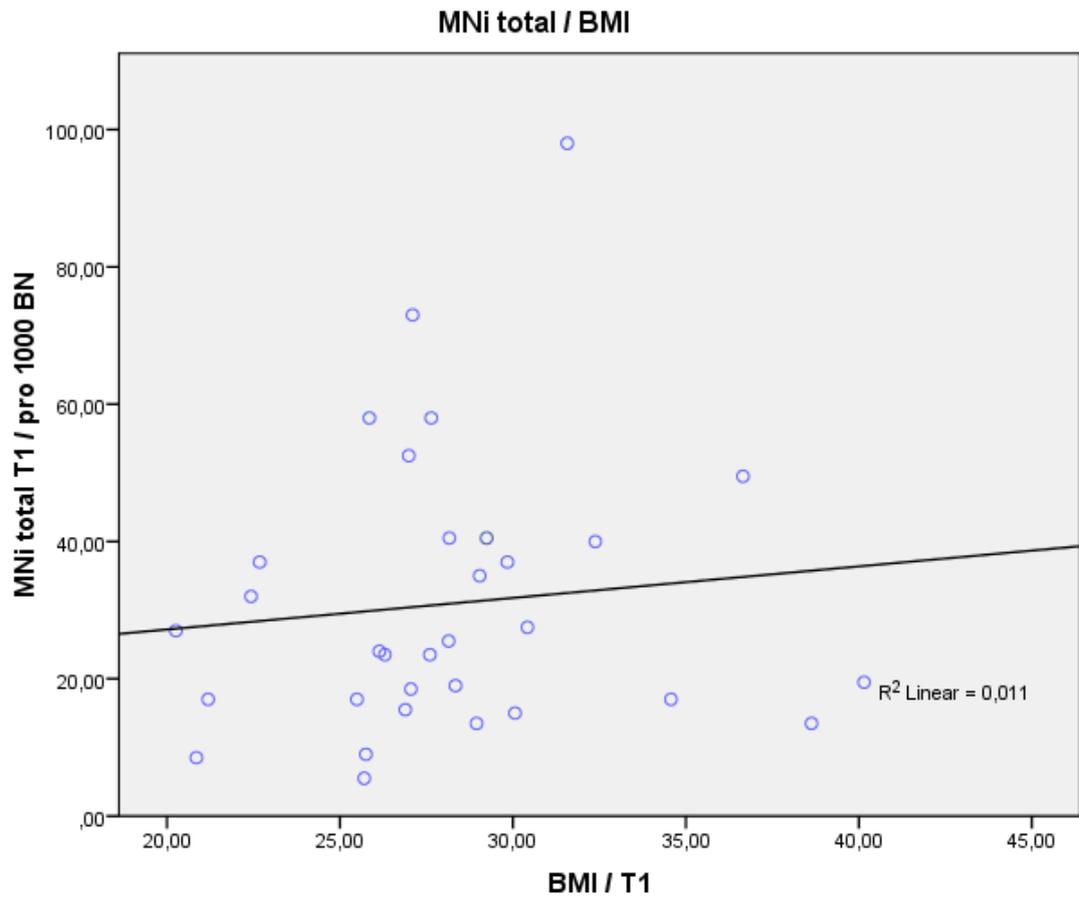


Abb. 13: Vergleich der MNi total in 1000 BN Zellen mit dem BMI  
 $p=0,566$

#### 4.2.4. Mittelwertvergleiche zu Beginn der Studie (T1)

Um die Ausgangslage der Studie festzulegen wurden wichtige Parameter berechnet und wie folgt graphisch dargestellt. Die Abweichungen der Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Signifikanzen werden zwischen den Testgruppen angezeigt.

Die Mittelwerte aller gezählten Zellen zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen Training vs. Training&Ernährung ( $p=0,553$ ), Training vs. Kognition ( $p=0,406$ ) und Training&Ernährung vs. Kognition ( $p=0,856$ )

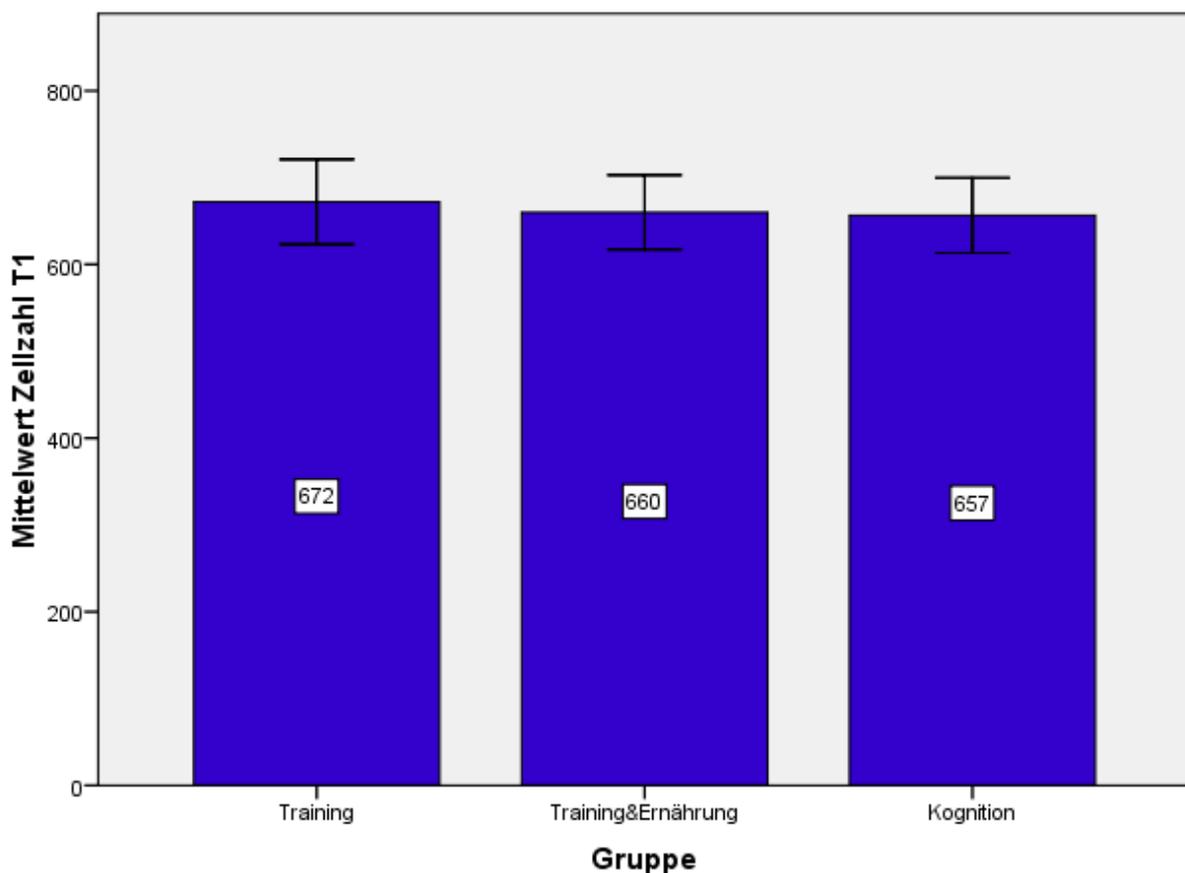


Abb. 14: Vergleich der Zellzahl aller 3 Gruppen am Beginn der Studie (MW  $\pm$  SD)

Die Mittelwerte der Apoptosen und Nekrosen, angegeben in Prozent der Gesamtzellen, ergeben keinen signifikanten Unterschied in den drei Gruppen.

Vergleich Apoptose:

Training vs. Training&Ernährung  $p=0,426$

Training vs. Kognition  $p=0,701$

Training&Ernährung vs. Kognition  $p=0,714$

Vergleich Nekrose:

Training vs. Training&Ernährung  $p=0,812$

Training vs. Kognition  $p=0,292$

Training&Ernährung vs. Kognition  $p=0,469$

Zu beachten ist auch die hohe Standardabweichung in den einzelnen Gruppen.

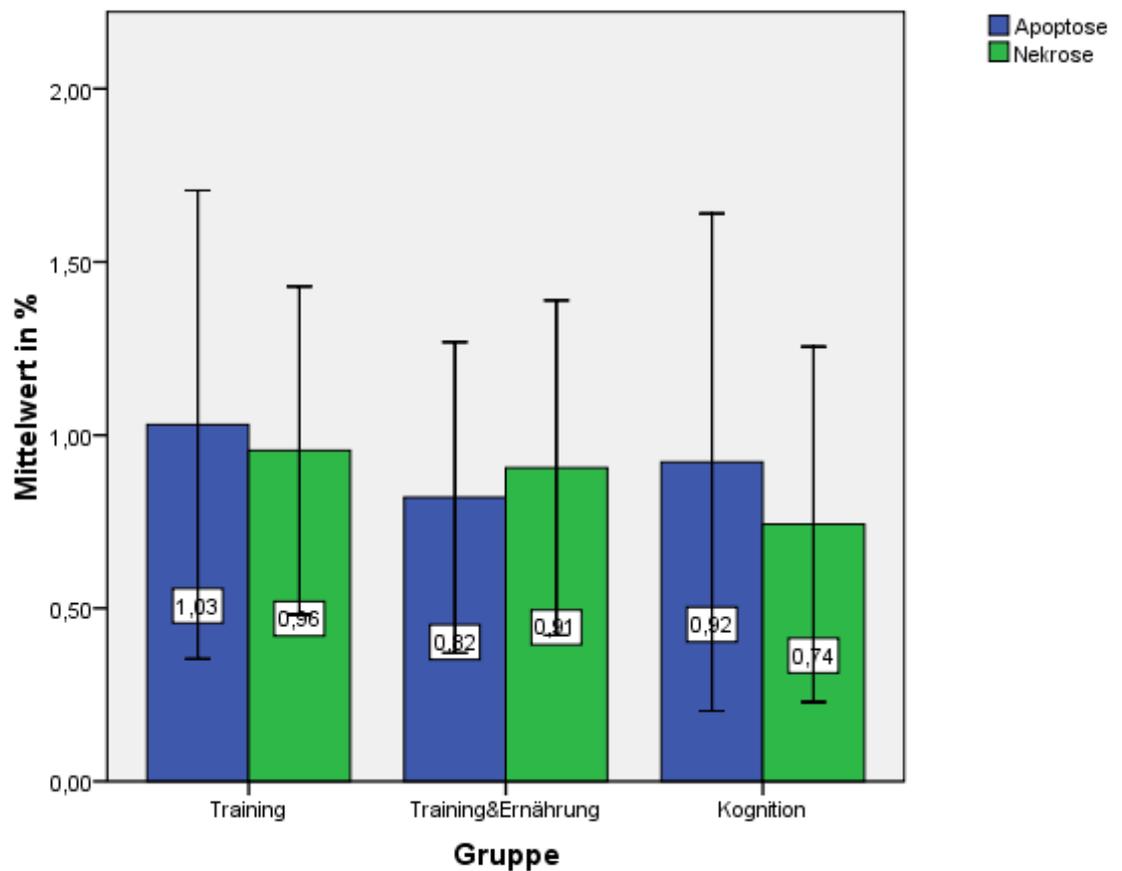


Abb. 15: Unterschied zwischen Apoptose bzw. Nekrose in den untersuchten Gruppen zu Beginn der Studie (MW  $\pm$  SD)

In den 3 Gruppen ist kein Unterschied in den Mittelwerten der MNi und MNi total zwischen Training und Kognitionsgruppe ( $p=0,369$  und  $p=0,413$ ), Training&Ernährung und Kognitionsgruppe ( $p=0,553$  und  $p=0,585$ ) ersichtlich. Training und Training&Ernährung bestätigen die Nullhypothese.

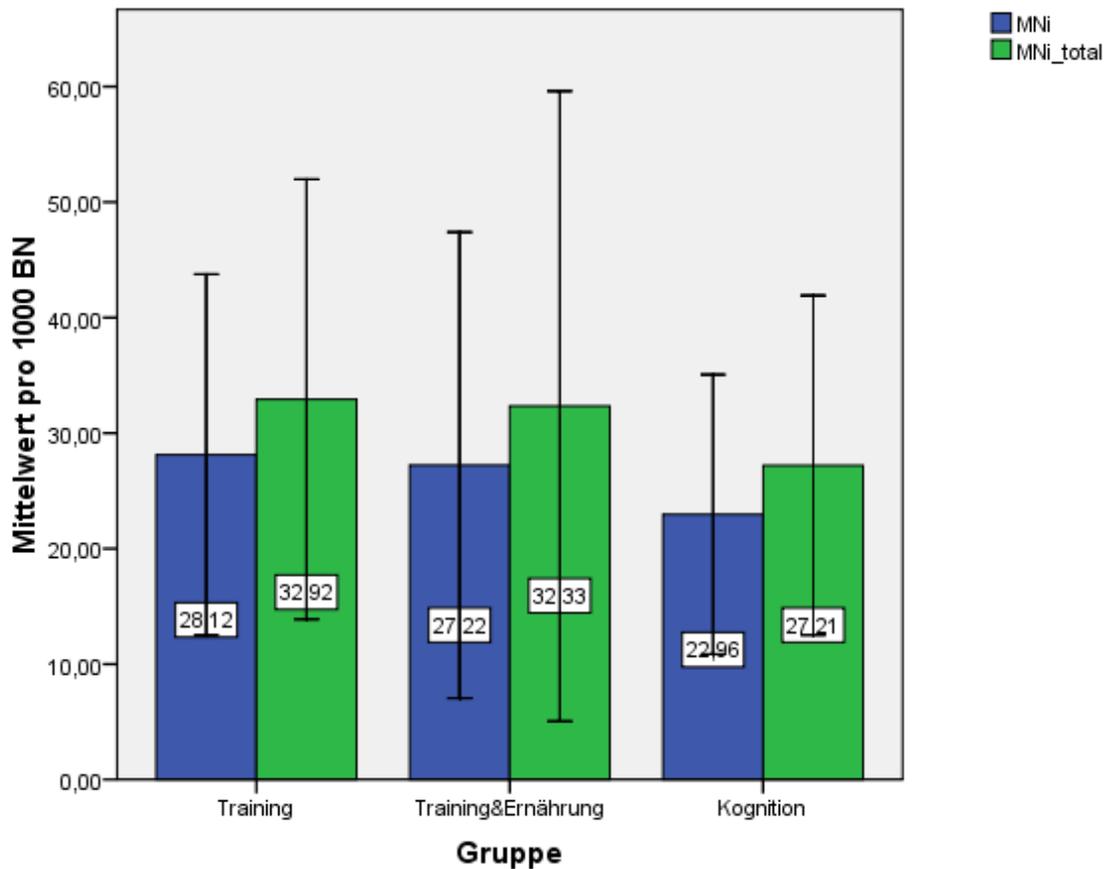


Abb. 16: Anzahl von MNi und MNi total in den einzelnen Testgruppen zu Beginn der Studie (MW ± SD)

#### 4.2.5. Geschlechtsspezifische Unterschiede der MNI Frequenz und anderer Parameter

Der Einfluss des Geschlechts auf Biomarker wie MNI, MNI total, Bridges, Buds und Nekrose Häufigkeit wird zum Zeitpunkt T1 dargestellt. Die Werte beziehen sich auf das Gesamtkollektiv, es wurde keine Unterteilung in die drei Testgruppen vorgenommen.

Es ist eine gewisse Tendenz in der MNI und MNI total Häufigkeit zwischen Männern und Frauen, wenn auch nicht signifikant, erkennbar. Die MNI Anzahl war bei Frauen um 33,63 % höher ( $p=0,210$ ) als bei Männern. Die totale MNI Häufigkeit bei Frauen übertraf die der Männer sogar um 41,92 % ( $p=0,201$ ).

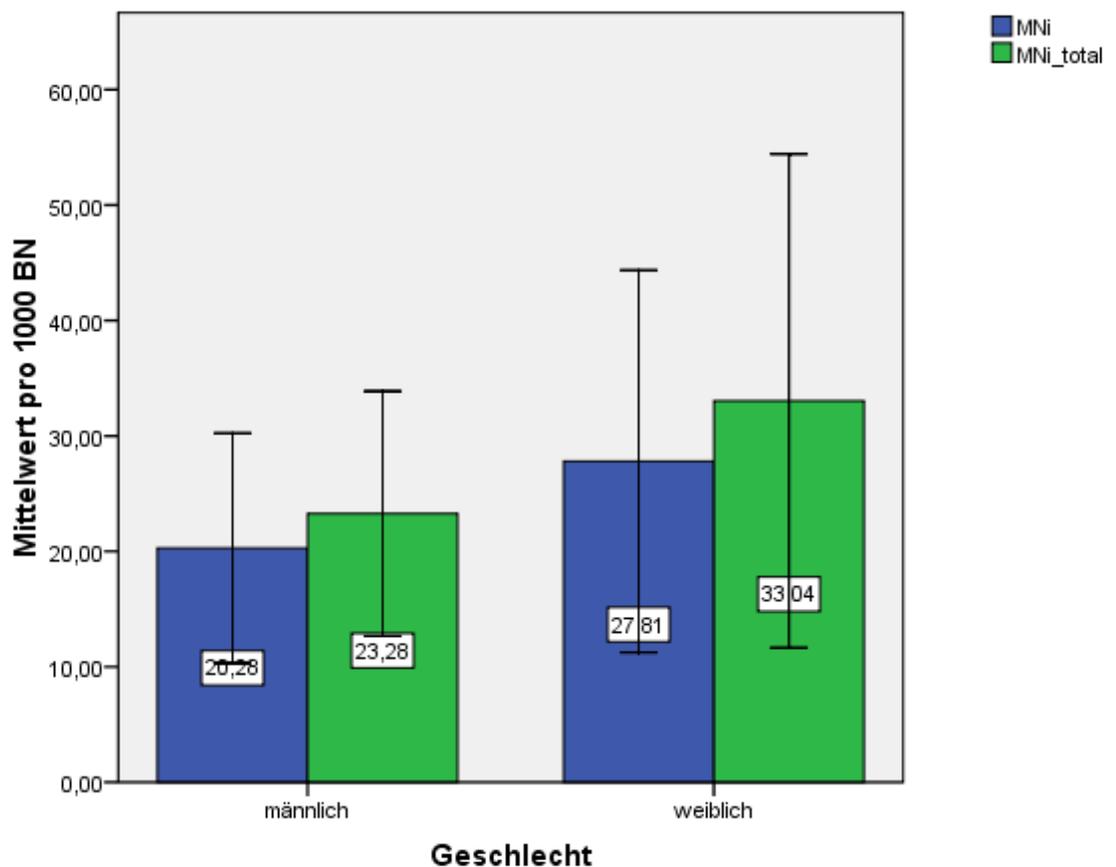


Abb. 17: Unterscheidung von MNI und MNI total in Abhängigkeit vom Geschlecht in 1000BN zu Beginn der Studie (MW  $\pm$  SD)

Der geschlechtsspezifische Vergleich der Bridges und Buds brachte kein signifikantes Ergebnis. Frauen wiesen eine nicht signifikant höhere Zahl an Bridges und Buds auf, die Differenz zu den Werten der Männer betrug für Bridges 27,31 % und für Buds 32,59 %

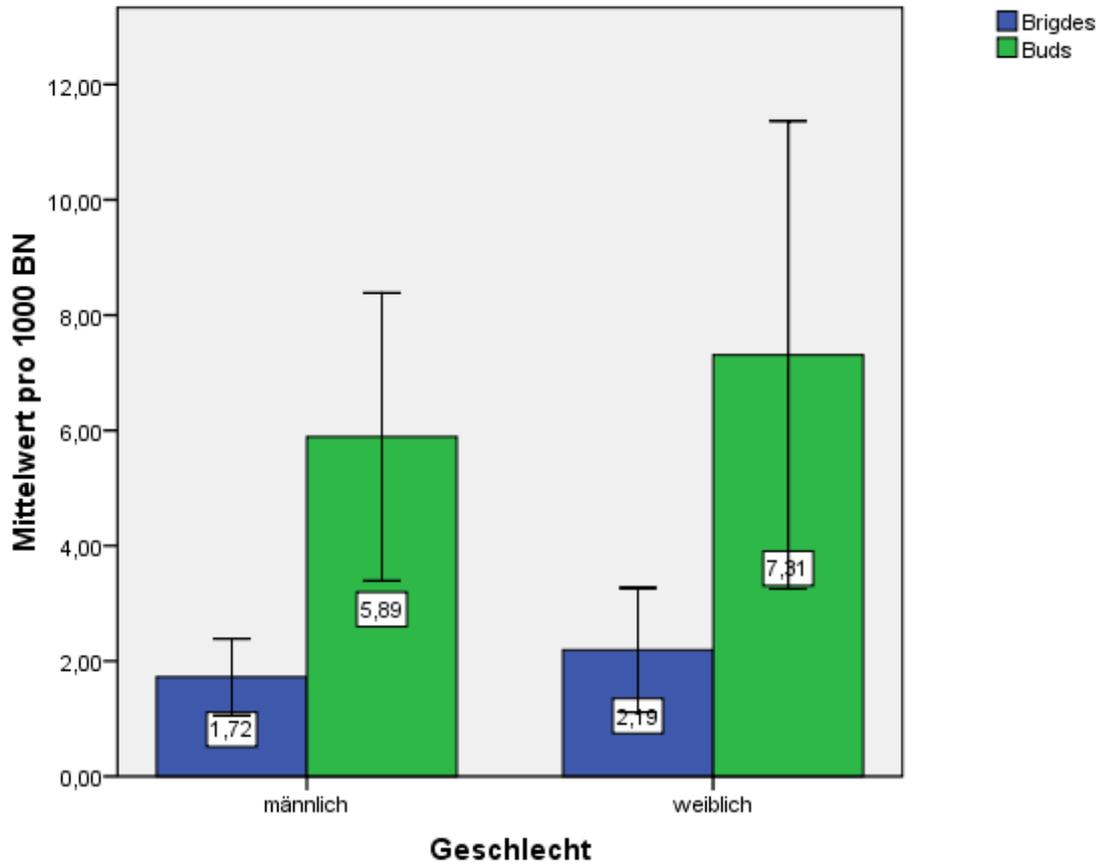


Abb. 18: geschlechtsspezifischer Unterschied von Bridges und Buds in 1000 BN zu Beginn der Studie (MW  $\pm$  SD)

Zwischen den Apoptosen von Männern und Frauen ist kein Unterschied ( $p=0,824$ ), die Differenz der Nekrosen ist wesentlich deutlicher, aber dennoch nicht signifikant und beträgt 47,19 % ( $p=0,105$ ).

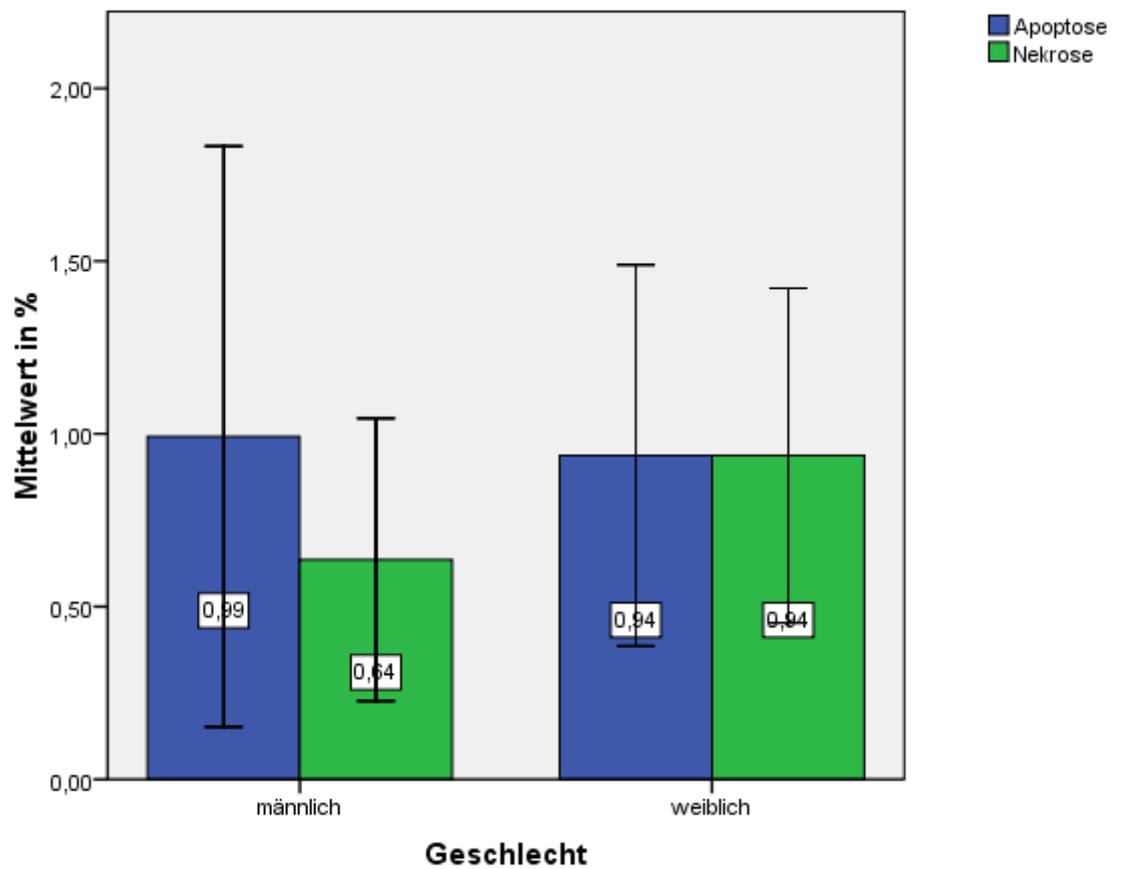


Abb. 19: Mittelwert Vergleich von Apoptose und Nekrose  
Angaben in % der Gesamtzahl der gezählten Zellen zu Beginn der Studie (MW  $\pm$  SD)

## 5. DISKUSSION

Zu Beginn der Studie wurde von 35 Probanden die Nekrose-, MNi- und MNi total Zahl in PBL untersucht und ein Zusammenhang mit den einzelnen Parametern und dem Alter der Probanden berechnet.

Die Nekrose Häufigkeit sank signifikant mit zunehmendem Alter bei den Senioren im Alter von 65 . 98 Jahren (\*p= 0,034).

Ein beinahe signifikantes Ergebnis brachte die Korrelation von Alter und MNi Häufigkeit. Die Anzahl der MNi sank deutlich (p = 0,058) mit zunehmendem Alter. Ähnlich war die Korrelation der MNi total mit dem Alter, auch hier war ein negativer linearer Zusammenhang erkennbar.

Dieses Ergebnis bestätigt die von Orta T. und Grünebakan S. veröffentlichten Daten, die einen Anstieg der spontanen MNi Häufigkeit bis zum Alter von 50 Jahren und danach eine Verringerung der MNi beschreiben [Orta T., Grünebakan S., 2012].

Auch in der Studie von Wojda et al. wurde eine negative Korrelation ab einem Alter von 68 Jahren beobachtet und diese Angaben sind eine weitere Bestätigung für die in dieser Studie ermittelten Daten.

Die negative Korrelation zwischen der Bewertung des SPPB und dem BMI der StudienteilnehmerInnen brachte einen signifikanten Zusammenhang (\*\*p= 0,000). Dieser durchaus erwartete Zusammenhang ist vergleichbar mit Studien, die eine Anfälligkeit für Sarkopenie und damit geringer SPPB Leistung - verursacht durch Bewegungsmangel auf Grund von Fettleibigkeit . bestätigen [Burton et al., 2010].

Auch das Alter zeigte einen negativen Zusammenhang zum BMI (p=0,166), der allerdings nicht signifikant war.

Der Zusammenhang zwischen Nekrose und BMI ist nicht signifikant, allerdings zeigte sich eine gewisse Tendenz (p= 0,109).

Die MNi Häufigkeit korreliert nicht mit dem BMI, obwohl dies bereits in der Literatur gefunden wurde [Jones et al., 2011].

Die Mittelwertvergleiche der 3 Testgruppen ergaben zu Beginn dieser Studie keine signifikanten Unterschiede. Bewertet wurden die Mittelwerte der Gesamtzahl aller Zellen, der Apoptosen, Nekrosen und der MNi und MNi total in den 3 Gruppen. Besonders die Werte der Apoptosen, Nekrosen, MNi und MNi total sind ausschlaggebend für die Bewertungen der Veränderung nach der Intervention durch Training und Training&Ernährung.

Die geschlechtsspezifische Unterteilung der StudienteilnehmerInnen lieferte wichtige Daten bezüglich des Status der MNi und der MNi total Häufigkeit, der NPBs, der NBUDs, der Apoptosen und Nekrosen zum Zeitpunkt T1. Die MNi und MNi total Häufigkeit war bei Frauen um 33,63% bzw. um 41,92% höher als bei den Männern, was durch die Literatur bestätigt wird [Bonassi et al., 2001]. Erklärbar ist dieser Unterschied nur durch den Einfluss der X und Y Chromosomen auf die MNi Häufigkeit. In vielen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Häufigkeit der MNi und der doppelten X Chromosomen bei Frauen im Vergleich zu den Männern beschrieben [Norppa H., Falck G.C., 2003].

Auch bei NPBs und NBUDs waren bei Frauen um ca. ein Drittel höhere Werte als bei den Männer zu erkennen.

Die Werte der Apoptosen unterschieden sich kaum, die Nekroserate war jedoch bei Frauen deutlich höher, wenn auch nicht signifikant.

Vergleicht man die vorliegenden Daten mit den von Michael Fenech 2007 publizierten Referenzbereichen in normalem PBL, so erkennt man einige Abweichung zu den in dieser Studie ermittelten Werten. Ein Unterschied von diesen vorgegebenen Normalwerten zeigte sich bei Frauen in der MNi Häufigkeit mit 33,04 (Referenzbereich 0-30) und der Zahl der NBUDs mit 7,81(Referenzbereich 0-5). Der Prozentsatz der Apoptose Zellen mit fast 10% bei Männern und 9,4 % bei Frauen variiert zu den Daten von Fenech (Apoptose Zellen 0-7%).

Diese vorliegenden Daten bilden eine interessante Ausgangslage für die weiterführende Studie. Welche Ergebnisse können nach der Intervention durch

Training und Training&Ernährung, besonders bezüglich der Abnahme der MNI und nekrotischen Zellen, ermittelt werden? Wird sich diese altersabhängige Verringerung bestätigen?

## 6. SCHLUSSBETRACHTUNG

In mehreren Studien wurde der Anstieg der MNi Häufigkeit mit steigendem Alter postuliert, dem gegenüber stehen vereinzelte Forschungsergebnisse, die einen Abfall der MNi ab einem Alter von ca. 70 Jahren feststellten. Da ein Großteil der Probanden der vorliegenden Studie älter als 70 Jahre ist, war ein deutlicher Abfall der MNi erkennbar. Die Literaturdaten konnten somit eindrucksvoll bestätigt werden. Eine Signifikanz wurde auf Grund der geringen TeilnehmerInnenzahl nicht erreicht.

Signifikant war die Verringerung der Nekrosen mit steigendem Alter und der negative Zusammenhang zwischen BMI und SPPB.

Für weiterführende Beobachtungen dieser Studie sind auch die Korrelationen von MNi mit dem SPPB und dem BMI interessant.

Zu diesem Studienzeitpunkt brachte eine höhere SPPB Bewertung kein signifikantes Ergebnis bezüglich der MNi Häufigkeit in PBL der Senioren. Inwieweit die durchgeführte Intervention einen Einfluss hat auf Chromosomenschäden werden die zukünftigen Auswertungen zeigen.

Zum Zeitpunkt T1 wurde eine positive Korrelation zwischen dem BMI und dem Auftreten von Nekrosen ermittelt. Ob sich diese Beobachtung nach der Intervention bestätigt wird Inhalt der weiter führenden Studie sein.

Geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der MNi und MNi total Häufigkeit, der NPBs, der NBUDs sind zu diesem Zeitpunkt der Studie feststellbar und bestätigen die in der Literatur angegebenen Ergebnisse früherer Studien.

Durch die derzeit noch geringe Probandenzahl konnte meist nur eine Tendenz der untersuchten Parameter, jedoch selten eine Signifikanz festgestellt werden. Im Laufe der Studie wird sich die TeilnehmerInnenzahl erhöhen und somit ist zu hoffen, dass signifikante Zusammenhänge ermittelt werden können.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Die Statistik Austria veröffentlichte Daten wonach die Lebenserwartung der Frauen in Österreich von 2010 auf 2011 um 0,3% und bei Männern um 0,4% gestiegen ist. Im Alter auch möglichst lange gesund und fit zu sein, ist ein allgemeiner Wunsch und Thema vieler Forschungsprojekte.

Wichtig ist es Krankheiten vorzubeugen oder rechtzeitig zu erkennen.

Durch bestimmte Biomarker zur Frühdiagnose, kann man diesem Ziel näher kommen.

Wichtige Parameter für Chromosomenschäden sind Mikrokerne, nukleoplasmatische Brücken- und Buds, deren Auftreten in Verbindung gebracht wird mit einem erhöhten Krebsrisiko, einer Neigung zu neurodegenerativen Erkrankungen und kardiovaskulären Krankheiten.

Die an der Forschungsplattform Active Ageing der Universität Wien durchgeführte Studie zum Thema „Die Auswirkungen von Ernährungsoptimierung und Bewegung auf die Gesundheit und Mobilität älterer Menschen“ untersucht unter anderem auch diese Parameter.

Diese Diplomarbeit ist Teil dieser Studie und beschreibt die Parameter MNi, MNi total, NPBs, NBUDs, Nekrose, Apoptose, BMI, SPPB und deren Abhängigkeiten von Alter und Geschlecht von 35 Senioren aus Wiener Pensionisten Wohnhäusern.

Die Probanden wurden in Gruppen (Training, Training&Ernährung, Kognition) randomisiert und zum Zeitpunkt T1 (Beginn der Studie) wurden die Parameter mittels CBMN Assay untersucht. Diese Werte dienen gleichzeitig als Vergleich zu den während und nach der Intervention untersuchten Parametern.

Die in der Literatur diskutierte Verringerung der MNi Anzahl ab einem Alter von etwa 70 Jahren konnte in dieser Studie bestätigt werden. Es konnten deutlich geringere Werte der MNi und MNi total Häufigkeit mit steigendem Alter festgestellt werden. Ein signifikanter Abfall der Nekrose mit zunehmendem Alter wurde ebenfalls beobachtet.

Der geschlechtsspezifische Unterschied, der in vielen Studien beschrieben wird, ist auch hier erkennbar, wenn auch nicht signifikant, mit einer erhöhten

MNi ( $p=0,210$ ) und MNi total ( $p=0,201$ ) Häufigkeit bei Frauen. Auch die NPBs ( $p=0,230$ ) und NBUDs ( $p=0,334$ ) waren bei Frauen sichtbar erhöht. Die nekrotischen Zellen der Frauen waren mit  $p=0,105$  merklich erhöht.

Eine signifikant negative Korrelation zeigte sich zwischen BMI und SPPB. Andererseits stiegen die nekrotischen Zellen mit zunehmendem BMI.

Diese Auswertungen könnten im Laufe der Studie durch die Erhöhung der TeilnehmerInnenzahl möglicherweise zu signifikanten Ergebnissen führen. Dieser erste Teil der Gesamtstudie zeigt keine unterschiedlichen Chromosomenschäden zwischen den Untersuchungsgruppen und bestätigt Literaturdaten zu Alter und Geschlecht.

## 8. ABSTRACT

According to Statistik Austria the life expectancy of women and men in Austria has increased by 0,3% and 0,4% respectively between 2010 and 2011. To be fit and healthy also at a higher age is a general desire and background of many research projects.

It is important to prevent and to diagnose a disease on time, which could be done by defining and evaluating certain biomarker.

Important parameters for chromosomal damage are micronuclei, nucleoplasmatic bridges and buds whose frequency can be linked to an increased risk for cancer, neuro-degenerative disorders and cardiovascular diseases.

The study entitled "The effects of the optimization of nutrition and exercise on the health and mobility of elder people" at the research platform "Active Ageing" of the University Vienna is focusing on these and other parameters.

This thesis is part of this study and detects the parameter MNi, MNi total, NPBs, NBUDs, necrosis, apoptosis, BMI, SPPB of 35 elderlies and links them to age and gender.

The subjects were randomized into three groups (training, training & nutrition, cognition group) and at time T1 (study started) mentioned parameters have been investigated with the CBMN assay.

The decrease of MNi's from the age of 70 years was also deserved in this study.

There was a negative correlation between MNi and MNi total frequency with rising age as well as a significant decline of necrosis frequency with age.

The gender-specific difference, which was also seen in many studies, is visible here, but without being significant, with increased MNi ( $p=0,210$ ), MNi total ( $p=0,201$ ), NPBs ( $p=0,230$ ) and NBUDs ( $p=0,334$ ) in women. Further, necrotic cells in women were noticeably raised in comparison to men ( $p=0,105$ ).

A significant negative correlation has appeared between BMI and SPPB. On the other hand the necrotic cells increased with rising BMI.

We expect that these examinations could deliver more significant results with increasing the number of participants.

This first part of the total study shows no differences at baseline chromosomal damage between groups and was able to confirm literature data regarding chromosomal damage and age/gender.

## 9. LITERATURVERZEICHNIS

BONASSI S, FENECH M, LANDO C, LIN Y P, CEPPI M, CHANG W P, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDERS M, ZEIGER E, BAN S, BARALE R, BIGATTI M P, BOLOGNESI C, JIA C, DI GIORGIO M, FERGUSON L R, FUCIC A, LIMA O G, HRELIA P, KRISHNAJA A P, LEE T K, MIGLIORE L, MIKHALEVICH L, MIRKOVA E, MOSESSO P, MÜLLER W U, ODAGIRI Y, SCARFFI M R, SZABOVA E, VOROBTSOVA I, VRAL A, ZIJNO A. Human MicroNucleus Project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2001; 37(1): 31-45.

BONASSI S, NERI M, LANDO C, CEPPI M, LIN Y, CHANG W, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDERS M, ZEIGER E, FENECH M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutation Research* 2003; 543: 155-166.

BONASSI S, ZNAOR A, CEPPI M, LANDO C, CHANG W P, HOLLAND N, KIRSCH-VOLDERS M, ZEIGER E, BAN S, BARALE R, BIGATTI M P, BOLOGNESI C, CEBULSKA-WASILEWSKA A, FABIANOVA E, FUCIC A, HAGMAR L, JOKSIC G, MARTELLI A, MIGLIORE L, MIRKOVA E, SCARFI M R, ZIJNO A, NORPPA H, FENECH M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2006; 28(3): 625-631.

BURTON A L, SUMUKADAS D. Optimal management of sarcopenia. *Clin.Interv. Aging* 2010 ; 5: 217-228.

CRUZ-JENTOFT A J, BAEYENS J P, BAUER J M, BOIRIE Y, CEDERHOLM T, LANDI F, MARTIN F C, MICHEL J P, ROLLAND Y, SCHNEIDER S M, TOPINKOVA E, VANDEWOUDE M, ZAMBONI M. sSarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People%Age Ageing 2010; 39 (4): 412-423.

DREY M, KAISER M J. Malnutrition in the elderly. *Dtsch Med Wochenschr* 2011; 136 (5): 176-178.

EL-ZEIN R, FENECH M, Lopez M S, SPITZ M R, ETZEL C J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay cytome biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2008; 17(5): 1111-1119

EL-ZEIN R, VIRAL A, ETZEL C J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. *Mutagenesis* 2011; 26(1): 101-106.

FENECH M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2007; 2(5): 1084-1104.

FENECH M. The role of folic acid and Vitamin B12 in genomic stability of human cells. *Mutation Research* 2001; 475: 57-67.

FENECH M, BAGHURST P, LUDERER W, TURNER J, RECORD S, CEPPI M, BONASSI S. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol,  $\beta$ -carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability . results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis* 2005; 26 (5): 991-999.

FENECH M, BONASSI S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using the micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*. 2011; 26(1): 43-49.

FENECH M, HOLLAND N, ZEIGER E, CHANG W P, BURGAS S, THOMAS P, BOLOGNESI C; KNASMÜLLER S, KIRSCH-VOLDERS M, BONASSI S. The HUMN and HUMN<sub>XL</sub> international collaboration projects on human micronucleus assays in lymphocytes and buccal cells - past, present and future. *Mutagenesis* 2011; 26(1): 239-245.

FENECH M, KIRSCH-VOLDERS M, NATARAJAN A T, SURRALLEES J, CROTT J W, PARRY J, NORPPA H, EASTMOND D A, TUCKER J D, THOMAS P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 2011; 26(1): 125-132.

GOODPASTER B H, PARK S W, HARRIS T B, KRITCHEVSKY ST B, NEVITT M, SCHWARTZ A V, SIMONSICK E M, TYLAVSKY F A, VISSER M, NEWMAN A B. The Loss of Skeletal Muscle Strength, Mass, and Quality in Older Adults: The Health, Aging and Body Composition Study. *J. Gerontol A. Biol. Sci.* 2006; 61: 1059-1064.

HANDO J C, NATH J, TUCKER J D. Sex Chromosomes, micronuclei and aging in women. *Chromosoma* 1994; 103: 186-192.

HUANG P, HUANG B, WENG H, NAKAYAMA K, MORIMOTO K. Effects of lifestyle on micronuclei frequency in human lymphocytes in Japanese hard-mental workers. *Preventive Medicine* 2009; 48 (4): 383-388.

IANNUZZI-SUCICH M, PRESTWOOD K M, KENNY A M. Prevalence of sarcopenia and predictors of skeletal muscle mass in healthy, older men and women. *J. Gerontol A. Biol. Sci.* 2002; 57 (12) 772-777.

IARMARCOVAI G, CEPPI M, BOTTA A, ORSIERE T, BONASSI S. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. *Mutation Research.* 2008; 659: 274-283.

JENSEN G L. Inflammation: roles in aging and sarcopenia. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2008; 32 (6): 656. 659.

JONES K H, YORK T P, JACKSON-COOK C. .Mechanisms leading to the formation of micronuclei containing sex chromosomes differ with age. *Mutation Research* 2012; 402191: 1-11.

JONES K H, YORK T P, JUUSOLA J, FERREIRA-GONZALEZ A, MAES H H, JACKSON-COOK C. Genetic and enviromental influences on spontaneous micronucei frequencies in children and adults: a twin study. *Mutagenesis* 2011; 26 (6): 745-752.

MANCUSO M, COPPEDE F, MIGLIORE L, SCILIANO G, MURRI L. Mitochondrial dysfunction, oxidative Stress and neurodegeneration. *Journal of Alzheimers Disease* 2006; 10: 59-73.

KOOLMAN J, RÖHM K-H. Apoptose. In: *Taschenatlas der Biochemie.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1998; 374

KORTEBEIN P, FERRANDO A, LOMBEIDA J, WOLFE R, EVANS W J. Effect of 10 days of bed rest on skeletal muscle in healthy older adults. *JAMA* 2007; 297 (16): 1772-1774.

MALAFARINA V, URIZ-OTANO F, INIESTA R, GIL-GUERRERO L. Sarcopenia in the elderly: Diagnosis, physiopathology and treatment. *Maturitas* 2012; 71: 109-114.

MIGLIORE L, COPPEDE F, FENECH M, THOMAS P. Association of micronucleus frequency with neurodegenerative diseases. *Mutagenesis* 2011; 26(1): 85-92.

MIGLIORE L, TESTA A, SCARPATO R, PAVESE N, PETROZZI L, BONUCCELLI U. Spontaneous and induced aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Human Genetics* 1997; 101: 299-305.

MILOSEVIC-DJORDJEVIC O, GRUJICIC D, VASKOVIC Z, MARINKOVIC D. High Micronucleus Frequency in Periphral Blood Lymphocytes of Untreated Cancer Patients Irrespective of Gender, Smoking and Cancer Sites. *Tohoku J. Exp. Med.* 2010; 220: 115-120.

ORTA T, GÜNEBAKAN S. The effect of aging on micronuclei frequency and proliferation in human peripheral blood lymphocytes. *Indian Journal of Human Genetics* 2012; 18 (1): 95-100.

PITTALUGA M, PARISI P, SABATINI S, CRECI R, CAPOROSSI D, VALERIA CATANI M, SAVINI I, AVIGLIANO L. Cellular and biochemical parameters of exercise-induced oxidative stress: relationship with training levels. *Free Radic. Res.* 2006; 40: 607-614.

RICE K M, BLOUGH E R. Sarcopenia-related Apoptosis is regulated differently in fast- and slow-twitch muscles of the aging F344/NxBN rat model. *Mech. Ageing Dev.* 2006; 127: 670-679.

VISSER M, PAHOR M, TAAFFE D R, GOODPASTER B H, SIMONSICK E M, NEWMAN A B, NEVITT M, HARRIS T B. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *J. Gerontol A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2002; 57 (5):326-332.

ROSENBERG I H. Sarcopenia : origins and clinical relevance. *J. Nutr.* 1997; 127 (5): 990-991.

ROSENBERG I H. Summery comments. *Am.J. Clin Nutr* 1989; 50: 1231-1233.

ROUBENOFF R. Sarcopenia and its implication for the elderly. *Eur J. Clin. Nutr.* 2000; 54 (3): 40-47

SIEBER C C. Virtual Clinical Nutrition University: Nutrition in the elderly, pathophysiology . sarcopenia. *European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism* 2009; 4: 77-80.

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

TAAFFE D R. Sarcopenia . exercise as a treatment strategy. *Aust. Fam. Physician* 2006; 35: 130-134.

THOMAS D R. Sarcopenia. *Clin. Geriatr. Med.* 2010; 26 (2):331-346

THOMAS P, WU J, DHILLON V, FENECH M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. *Mutagenesis* 2011; 26(1): 69-76.

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

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

---

Vorname	Heidemarie
Familienname	Peherstorfer
Geburtsdatum	05.11.1955
Geburtsort	Linz
Familienstand	verheiratet, zwei Töchter

## Ausbildung

---

Okt. 1999 Studium der Ernährungswissenschaften

1998 - 2000 Ausbildung zur Ernährungsberaterin nach den 5 Elementen  
(Claude Diolosa)

Okt. 1999 Abschluss der Studienberechtigungsprüfung  
Ernährungswissenschaften, Universität Wien

Feb. 1997 Abschluss der Studienberechtigungsprüfung Medizin, Universität  
Wien

Mai 1996 Lehrabschlussprüfung zur Pharmazeutisch Kaufmännischen  
Assistentin (PKA)

Sept. 1974 Lehrabschlussprüfung zur Drogistin

1971 - 1974 Lehrausbildung Drogistin, Herba Apotheker AG, Linz

1970 - 1971 Fachschule für wirtschaftliche Frauenberufe der Don Bosco  
Schwestern

1962 - 1970 Volks- und Hauptschule in Linz

## **Berufserfahrung**

---

seit Okt. 2009 Vollzeitstudium Ernährungswissenschaften

1988 - 2009 Drogistin bzw. Pharmazeutisch kaufm. Assistentin in der  
Stadtapotheke Urfahr, Linz

Juli 2007 Praktikum Barmherzige Schwestern Linz

2002 - 2005 Ernährungsberatung nach TCM

2002 - 2005 Vortragstätigkeit Volkshochschule Linz

1976 - 1988 Unterbrechung der beruflichen Tätigkeit (Kinderpause)

1971 - 1976 Drogistin bei Herba Apotheker AG