



universität  
wien

# MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Auswirkungen einer zehnwöchigen Trainings- und  
Ernährungsintervention mit variablem  
Kohlenhydratgehalt und glykämischem Index auf  
oxidative DNA-Schäden“

verfasst von / submitted by

Katarina Batljan, BSc

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

Wien, 2024 / Vienna, 2024

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

UA 066 838

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

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Univ. Prof. Dr. med. Daniel König

***Hvala Mama i Tata***

*Danke an Marija, Robert, Jelena, Johanna und Valentina*

*&*

*einen großen Dank an Univ. Prof. Dr. med. Daniel König und Anna Maria Moitzi, Bsc  
Bakk, MSc MSc*

# Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	III
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abstract.....	VII
Zusammenfassung.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Freie Radikale und ROS .....	2
1.2. Oxidativer Stress.....	4
1.3. Antioxidatives Abwehrsystem.....	4
1.4. Einfluss von Lebensstilfaktoren.....	6
1.4.1. Sport.....	6
1.4.2. Ernährung.....	8
1.5. Langfristige Ernährung bei Ausdauersportlern .....	9
1.5.1. LCHF-Diät .....	10
1.5.1.1. Auswirkungen einer LCHF-Diät auf den durch Sport induzierten oxidativen Stress .....	11
1.5.2. Glykämischer Index .....	13
1.5.2.1. Auswirkungen einer LGI-Diät auf den durch Sport induzierten oxidativen Stress .....	15
1.6. Comet – Assay .....	16
1.6.1. Entwicklung.....	16
1.6.2. Färbung, Visualisierung und Quantifizierung .....	19
1.6.3. Aktuelles Prinzip.....	21
2. Methoden und Material.....	24
2.1. Studiendesign.....	24
2.2. Probanden .....	24
2.3. Interventionen .....	25
2.3.1. Trainingsintervention .....	25
2.3.1. Ernährungsintervention.....	25
2.4. Comet-Assay.....	26
2.4.1. Technische Geräte und Equipment.....	26
2.4.2. Chemikalien.....	27
2.4.2. Vorbereitung der Zellen.....	28
2.4.3. Durchführung.....	28

2.4.3.1. Beschichtung der Slides .....	28
2.4.3.2. Herstellung der Lösungen .....	28
2.4.3.2.1. 1M KOH und 10M NaOH .....	28
2.4.3.2.2. Low Melting Agarose (LMA) 0,8 %.....	29
2.4.3.2.3. Puffer F – 10x Stock (Enzymreaktionspuffer für FPG) .....	29
2.4.3.2.4. Lyselösung .....	29
2.4.3.2.5. Elektrophoreselösung.....	29
2.4.3.2.6. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> – Stocklösung.....	29
2.4.3.2.7. FPG .....	30
2.4.3.3. Aufbringen der Zellen auf die Slides .....	30
2.4.3.4. Enzymbehandlung mit FPG .....	31
2.4.3.5. Alkali-Behandlung und Elektrophorese .....	31
2.4.3.5. Neutralisation .....	32
2.4.3.5. Färbung, Visualisierung und Quantifizierung .....	32
2.5. Statistische Auswertung .....	33
3. Ergebnisse .....	34
3.1. Studienkollektiv .....	34
3.1.1. Alter.....	34
3.1.1. Body Mass Index .....	35
3.2. Ergebnisse Comet-Assay .....	36
3.2.1. Lysis Behandlung.....	36
3.2.2. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Behandlung .....	38
3.2.3. FPG-Behandlung.....	40
4. Diskussion.....	42
5. Limitationen.....	45
6. Zusammenfassung.....	48
7. Literaturverzeichnis .....	49
8. Anhang .....	i
8.1. Vorbereitung Comet-Assay .....	i
8.1. Durchführung Comet-Assay .....	ii

## Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Firmen und Produktnamen der technischen Geräte und der Materialien .....</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 2: Chemikalien.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 3: Anzahl der ausgewerteten Probanden.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 4: Deskriptive Analyse des Alters .....</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 5: Deskriptive Analyse des BMIs.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 6: Deskriptive Analyse der Lyse Behandlung auf % tail-DNA.....</i>	<i>37</i>
<i>Tabelle 7: Two-way mixed ANOVA: Einfluss von Zeitpunkt und Gruppe auf % tail-DNA .....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 8: Deskriptive Analyse der H2O2 Behandlung auf % tail-DNA .....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 9: Two-way mixed ANOVA: Einfluss von Zeitpunkt und Gruppe auf % tail-DNA .....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 10: Deskriptive Analyse der FPG-Behandlung auf % tail-DNA.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 11: Two-way mixed ANOVA: Einfluss von Zeitpunkt und Gruppe auf % tail-DNA .....</i>	<i>41</i>

## Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Reduktion von molekularem Sauerstoff (Lushchak, 2014.)</i> .....	3
<i>Abbildung 2: (A) Darstellung der ROS-Jormesis-Kurve. (B) Zusammenhang zwischen den durch körperliche Bewegung induzierte ROS-Produktion und der physiologischen Funktion (Powers et al., 2020).</i> .....	7
<i>Abbildung 3: loops or fragments (Shaposhnikov et al., 2015)</i> .....	18
<i>Abbildung 4: Visuelle Klassifizierung, vorgeschlagen von Collins et al. (1995).</i> .....	20
<i>Abbildung 5: Pipettierschema für einen Probanden (Anna Moitzi, 2023)</i> .....	30
<i>Abbildung 6: Altersverteilung pro Gruppe</i> .....	35
<i>Abbildung 7: Boxplot</i> .....	36
<i>Abbildung 8: Effekte der Ernährungsintervention auf % tail-DNA vor und nach der Intervention</i> .....	37
<i>Abbildung 9: Effekte der Ernährungsintervention auf % tail-DNA vor und nach der Intervention</i> .....	39
<i>Abbildung 10: Effekte der Ernährungsintervention auf % tail-DNA vor und nach der Intervention</i> .....	40
<i>Abbildung 11: Screenshot eines Kometen im Comet-Assay IV Bildanalyzesystem (Comet Assay IV, 2023)</i> .....	46

# Abkürzungsverzeichnis

% tail-DNA	
prozentuale DNA im Schweif .....	21
8-oxoG	
7,8-Dihydro-8-oxoguanosin .....	4
ALS	
alkalilabile Regionen .....	19
AP	
Apurin-/Apyrimidin-Stellen .....	22
Aqua dest.	
destilliertes Wasser .....	29
CAT	
Katalase .....	5
CHO	
Kohlenhydrate .....	11
ER	
endoplasmatisches Retikulum .....	2
ETC	
Elektronentransportkette .....	3
FFAs	
freie Plasmafettsäuren .....	10
FPG	
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase .....	23
GI	
glykämischer Index .....	13
GPXs	
GLutathionperoxidase .....	5
GSH	
reduziertes Glutathion .....	5
H <sub>2</sub> O	
Wasser .....	5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
Wasserstoffperoxid .....	3
head	
Kopf .....	18
HGI-Diät	
kohlenhydratreiche Diät mit hohem glykämischen Index .....	2
HO	
Hydroxylradikal .....	3
IMTGs	
intramuskuläre Triglyceridspeicher .....	10
KD	
ketogene Diät .....	12
LCHF-Diät	
kohlenhydratarme, fettreiche Diät .....	2
LGI-Diät	
kohlenhydratreiche Diät mit niedrigem glykämischen Index .....	2
LMA	
Low Melting Agarose .....	30

MDA	
Malondialdehyd .....	12
NMA	
Normal Melting Agarose.....	29
O <sub>2</sub>	
Sauerstoff.....	5
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	
Superoxid-Anion Radikal .....	3
OH	
Hydroxylanion .....	3
PBMCs	
periphere mononukleäre Blutzellen .....	46
PDH	
Pyruvatdehydrogenase .....	11
post	
nach der Studie.....	25
pre	
Vor der Studie .....	25
RNS	
reaktive Stickstoffspezies.....	4
ROH	
Alkohol .....	5
ROOH	
organisches Hydroperoxid .....	5
ROS	
reaktive Sauerstoffspezies.....	1
SOD	
Superoxiddismutase .....	3
tail	
Schweif .....	18
TBA	
Thiobarbitursäure .....	12
TBARS	
Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen.....	12
Vitamin C	
Ascorbinsäure .....	5

## Abstract

**Introduction:** Physical exercise can cause oxidative stress. A suitable non-invasive method to reduce oxidative stress during exercise is an adequate intake of antioxidants via the diet. The aim of this master's thesis was to investigate the effects of different diets (LGI, HGI or LCHF) on oxidative DNA status in endurance athletes.

**Methods:** This randomised, non-blinded intervention study included 30 male, non-professional athletes and spanned a duration of ten weeks. The intervention comprised a standardised training intervention and a nutritional intervention: a high-fat, low-carbohydrate diet (LCHF), a high-carbohydrate diet with a low glycaemic index (LGI) or a high glycaemic index (HGI). Blood samples were taken before and after the intervention and DNA damage was detected in whole blood using the Comet assay. Furthermore, oxidised DNA bases were determined by an additional incubation step with FPG and the resistance of the cells to external oxidative stress was measured by treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Results:** None of the three nutritional interventions showed a significant protective effect against oxidative DNA damage. Nevertheless, a downward trend was observed in the LGI group after all three treatments.

**Limitations:** There were numerous limitations in this study that may not have led to statistical significance in the results. This includes storing the blood samples at -20°C instead of -80°C and the challenge of counting comets (small number, overlapping comets and a noisy background).

**Conclusion:** Reduced levels of % tail DNA in the LGI group after Lysis, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and FPG treatment suggest that a diet rich in antioxidants and avoiding acute hyperglycaemia has the potential to reduce oxidative DNA damage.

## Zusammenfassung

**Einleitung:** Körperliche Bewegung kann oxidativen Stress hervorrufen. Eine geeignete nichtinvasive Methode, zur Reduzierung von oxidativem Stress während körperlicher Belastung, ist eine angemessene Zufuhr von Antioxidantien über die Ernährung. Ziel dieser Masterarbeit war es, die Auswirkungen verschiedener Ernährungsformen (LGI, HGI oder LCHF) auf den oxidativen DNA-Status bei Ausdauersportlern zu untersuchen.

**Methoden:** An dieser randomisierten, nicht-verblindeten Interventionsstudie nahmen 30 männliche, nicht-professionelle Athleten für zehn Wochen teil. Die Intervention umfasste eine einheitliche Trainingsintervention sowie eine Ernährungsintervention: eine fettreiche, kohlenhydratarme Diät (LCHF), eine kohlenhydratreiche Diät mit einem niedrigen (LGI) oder einem hohen glykämischen Index (HGI). Vor und nach der Intervention wurden Blutproben entnommen und DNA-Schäden wurden im Vollblut mit dem Comet-Assay nachgewiesen. Außerdem wurden oxidierte DNA-Basen durch einen zusätzlichen Inkubationsschritt mit FPG ermittelt und die Widerstandsfähigkeit der Zellen gegenüber externem oxidativem Stress wurde durch die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemessen.

**Ergebnisse:** Keine der drei Ernährungsinterventionen zeigte eine signifikante Schutzwirkung gegenüber oxidativen DNA-Schäden. Dennoch konnte eine sinkende Tendenz in der LGI-Gruppe nach allen drei Behandlungen beobachtet werden.

**Limitationen:** In dieser Studie gab es zahlreiche Limitationen, die möglicherweise zu keiner statistischen Signifikanz in den Ergebnissen geführt haben. Dazu gehört die Lagerung der Blutproben bei -20°C statt bei -80°C und die Herausforderung bei der Kometenzählung (geringe Anzahl, überlappende Kometen und ein rauschiger Hintergrund).

**Schlussfolgerung:** Reduzierte Werte der % tail-DNA in der LGI-Gruppe nach einer Lyse-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und FPG-Behandlung deuten darauf hin, dass eine Diät, die reich an Antioxidantien ist und eine akute Hyperglykämie vermeidet, das Potenzial besitzt, oxidativen DNA-Schaden zu reduzieren.

# 1. Einleitung

In physiologischen Prozessen entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowohl durch endogene als auch durch exogene Quellen. Abhängig von der ROS-Konzentration zeigen sie eine positive (z.B. Immunfunktion) oder eine negative (z.B. Schäden an Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren) Funktion. Um diesen negativen Einfluss zu mildern, sind antioxidative Abwehrsysteme von entscheidender Bedeutung. Das Abwehrsystem setzt sich aus enzymatischen (Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase) und nicht-enzymatischen (Glutathion, Harnsäure und Antioxidantien in der Nahrung wie Vitamin E, C) Antioxidantien zusammen. Wenn ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und den Abwehrmechanismen des Körpers herrscht, dann führt das zu oxidativen Stress.

Es ist bekannt, dass körperliche Bewegung durch den gesteigerten oxidativen Stoffwechsel auch oxidativen Stress hervorrufen kann. Trainingsart und -intensität bestimmen das Ausmaß: moderate Belastung führt zu keinem oxidativen Stress und zeigt sogar eine antioxidative Schutzwirkung, während eine intensive erschöpfende Belastung (z.B. Laufen) zu erhöhtem oxidativem Stress und unerwünschten Auswirkungen führen kann.

Aus diesem Grund scheint eine Unterstützung endogener Abwehrsysteme durch eine angemessene Zufuhr von Antioxidantien über eine abwechslungsreiche und ausgewogene Ernährung ein geeignetes nichtinvasives Instrument zur Vorbeugung oder Reduzierung von oxidativem Stress während körperlicher Belastung zu sein. Die Verwendung von Antioxidantien als Nahrungsergänzungsmittel ist ein umstrittenes Thema, da ein Übermaß an exogenen Antioxidantien sich nachteilig auf die Gesundheit und die Leistungsfähigkeit auswirken können.

Diese Masterarbeit untersucht die Effekte einer zehnwöchigen Trainings- und Ernährungsintervention mit variabler Kohlenhydratzufuhr und glykämischem Index auf oxidative DNA-Schäden. Im Fokus steht die Analyse, inwiefern körperliche Aktivität den oxidativen Stress beeinflusst und ob eine gezielte Ernährungsmethode dazu beitragen kann, diesen zu minimieren. Die Ernährungsintervention umfasst populäre Ernährungsmethoden im Sportbereich: eine fettreiche, kohlenhydratarme Diät (LCHF-

Diät) sowie eine kohlenhydratreiche Diät, entweder mit einem niedrigen glykämischen Index (LGI-Diät) oder einem hohem glykämischen Index (HGI-Diät). Der Comet-Assay, eine etablierte Methode zur Untersuchung von DNA-Schäden auf Einzelzellebene, wird zur Bewertung des oxidativen Stresslevels eingesetzt.

Es wird erwartet, dass eine LGI-Diät zu niedrigeren oxidativen DNA-Schäden führt, im Vergleich zu einer HGI-Diät und einer LCHF-Diät.

In dieser Arbeit werden geschlechtsneutrale Bezeichnungen verwendet. Ausdrücke wie „Sportler“ sollen gleichermaßen für Angehörige aller Geschlechter gelten, außer es wird explizit darauf hingewiesen, um welches Geschlecht es sich handelt.

### 1.1. Freie Radikale und ROS

Freie Radikale sind kleine diffusionsfähige Moleküle, die aufgrund des ungepaarten Elektrons hochreaktiv sind (Ziech et al., 2010). Aufgrund der hohen Reaktivität ist es ihnen möglich, Elektronen von anderen Verbindungen zu abstrahieren, um Stabilität zu erreichen. Jedoch verliert das angegriffene Molekül sein Elektron und wird selbst zu einem freien Radikal, wodurch eine Kettenreaktion in Gang gesetzt wird, was schließlich zu Zellschäden führen kann (Phaniendra et al, 2015).

Zu den freien Radikalen gehören reaktive Sauerstoffspezies. Der Begriff bezieht sich sowohl auf sauerstoffzentrierte Radikale als auch auf Nicht-Radikale, die reaktive Derivate von Sauerstoff sind (z.B.  $H_2O_2$ ) (Powers et al., 2020). ROS kann entweder aus endogenen oder exogenen (Umweltverschmutzung, Alkohol, Tabakrauch, Schwermetalle, Übergangsmetalle, industrielle Lösungsmittel, Pestizide, bestimmte Drogen wie Halothan, Paracetamol und Strahlung) Quellen produziert werden (Phaniendra et al, 2015).

Zu den endogenen Quellen von ROS werden Mitochondrien als Hauptquelle gezählt, aber auch andere Organellen stimulieren die ROS-Produktion. Beispielsweise Peroxisomen und das endoplasmatische Retikulum (ER) sowie nahezu alle Enzyme, die Sauerstoff nutzen, einschließlich NADPH-Oxidase, mikrosomales Cytochrom P450 und zytoplasmatische Xanthinoxidase (Kaminsky & Zhivotovsky, 2014).

ROS entsteht unter aeroben Bedingungen in der Elektronentransportkette (ETC), bei der weniger als 10% des verbrauchten Sauerstoffs über aufeinanderfolgende Ein-Elektron-Wege reduziert werden.

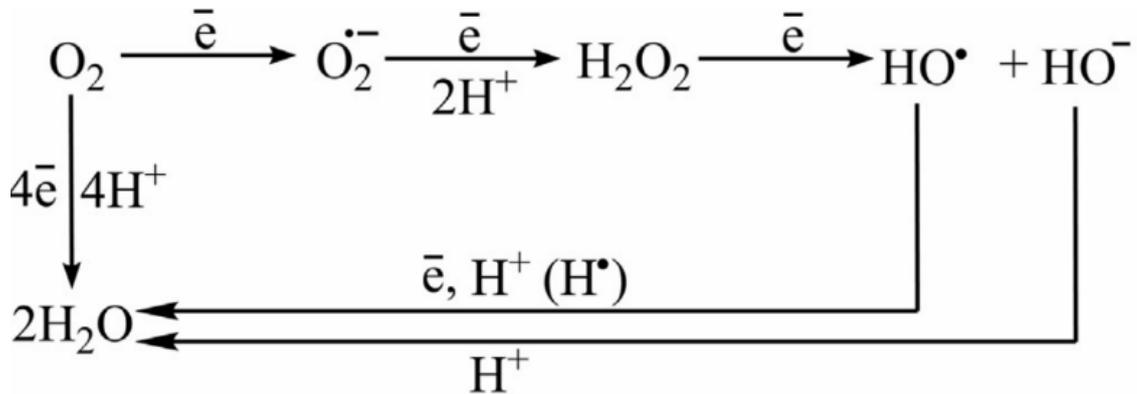


Abbildung 1: Reduktion von molekularem Sauerstoff (Lushchak, 2014.)

Das führt zur Umwandlung von molekularem Sauerstoff in Superoxid-Anion Radikale ( $\text{O}_2^{\bullet -}$ ), gefolgt von einer Ein-Elektronen-Reduktion mit gleichzeitiger Aufnahme von zwei Protonen, was Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ergibt (Lushchak, 2014). Die Reduktion von  $\text{O}_2^{\bullet -}$  erfolgt spontan oder wird durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) katalysiert.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist ein nichtradikales ROS, das für Membranen durchlässig ist und eine relativ lange Halbwertszeit in der Zelle hat. Daher schädigen chronisch hohe zelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Spiegel die Zellbestandteile und sind zytotoxisch.  $\text{H}_2\text{O}_2$  nimmt ein weiteres Elektron auf und wird in ein Hydroxylradikal (HO) und ein Hydroxylanion (OH) gespalten. Schließlich interagiert das HO mit einem weiteren Elektron und Proton, was zur Bildung von Wassermolekülen führt (Lushchak, 2014). Im Vergleich zu anderen reaktiven Spezies gelten Hydroxylradikale aufgrund ihrer hohen Reaktivität als die schädlichsten ROS (Powers et al., 2020).

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehören nicht nur die oben erwähnten Moleküle  $\text{O}_2^{\bullet -}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und HO, sondern auch verschiedene Peroxide, wie Lipidperoxide und Peroxide von Proteinen und Nukleinsäuren. Darüber hinaus gibt es auch viele andere reaktive Spezies von Stickstoff (RNS), Kohlenstoff, Schwefel, Halogenen und viele mehr (Lushchak, 2014).

## 1.2. Oxidativer Stress

Aufgrund der vorteilhaften und schädlichen Wirkung von ROS auf biologische Systeme, spielen ROS eine doppelte Rolle. Die positiven Funktionen treten bei moderaten oder niedrigen Konzentrationen auf und sind an verschiedenen physiologischen Funktionen beteiligt, beispielsweise an der Immunfunktion (d. h. der Abwehr pathogener Mikroorganismen), an einer Reihe zellulärer Signalwege, an der mitogenen Reaktion und an der Redoxregulation (Phaniendra et al, 2015).

Bei höheren Konzentrationen von ROS wird oxidativer Stress erzeugt (Phaniendra et al, 2015). Oxidativer Stress ist definiert als „ein Ungleichgewicht zwischen Oxidationsmitteln und Antioxidantien zugunsten der Oxidationsmittel, das zu einer Störung der Redoxsignalisierung und -kontrolle und/oder zu molekularen Schäden führt“ (Sies & Jones, 2007, nach Sies et al., 2017, S. 717). Das bedeutet, dass der Überschuss an ROS, und somit ein Mangel an enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien, zu potenziellen Schäden bei Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren führen kann (Phaniendra et al, 2015).

Das Hydroxylradikal reagiert mit allen Komponenten des DNA-Moleküls und schädigt dabei sowohl die Purin- und Pyrimidinbasen als auch das Desoxyribose-Rückgrat. In diesem Zusammenhang ist die Bildung von 7,8-Dihydro-8-oxoguanosin (8-oxoG) die am ausführlichsten untersuchte DNA-Schädigung. Aus diesem Grund wird oxidativer Stress mit einer Reihe menschlicher Krankheiten, wie Diabetes mellitus und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, sowie mit dem Alterungsprozess in Verbindung gebracht (Phaniendra et al, 2015, Kaminsky & Zhivotovsky, 2014).

## 1.3. Antioxidatives Abwehrsystem

Für die Zellgesundheit ist die Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts besonders wichtig und um das Risiko oxidativer Schäden in Zeiten erhöhter ROS-Produktion zu verringern, spielen antioxidative Abwehrmechanismen eine Schlüsselkomponente (Powers & Jackson, 2008). Unter dem Begriff Antioxidantien werden im Allgemeinen alle Substanzen definiert, die die Oxidation eines Substrates deutlich verzögern oder verhindern (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Im Kampf gegen eine ROS-Toxizität gibt es zahlreiche antioxidative Strategien, die eingesetzt werden können. Einige Wirkstoffe, wie zum Beispiel Katalase, wandeln ROS

in weniger aktive Moleküle um und verhindern somit die Umwandlung in eine schädlichere Form. Weiterhin ist es wichtig, die Verfügbarkeit von Prooxidantien wie Eisen- und Kupferionen über metallbindende Proteine zu begrenzen. Zusätzlich können zahlreiche niedermolekulare Verbindungen, die im Körper produziert werden, wie Glutathion, Harnsäure und Bilirubin, sowie antioxidative Stoffe in unserer Nahrung, wie Ascorbinsäure (Vitamin C) und Vitamin E, ROS einfangen und unschädlich machen (Powers & Jackson, 2008).

Zellen enthalten sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Antioxidantien. Superoxiddismutase (SOD), Glutathionperoxidase (GPXs) und Katalase (CAT) gehören zu den wichtigsten antioxidativen Enzymen. SOD bildet die erste Verteidigungslinie gegen Superoxidradikale, da SOD Superoxidradikale unter Bildung von Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Sauerstoff ( $O_2$ ) dismutiert. GPXs sind für die Reduktion von  $H_2O_2$  oder organischem Hydroperoxid (ROOH) unter Bildung von Wasser ( $H_2O$ ) bzw. Alkohol (ROH) verantwortlich. Für diese Reaktion ist ein Elektronendonator notwendig, wie reduziertes Glutathion (GSH). Die Hauptfunktion des antioxidativen Enzyms CAT ist der Abbau von  $H_2O_2$  in  $H_2O$  und  $O_2$ . Neben den primären antioxidativen Enzymen tragen auch weitere Enzyme direkt oder indirekt zum zellulären Schutz vor Oxidation bei. Dazu gehören Enzyme wie Peroxiredoxin, Glutaredoxin und Thioredoxinreduktase (Powers & Jackson, 2008).

Wie oben erwähnt, gibt es in den Zellen auch zahlreiche nicht-enzymatische Antioxidantien (z.B. GSH, Harnsäure, Bilirubin). GSH spielt eine wichtige Rolle bei der Prävention von oxidativem Stress. Zu dem Aufgabengebiet von GSH gehört, dass es direkt mit verschiedenen Radikalen reagieren kann, indem es ein Wasserstoffatom abgibt und es als Substrat für GPXs fungiert, um  $H_2O_2$  und organische Hydroperoxide zu eliminieren. Außerdem reduziert GSH andere Antioxidantien wie Vitamin E und C in der Zelle. Das trägt zu deren Aufrechterhaltung im reduzierten Zustand bei, da es sich dabei um begrenzte Ressourcen handelt (Powers & Jackson, 2008).

Wichtige Antioxidantien in der Nahrung sind zum Beispiel Vitamin E, Vitamin C und Carotinoide. Vitamin E, insbesondere alpha-Tocopherol, schützt Zellmembranen vor oxidativem Stress und Carotinoide ermöglichen das Abfangen verschiedener ROS-Spezies, einschließlich Superoxid- und Peroxylradikalen. Im Gegensatz zu Vitamin E und

Carotinoiden ist Vitamin C hydrophil und kann Superoxid-, Hydroxyl-, und Lipidhydroperoxidradikale direkt abfangen. Zudem ist Vitamin C entscheidend beim Recycling von Vitamin E, wodurch ein effizientes Antioxidans-Netzwerk aufrechterhalten wird (Powers & Jackson, 2008).

#### 1.4. Einfluss von Lebensstilfaktoren

Mehrere Faktoren beeinflussen die Anfälligkeit für oxidativen Stress, indem der Antioxidansstatus oder die Bildung freier Sauerstoffradikale beeinflusst wird. Einige dieser Faktoren sind rätselhaft, da sie neben ihrer unmittelbar oxidierenden Eigenschaft auch eine langfristige Schutzwirkung besitzen. Dazu gehört der Lebensstil, der entweder endogenen (Sport) oder exogenen (Nahrung) Ursprungs sein kann. Diese wirken häufig gleichzeitig und es ist zu erwarten, dass ihre Wirkungen zumindest additiv oder eher synergistisch sind (Moller et al, 1996).

##### 1.4.1. Sport

Bewegung ist auf zwei Arten mit oxidativem Stress assoziiert. Einerseits wird der oxidative Stoffwechsel erhöht, was zu oxidativem Stress führt, andererseits scheinen die Anpassungen an regelmäßiges Training eine antioxidative Schutzwirkung zu haben (Moller et al, 1996). Es ist allgemein bekannt, dass regelmäßige, nicht erschöpfende körperliche Bewegung eine positive Auswirkung auf Krankheiten wie Diabetes mellitus oder koronare Herzkrankheiten hat. Dabei kommt es zur Verbesserung des Plasma-Lipidspiegels, zur Erhöhung der Knochendichte und hilft beim Abnehmen. Allerdings gehen die positiven Effekte von Bewegung durch Erschöpfung und mangelndes Training verloren (Vina et al., 2000).

Die erhöhte Stoffwechselrate, die mit körperlicher Bewegung einhergeht, erhöht den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch im Muskelgewebe und dementsprechend auch die Bildung mitochondrialer ROS (Packer et al., 2008). Die Pionierarbeit von Davies et al zeigt, dass Laufen bis zur Erschöpfung zu einem zwei- bis dreifachen Anstieg der Konzentration freier Radikale in Muskeln und in der Leber der Ratte führt. Die erschöpfende körperliche Betätigung führte auch zu einem Anstieg der Lipidperoxidationsprodukte (Davies et al., 1982). Weitere Arbeitsgruppen, wie Sastre et al, kamen ebenfalls zu dem Entschluss, dass eine einzige Trainingseinheit nur dann oxidativen Stress verursacht, wenn sie erschöpfend ist. Sie fanden eine lineare

Korrelation zwischen den Verhältnissen von oxidiertem zu reduziertem Glutathion und Laktat zu Pyruvat (Sastre et al., 1992).

Die unerwünschten Auswirkungen können durch Training teilweise verhindert werden. Kurz nach der Studie von Davies et al., zeigten Salminen und Vihko, dass Ausdauertraining die Anfälligkeit für Schäden durch freie Radikale verringert. In dieser Studie wurden die Lipidperoxidationskapazitäten in den Muskeln von Mäusen untersucht, die entweder Ausdauertraining durchgeführt haben oder nicht und das Ausdauertraining erhöhte die Widerstandsfähigkeit der Muskulatur gegenüber Verletzungen durch Lipidperoxidation (Salminen & Vihko, 1983).

Das bedeutet, dass es bei der Durchführung einer einzelnen Trainingseinheit eine Intensitätsschwelle gibt: Mäßiges Training führt nicht zu oxidativem Stress, wohingegen intensives Training in Verbindung mit Erschöpfung dies tut (Alessio, 1993). Das wird durch das Konzept "durch Bewegung induzierte Hormesis" unterstützt.

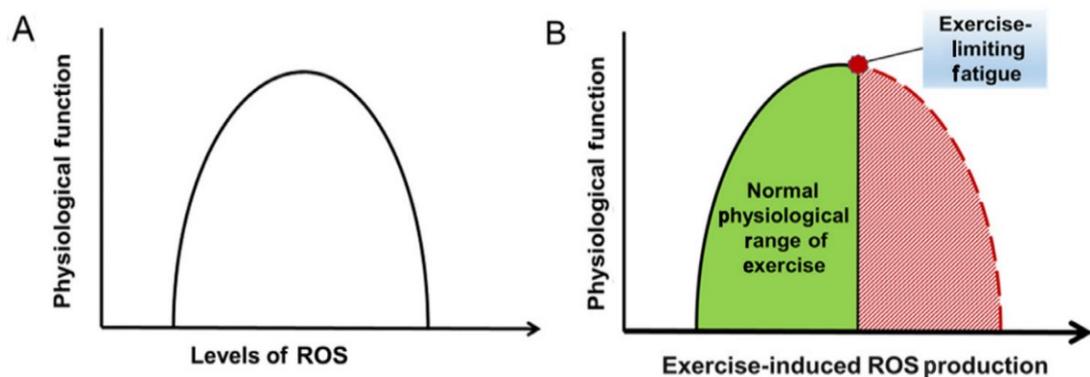


Abbildung 2: (A) Darstellung der ROS-Hormesis-Kurve. (B) Zusammenhang zwischen den durch körperliche Bewegung induzierte ROS-Produktion und der physiologischen Funktion (Powers et al., 2020).

Der Begriff Hormesis wird verwendet, um eine biphasische Dosis-Wirkungskurve zu beschreiben. Das impliziert, dass kleine Mengen des Stressors (z.B. Radikale) vorteilhafte adaptive Effekte auf Zellen haben können, während hohe Mengen des Stressors zu Schäden an den Zellen führen. Wie man in Abbildung 2 sehen kann, erreichen geringfügige Mengen an ROS, die durch Bewegung erzeugt werden, kein schädliches Niveau. Stattdessen spielen sie sogar eine entscheidende Rolle bei der Anpassung der Skelettmuskulatur an die Bewegung (Powers et al., 2020).

#### 1.4.2. Ernährung

Ascorbat, Tocopherole, Polyphenole und Carotinoide sind als Antioxidantien in der Nahrung bekannt. Da der Mensch sie nicht selbst synthetisieren kann, ist eine Zufuhr über die Nahrung, meist aus pflanzlichen Produkten, erforderlich. Antioxidantien aus der Ernährung sind besonders wichtig, um dem Körper dabei zu helfen, die schädlichen Auswirkungen von ROS in Stressphasen entgegenzuwirken (Andre et al., 2010).

Ein wichtiges lipidlösliches Antioxidans ist zum Beispiel Vitamin E, das Singulett-Sauerstoff unterdrückt und die Lipidperoxidation hemmt. In der Studie von Hartmann et al., wurde der Einfluss von Vitamin E auf DNA-Schäden in weißen Blutzellen von Menschen nach einem einzigen erschöpfenden Ausdauerlauf untersucht. Eine kurzfristige Einnahme von Multivitamin oder Vitamin E reduzierte die DNA-Schäden bei einigen Probanden. Jedoch zeigte eine 14-tägige Einnahme von Vitamin E vor dem Training, dass die DNA-Schäden bei allen Probanden deutlich verringert wurden und bei vier von fünf Personen verhinderte die Supplementierung vollständig die Entstehung von DNA-Schäden nach dem intensiven Training (Hartmann et al., 1995).

Die Meta-Analyse von Stepanyan et al. wurde durchgeführt, um bestehende Literatur zu identifizieren und zusammenzufassen, die die Auswirkungen einer Tocopherol Supplementierung auf die sportliche Leistung und oxidativen Stress untersuchen. Im Gegensatz zur Studie von Hartmann et al., zeigte diese systematische Zusammenfassung von 14 ausgewählten Studien keine signifikant schützende Wirkung von Vitamin E Supplementen gegen durch Sport verursachten oxidativen Stress (Stepanyan et al., 2014).

Die Verwendung von Antioxidantien als Nahrungsergänzungsmittel ist ein umstrittenes Thema, denn die Wirksamkeit hängt von verschiedenen Faktoren ab, einschließlich der Dosierung, der Trainingsart und des individuellen oxidativen Stressniveaus. Außerdem zeigt die aktuelle Studienlage, dass eine strenge Definition als Pro- oder Antioxidantien für Vitamin E wie auch für andere antioxidative Moleküle etwas schwer ist, da Antioxidantien sowohl in vivo als auch in vitro als Folge ihrer physikalischen Eigenschaften sowie Dosis und Dauer einer Supplementierung zu Prooxidantien werden können (Pingitore et al., 2015).

Resveratrol, ein Polyphenol mit antioxidativen Eigenschaften, zeigt zum Beispiel unter bestimmten experimentellen Bedingungen prooxidative Aktivitäten. In einer Studie

wurde der DNA-Status von 25 Läufern mit Hilfe des Comet Assays bewertet. Dabei wurde die Resveratrol-Behandlung direkt in Agarose eingebettete Zellen durchgeführt und je nach individuellem Grundzustand des oxidativen Stresses konnte Resveratrol (100  $\mu$ M) vom Antioxidans zum Prooxidans wechseln, was in vitro zu höheren DNA-Schäden führte (Tomasello et al., 2012).

Das bedeutet, dass ein Übermaß an exogenen Antioxidantien sich nachteilig auf die Gesundheit und die Leistungsfähigkeit auswirken kann. Im Vergleich zu Kapseln enthalten vollwertige Lebensmittel Antioxidantien in natürlichen Verhältnissen, die synergistisch wirken können, um die antioxidative Wirkung zu optimieren. Daraus lässt sich vermuten, dass eine angemessene Zufuhr von Antioxidantien über eine abwechslungsreiche und ausgewogene Ernährung eine bessere Schutzwirkung gegen Bewegung induzierte ROS-Produktion hat als einzelne sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (Pingitore et al., 2015).

Angesichts der Erkenntnisse über die synergistischen Effekte natürlicher Antioxidantien in vollwertigen Lebensmitteln und deren potenzieller Fähigkeit oxidative Schäden zu minimieren, richtet sich der Fokus im nächsten Kapitel auf die Untersuchung verschiedener Ernährungsweisen im Sport und deren Auswirkungen auf den oxidativen Stress. Näher eingegangen wird auf eine kohlenhydratreiche Ernährung mit hohem oder niedrigem glykämischen Index sowie auf eine fettreiche und kohlenhydratarme Ernährung.

### 1.5. Langfristige Ernährung bei Ausdauersportlern

Die Fähigkeit Ausdaueraktivitäten wie Laufen durchzuführen, hängt vor allem vom oxidativen/aeroben Stoffwechsel ab. Die Hauptsubstrate für den Energiestoffwechsel bei längerem Ausdauertraining sind Kohlenhydrate und Fett; Protein trägt nur in geringem Maße (<5%) zur ATP-Bereitstellung bei (Alghannam et al., 2021).

Konkret werden Muskelglykogen und Blutzucker (Glukose) sowie intramuskuläre Triglyceridspeicher (IMTGs) und freie Plasmafettsäuren (FFAs) zu den Kraftstoffquellen des Muskels gezählt. Das Verhältnis zwischen der Oxidation von Fett- und Kohlenhydratquellen im aktiven Muskel hängt von der Trainingsintensität und -dauer ab. Bei geringerer Intensität werden FFAs für die Energieproduktion genutzt, während bei höherer Intensität vermehrt auf Muskelglykogen, Blutzucker und IMTGs zurückgegriffen

wird. Die maximale Fettoxidation erfolgt typischerweise zwischen 45 und 65 % der maximalen Sauerstoffaufnahme und über diesem Schwellenwert, was näher an der typischen Trainingsintensität vieler Ausdauersportarten liegt, überwiegt die Oxidation von Kohlenhydraten (hauptsächlich Muskelglykogen). Bei längeren Trainingseinheiten nimmt der Beitrag von IMTGs und Glykogen ab, während FFAs und Blutzucker zunehmend zur Energieproduktion beitragen (Howard et Margolis, 2020).

Wenn es zu einer Ermüdung während längerem Training kommt, ist das mit entleerten Glykogenspeichern in der Skelettmuskulatur verbunden. Der Beginn der Erschöpfung ist abhängig vom anfänglichen Muskelglykogengehalt und die Trainingsdauer kann durch eine ernährungsbedingte Beeinflussung des Muskelglykogens verlängert oder verkürzt werden (Williams et al., 2013).

Daher konzentrieren sich Ernährungsstrategien (durch erhöhte Fett- oder Kohlenhydratzufuhr) bei Ausdauersportlern auf eine Steigerung der Fettoxidation, um die Geschwindigkeit der Kohlenhydratoxidation zu reduzieren und begrenzte endogene Kohlenhydratspeicher zu erhalten (Burke und Kiens, 2006).

#### 1.5.1. LCHF-Diät

Eine Möglichkeit die Ausdauerleistung bei trainierten Personen zu verbessern, durch Steigerung der Muskelfettverwertung und Verringerung der Abhängigkeit von Muskelglykogen, ist die Anpassung an eine kohlenhydratarme (<25 % Energie) und fettreiche (>60 % Energie) Diät (Burke et al., 2016).

Es hat sich gezeigt, dass eine LCHF-Diät (zwei bis vierwöchige Exposition) die Fettoxidation deutlich erhöht, jedoch wird der Muskelglykogengehalt während der Anpassungsphase reduziert. Ein Versuch dem entgegenzuwirken ist die Zufuhr von Kohlenhydraten vor einer längeren Trainingseinheit. Trotz dieser Bemühungen scheint die LCHF-Diät per se nicht zu einer deutlichen Steigerung der Trainingskapazität oder Leistung zu führen. Mittlerweile gibt es sogar Hinweise darauf, dass eine fettreiche Ernährung nicht glykogensparend ist, wie bisher angenommen, sondern in Wirklichkeit zu einer Herunterregulierung des Kohlenhydratstoffwechsels führt (Burke und Kiens, 2006).

Denn die Fettanpassung hat Auswirkungen auf die Regulierung von Pyruvatdehydrogenase (PDH), ein Schlüsselenzym, das die Oxidation von Kohlenhydraten (CHO) im Muskel reguliert. Es wird angenommen, dass durch die Verringerung der zirkulierenden Insulinkonzentration und die erhöhten FFA-Spiegel, die PDH-Aktivität herunterreguliert wird (Yeo et al., 2011). Stellingwerff et al. untersuchten die Auswirkungen einer fünftägigen fettreichen Diät mit Training und darauffolgender eintägiger CHO-Wiederherstellung auf die Aktivität von PDH. Trotz der aufgefüllten Muskel- und Blutkohlenhydratspeicher, durch die eintägigen Kohlenhydratzufuhr, konnte die PDH-Aktivität nicht gesteigert werden (Stellingwerff et al., 2006). Und diese Unterdrückung der PDH-Aktivität und der CHO-Oxidation kann sich negativ auf hochintensives Training auswirken, wenn der Kohlenhydratbedarf der Muskeln am höchsten ist. Die Tatsache, dass die PDH-Aktivität trotz einer CHO-Wiederherstellung weiterhin reduziert ist, deutet darauf hin, dass solche Ansätze nicht empfehlenswert sind, wenn eine anhaltende hohe Trainingsintensität gefordert ist (Yeo et al., 2011).

#### *1.5.1.1. Auswirkungen einer LCHF-Diät auf den durch Sport induzierten oxidativen Stress*

Es existieren nur wenige Studien, die Informationen darüber liefern, wie sich eine LCHF-Diät auf den entstehenden oxidativen Stress bei Ausdauersportlern auswirkt. Es sollte beachtet werden, dass kohlenhydratarme Diäten ein höheres Risiko für einen Nährstoffmangel aufweisen, da sie eine Einschränkung der Lebensmittelauswahl erzwingen. Typischerweise sind wenig Ballaststoffe und Mikronährstoffe (Eisen, Magnesium, Eisen, Kalium, Folsäure und Antioxidantien) enthalten, sind aber reich an gesättigten Fettsäuren und Cholesterin. Eine kohlenhydratarme, fettreiche Diät besteht aus wenig Obst, Gemüse und Getreide, die bei langfristiger Einnahme zu einem erhöhten Risiko von oxidativem Stress führen kann (Bilsborough & Crowe, 2003).

Eine Studie, die etwas Licht ins Dunkel bringt, untersuchte bei Ratten den Einfluss einer achtwöchigen Keto-Diät hinsichtlich des Schutzes vor Muskel- und Organschäden nach dem Training sowie den Einfluss auf die Erholung von Müdigkeit. Zur Bewertung des oxidativen Stresses im Muskel und in der Leber wurde das Mikrotiterplatten-Assay-Kit für Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) und das Protein Carbonyl Assay Kit verwendet (Huang et al., 2018). TBARS-Assay ist ein indirekter Indikator für den Grad des oxidativen Stresses. Der Test beinhaltet die Reaktion von Lipidperoxidationsprodukten, hauptsächlich Malondialdehyd (MDA), mit

Thiobarbitursäure (TBA), was zur Bildung von MDA-TBA<sub>2</sub>-Addukten namens TBARS führt (Leon et Borges, 2020). Der Proteincarbonylgehalt ist ein Marker für die Proteinperoxidation (Powers & Jackson, 2008). Die Autoren haben festgestellt, dass nach der erschöpfenden Laufeinheit sowohl die TBARS- als auch die Proteincarbonyl-Spiegel im Muskel angestiegen sind. Obwohl eine ketogene Diät im Ruhezustand keine Zunahme der Lipidperoxidation verursachte, trug die Ernährung (im Vergleich zur Kontrollgruppe) zum durch den Sport verursachten oxidativen Stress bei. Der TBARS-Spiegel in der Leber verschlechterten sich weder durch das Training noch durch die ketogene Fütterung, aber die Oxidation von Proteinseitenketten wurde durch die ketogene Fütterung abgeschwächt. Das kann darauf hinweisen, dass eine ketogene Diät die Leber vor durch den Sport verursachten Schäden schützt. Die Diät förderte auch die Erholung von Müdigkeit nach einem anstrengenden Training (Huang et al., 2018).

In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass eine 14-tägige ketogene Diät (KD) die antioxidative Kapazität im Blut gesunder Personen erhöht. Die KD steigerte die Konzentrationen der Harnsäure und des Gesamtantioxidationsstatus, was auf eine verstärkte antioxidative Kapazität hindeutet. Superoxiddismutase und Katalase zeigten keine signifikanten Veränderungen, sowie Malondialdehyd und damit fand keine vermehrte Lipidperoxidation statt. Somit ist die gesteigerte antioxidative Kapazität keine adaptive Reaktion auf einen erhöhten oxidativen Stress (Nazarewicz et al., 2007). Zwar lassen sich diese Ergebnisse nicht direkt auf Ausdauersportler übertragen, aber sie deuten darauf hin, dass eine ketogene Diät die antioxidativen Kapazitäten erhöhen kann.

Eine Hypothese ist, dass eine erhöhte Ketolyse, die durch eine LCHF-Diät ausgelöst werden kann, oxidativen Stress in den Mitochondrien verursacht, was wiederum eine zelluläre adaptive (hormetische) Reaktion hervorruft. Diese Adaption ist durch die Aktivierung der Zellschutzmechanismen Nrf2, Sirtuine 1 und 3 und AMPK gekennzeichnet und umfasst die Hochregulierung von Genen und Mediatoren, die an antioxidativen und entzündungshemmenden Aktivitäten beteiligt sind (Kolb et al., 2021).

Die erwähnten Studien an Ratten und gesunden Personen legen nahe, dass eine kohlenhydratarme, fettreiche Diät durch ihre antioxidativen Kapazitäten dazu beitragen kann, den durch Sport induzierten oxidativen Stress zu minimieren. Allerdings zeigen erhöhte TBARS- und Proteincarbonyl-Spiegel im Muskel nach intensivem Training

mögliche Belastungen auf. Hinzu kommt, dass eine fettreiche Diät wenig Antioxidantien enthält. Die Komplexität dieser Ergebnisse unterstreicht die Notwendigkeit weiterer Forschungsarbeiten, um klare Schlussfolgerungen zwischen dieser Ernährungsweise, sportlicher Leistung und oxidativen Stress zu ziehen.

Angesichts der vorliegenden Untersuchungen stellt sich die Frage nach einer möglichen Alternative zu einer LCHF-Diät. Es zeigt sich, dass eine ketogene Diät im Vergleich zu einer kohlenhydratreichen Diät zu keiner signifikanten Steigerung der Trainingskapazität oder Leistung führt, sondern mit einer erhöhten wahrgenommenen Anstrengung einhergeht (Burke, 2021). In Anbetracht der beobachteten Effekte wie reduziertem Muskelglykogen und initialen Symptomen wie Müdigkeit und Konzentrationsschwierigkeiten, ergibt sich die Überlegung nach Ernährungsweisen, die reicher an Antioxidantien sind und möglicherweise weniger anspruchsvoll als ketogene Diäten, aber dennoch ähnliche metabolische Effekte erzielen. Dazu gehören eine gesteigerte Fettoxidation und die Langzeiterhaltung der Glykogenspeicher.

#### 1.5.2. Glykämischer Index

Ein möglicher Ansatz, die Trainingsleistung bei Sportlern zu verbessern, ist die Berücksichtigung des glykämischen Index (GI). Der glykämische Index unterteilt Kohlenhydrate danach, inwieweit sie den Blutzuckerspiegel erhöhen. Das ermöglicht eine Einstufung von Lebensmitteln auf der Grundlage ihrer tatsächlichen postprandialen Blutzuckerreaktion im Vergleich zu einem Referenzlebensmittel, entweder Glukose oder Weißbrot (Siu & Wong, 2004, nach Jenkins et al., 1981). Der GI wird aus der inkrementellen Fläche unter der postprandialen Plasmaglukosekurve eines Testlebensmittels (50 g) berechnet und mit der Fläche nach dem Verzehr einer gleichen Menge aus einem Referenzlebensmittel verglichen. Der GI spiegelt die Gesamtgeschwindigkeit der Verdauung und Absorption eines CHO-Lebensmittels wider. Eine Diät mit einem niedrigen glykämischen Index führt zu einem langsameren Anstieg des Blutzuckerspiegels im Vergleich zu einer Diät mit einem hohem glykämischen Index (Siu & Wong, 2004).

Theoretisch kann eine LGI-Diät zu einer verbesserten Ausdauerleistung führen. Ein möglicher Mechanismus besteht darin, dass eine postprandiale Hyperglykämie und Hyperinsulinämie vermieden werden, wodurch die Fettoxidation, die

Plasmaglukosekonzentration und die CHO-Verfügbarkeit während des Trainings aufrechterhalten werden. Die Reduktion des Insulinspiegels, der als Hemmer der Lipolyse bekannt ist, könnte die Hemmung der Fettsäureoxidation vermindern. Dies wiederum trägt dazu bei, das Muskelglykogen während des Trainings aufrechterhalten bleibt (Wong et al., 2017).

Zwei Meta-Analysen untersuchten die Auswirkung des glykämischen Index einer vor dem Training eingenommenen Mahlzeit auf die Ausdauerleistung. Wong et al. kamen zu dem Entschluss, dass die Ausdauerleistung nach einer LGI-Mahlzeit besser ist, insbesondere wenn das Training-bis-Erschöpfungsprotokoll verwendet wird (Wong et al., 2017). Im Unterschied dazu wurde in der Meta-Analyse von Burdon et al. festgestellt, dass es keinen signifikanten Leistungsvorteil einer LGI-Mahlzeit gegenüber einer HGI-Mahlzeit gab (Burdon et al., 2017).

Einige Studien haben untersucht, ob der langfristige Verzehr (3 – 5 Tage) von HGI- oder LGI-Mahlzeiten den Substratstoffwechsel und die Trainingsleistung beeinflusst. Chen et al. beobachtete nach einer 3-tägigen Diät keinen Einfluss des GI auf die Fett- oder Kohlenhydratoxidation und die Trainingsleistung (Chen et al., 2008). Ebenso beobachteten Hamzah et al, dass nach einer 5-tägigen Diät, die Gesamtfettoxidation und somit der Beitrag von Fett zum Energieverbrauch beim Laufen nach beiden kohlenhydratreichen (LGI und HGI) Diäten niedriger war als im Kontrollversuch und es keinen Einfluss auf die Trainingskapazität gab. Daher sind weitere Studien erforderlich, um festzustellen, ob sich die Anpassungen des glykämischen Index einer kohlenhydratreichen Diät über einen längeren Zeitraum von denen unterscheiden, die in kürzeren Interventionsstudien beobachtet wurden (Hamzah et al., 2009).

Zdzieblik et al. führte eine vierwöchige Interventionsstudie bei 28 Ausdauerathleten durch, die aus drei unterschiedlichen Diäten (HFLC vs. Kohlenhydratreich LGI oder HGI) bestand. Die Ergebnisse zeigen einen Leistungsvorteil aller Gruppen bei submaximalen Bedingungen, wobei die HFLC- und LGI-Gruppe einen ausgeprägteren Effekt aufwiesen. Bei höheren Intensitäten nahm die Leistung in der HFLC-Gruppe ab, während sie in beiden GI-Gruppen zunahm. Die besseren Effekte von LGI im Vergleich zu HGI lassen sich möglicherweise durch eine gesteigerte metabolische Flexibilität erklären. Denn in der Gruppe mit LGI waren die Laktatkonzentrationen unter

Ruhebedingungen und unter submaximalen Bedingungen im Vergleich zum Ausgangswert niedriger, was auf eine gesteigerte Fettoxidation hinweisen könnte (Zdzieblik et al., 2022).

Abschließend lässt sich feststellen, dass eine LGI-Diät das Potenzial besitzt, die Ausdauerleistung sowohl bei submaximalen als auch bei hohen Intensitäten zu verbessern. Da aufgrund der metabolischen Flexibilität, die Fettoxidation bei submaximalen Intensitäten gesteigert werden kann, während bei höheren Intensitäten auf die vollen Glykogenspeicher zurückgegriffen werden kann. Jedoch sind längere Interventionsstudien notwendig, um die gewünschten metabolischen Anpassungen, eine gesteigerte Fettoxidation und eine verringerte Nutzung von Muskelglykogen, zu beweisen. Ebenso ist es ratsam, diesen Ernährungsansatz mit einer LCHF-Diät zu vergleichen, bei der bereits ähnliche Veränderungen beobachtet wurden.

#### *1.5.2.1. Auswirkungen einer LGI-Diät auf den durch Sport induzierten oxidativen Stress*

Die beste Empfehlung in Bezug auf den oxidativen Stress, der durch Sport induziert werden kann, scheint eine ausgewogene Ernährung reich an natürlichen Antioxidantien und sekundären Pflanzenstoffen zu sein. Dieser Ernährungsansatz setzt sich zusammen aus dem regelmäßigen Verzehr von verschiedenen Obst- und Gemüsesorten, Vollkornprodukten, Hülsenfrüchten, Sprossen und Samen und ist eine Möglichkeit, um den gesamten Bedarf an Antioxidantien bei körperlich aktiven Menschen und Sportlern zu decken (Yavari et al., 2015). Die oben beschriebene Ernährungsstrategie entspricht einer Diät mit einem niedrig glykämischen Index, die durch ballaststoffreiche und pflanzliche Lebensmittel charakterisiert ist (O'Keefe et al., 2008).

Eine Hypothese ist, dass eine akute Hyperglykämie oxidativen Stress hervorruft (Ceriello, 1997). Die Rolle der Hyperglykämie wird durch den Nachweis gestützt, dass es während eines oralen Glukosetoleranztests bei normalen Probanden und Diabetikern zu einem Anstieg von MDA im Plasma und einer Verringerung der zirkulierenden Antioxidantien kommt (Ceriello et al., 1998).

In einer von Welis durchgeführten randomisiert kontrollierten Studie wurde der Einfluss von verschiedenen GI auf den oxidativen Stress bei College-Athleten analysiert, indem die Probanden in eine Gruppe mit hohem GI und eine Gruppe mit niedrigem GI aufgeteilt wurden. Die Interventionsdiät enthielt jedoch nur 1000 Kalorien, bestehend aus 70%

Kohlenhydraten, 15% Protein und 15% Fett und wurde zwei Wochen lang dreimal täglich eingenommen. Um den oxidativen Stress zu messen, wurden Blutproben für den MDA-Serumspiegel sowohl am Anfang als auch am Ende der Intervention nach einer Phase des Fastens und einem 5-km-Lauf entnommen. Am 1. Interventionstag ist ein Anstieg der MDA-Serumspiegel in beiden Gruppen zu beobachten, wobei der Anstieg in der Gruppe mit hohem GI signifikant höher ist. Am letzten Tag konnten die gleichen Ergebnisse festgestellt werden, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied im durchschnittlichen MDA-Spiegel zwischen den Gruppen. Es konnte gezeigt werden, dass der GI den MDA-Serumspiegel als Parameter für oxidativen Stress beeinflusst (Welis, 2014).

Obwohl die Literatur über die Auswirkungen vollständiger Ernährungsstrategien auf den durch körperliche Betätigung verursachten oxidativen Stress noch rar ist, deuten die vorliegenden Indizien darauf hin, dass eine LGI-Diät potenziell dazu beitragen könnte, den oxidativen Stress bei Sportlern zu reduzieren. Es bedarf dennoch weiterer Untersuchungen, um die potenziellen Vorteile einer LGI-Diät in Bezug auf die Leistung und oxidativen Stress bei Sportlern zu verstehen.

## 1.6. Comet – Assay

Der Comet-Assay, auch als Einzelzell-Gelelektrophorese bekannt, stellt eine relativ einfache Methode zur Messung von DNA-Schäden auf Einzelzellebene dar. Diese Technik hat sich als anerkanntes Instrument im Bereich des Biomonitorings etabliert und ermöglicht die Untersuchung der Auswirkungen verschiedener Einflüsse wie Ernährung und Lebensstil auf das Ausmaß der DNA-Schädigung in menschlichen Zellen (Collins et al., 2014).

### 1.6.1. Entwicklung

Vor fast 50 Jahren veröffentlichten Cook et al. eine Arbeit zur Struktur des Zellkerns. Dabei haben sie festgestellt, dass durch die Lyse von Zellen in Lösungen mit nichtionischem Detergens und hohen Salzkonzentrationen, kernähnliche, aber proteinarme Strukturen freigesetzt werden (Cook et al., 1976). Die Behandlung mit der Lyselösung führt zur Entfernung von Membranen, Zytoplasma und Nukleoplasma und zur Zerstörung von Nukleosomen, wobei fast alle Histone durch den hohen Salzgehalt aufgelöst werden. Schlussendlich bleibt, gemeinsam mit der DNA, das Nukleoid, das aus einer Kernmatrix oder einem Kerngerüst aus RNA und Proteinen besteht, übrig. Bei der

DNA bleibt die negative Superspiralisierung erhalten, welche sie hatte, als sie um die Histone des Nukleosoms gewickelt war. Dies impliziert, dass eine freie Rotation der DNA nicht möglich ist (Piperakis, 2009). Cook et al. schlugen ein Modell vor, bei dem die DNA als superspiralisierte Schleifen an ein Kernskelett oder eine Matrix gebunden ist. Denn sie fanden heraus, dass diese Nukleotide von einem DNA-Heiligenschein umgeben werden, wenn sie entweder durch Zugabe eines Interkalationsmittels wie Ethidiumbromid oder durch Bestrahlung mit Röntgenstrahlen behandelt werden (Cook et al., 1976, McCready et al., 1980). Das heißt, wenn die Superspiralisierung durch einen Einzel- oder Doppelstrangbruch gelockert wird, kann sich die DNA-Schleife frei in einen Heiligenschein um den Nukleoidkern bewegen (Collins, 2015).

Rydberg und Johanson waren 1978 die Vorreiter, DNA-Schäden in einzelnen Zellen direkt zu quantifizieren, indem sie in Agarose eingebettete Zellen unter milden alkalischen Bedingungen lysierten, um eine teilweise Entfaltung der DNA zu ermöglichen. Nach der Neutralisation erfolgt die Färbung der Zellen mit Acridinorange und das Ausmaß der DNA-Schädigung wird bestimmt, indem das Verhältnis von grüner (doppelsträngiger DNA) zu roter (einsträngiger DNA) Fluoreszenz gemessen wird. Diese Technik beinhaltet jedoch zahlreiche kritische Schritte (Singh et al., 1988, nach Rydberg & Johanson, 1978).

Zur weiteren Entstehung des Comet Assays trugen Ostling und Johanson 1984 bei (Ostling & Johanson, 1984). Sie entwickelten eine Mikrogel-Elektrophorese-Technik, um die Empfindlichkeit beim Nachweis von DNA-Schäden in isolierten Zellen zu verbessern. Dabei wurden die Lyse und Elektrophorese unter neutralen Bedingungen durchgeführt, die Färbung erfolgte mit Ethidiumbromid und das Migrationsmuster wurde mit einem Mikroskopphotometer quantifiziert (Singh et al., 1988, nach Ostling & Johanson, 1984). Das erhaltene Bild sah aus wie ein „Komet“ mit einem Kopf (head), der aus intakter DNA bestand, und einem Schweif (tail). Der Schweif wurde von Ostling und Johanson als DNA mit entspannter Superspiralisierung beschrieben, die durch das elektrophoretische Feld zur Seite gezogen werden (Piperakis, 2009). Das heißt, wenn die negativ geladene DNA Brüche enthält, entspannen sich die DNA-Superspiralen und die gebrochenen Enden wandern während der Elektrophorese in Richtung Anode (Olive & Banath, 2006).

In Abbildung 1 ist links ein typisches Nukleoid nach der Lyse Behandlung dargestellt. Es besteht aus einem dichten DNA-Kern mit einem Heiligenschein aus DNA um ihn herum. Eine Kernmatrix im Kern sorgt für die Bindung der DNA, in Form einer Reihe von supergewundenen Schleifen. Die Superspiralisierung wird gelockert, wenn Brüche vorhanden sind und die DNA-Schleifen dehnen sich weiter aus, wodurch der Durchmesser des Heiligenscheins zunimmt (Shaposhnikov et al., 2015).

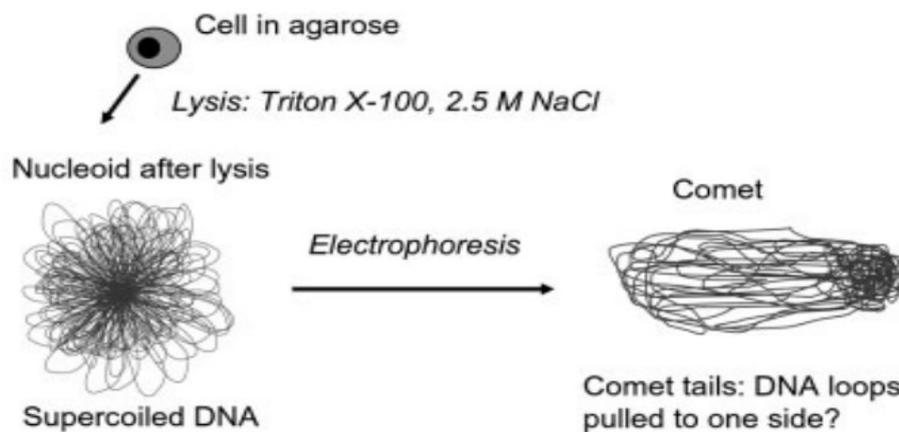


Abbildung 3: loops or fragments (Shaposhnikov et al., 2015).

Auf der rechten Seite ist ein Nukleoid nach dem Elektrophorese Schritt abgebildet. Die Matrix ist in der Agarose immobilisiert, während der Kometenschweif, der durch Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht wird, einem Heiligenschein entspricht, der durch das elektrophoretische Feld zur Seite gezogen wird (Shaposhnikov et al., 2015).

Zwar erlauben die neutralen Bedingungen der Mikrogel-Elektrophorese-Technik den Nachweis doppelsträngiger DNA-Brüche, nicht jedoch den Nachweis einzelsträngiger DNA-Brüche (Singh et al., 1988). Dieser Assay wurde später von zwei Gruppen modifiziert, einmal von Singh et al. im Jahr 1988 und einmal von Olive et al. im Jahr 1990. Singh et al. führte die Elektrophorese in einzelnen Zellen unter stark alkalischen Bedingungen ( $\text{pH} > 13$ ) durch und ermöglicht so eine Erkennung von Einzelstrangbrüchen und alkalilabilen Stellen (Singh et al., 1988). Olive et al., die den Begriff "Comet Assay" vorgestellt haben, führten eine Elektrophorese unter neutralen oder mild alkalischen Bedingungen durch, um Einzelstrangbrüche zu erkennen (Collins et al., 2014).

Der alkalische Comet Assay von Singh et al. hat seit den 1990er Jahren an Popularität zugenommen und hat damit auch die bisher gleichermaßen empfindlichen Methoden zum Nachweis von ein- und doppelsträngiger DNA-Brüche sowie alkalilabiler Regionen (ALS) ersetzt, nämlich alkalische Elution und alkalische Entwindung (Collins et al., 2023).

Der Comet Assay ermöglicht es, die beschädigte DNA zu "sehen". Ein großer Vorteil ist, dass DNA-Strangbrüche und einige Basenveränderungen mit Farbstoffen und nicht durch radioaktive Markierung der Zellen gemessen werden können. Da nur Nukleotide und keine proliferierenden Zellen benötigt werden, ist der Assay für jede Zelllinie oder jedes Gewebe geeignet, aus dem eine Einzelzellsuspension gewonnen werden kann, einschließlich differenzierter Zellen. Außerdem kann er in einem breiten Spektrum von in vivo, in vitro und ex vivo Anwendungen eingesetzt werden (Koppen et al., 2017). Die bereits genannten Gründe sowie weitere zahlreiche Vorteile, wie die Notwendigkeit einer geringen Anzahl von Zellen pro Probe (<10.000), die hohe Empfindlichkeit für den Nachweis von DNA-Schäden und die Möglichkeit, Unterschiede in der Reaktion auf DNA-schädigende Wirkstoffe zwischen Zellen derselben exponierten Population zu messen, bewirken, dass der Comet Assay so attraktiv ist (Kumaravel et al., 2009, Collins et al., 2023).

#### 1.6.2. Färbung, Visualisierung und Quantifizierung

Nach der Elektrophorese erfolgt die Neutralisierung (das heißt, die Entfernung der alkalischen Lösung aus den Gelen) und das Waschen der Objektträger. Der letzte Schritt ist die Färbung der DNA, die Visualisierung der Kometen und die Quantifizierung. Die Färbung erfolgt mit einem DNA-bindenden Farbstoff, davon sind viele bekannte oder potenzielle Mutagene. Die am häufigsten verwendeten Reagenzien sind beispielsweise SYBR Gold, SYBR Green, Ethidiumbromid (EB), DAPI und GelRed (Collins et al., 2023). EB ist zum Beispiel ein starkes Mutagen und Toxin und eine Dekontamination durch EB stellt ein Problem für die Laborsicherheit dar (Huang et al., 2010). Es können auch andere neu entwickelte Farbstoffe verwendet werden, die auf ihre Sicherheit überprüft worden sind. Dazu gehört GelRed, ein rot fluoreszierender Nukleinsäurefarbstoff, der das gleiche Spektrum wie EB aufweist. GelRed ist auch hochempfindlich und nachweislich nicht mutagen und nicht zytotoxisch (Collins et al., 2023, Huang et al., 2010).

Um das Ausmaß der DNA-Schädigung zu bewerten, sind zwei Arten der Kometenauswertung gebräuchlich: die visuelle Bewertung oder die Computerbildanalyse, die beide auf der Fluoreszenzmikroskopie basieren. In den Anfängen wurde ein einfaches Analysesystem auf der Grundlage einer visuellen Bewertung entwickelt. Die Einteilung der Kometen erfolgt je nach Form und Größe des Schweifs in die Klassen 0 (kein Schweif, d. h. kein erkennbarer Schaden) – 4 (fast die gesamte DNA im Schweif) und es wird eine Gesamtpunktzahl für 100 Kometen berechnet, die zwischen 0 und 400 willkürlichen Einheiten liegt (Collins, 2004, Koppen et al., 2017, Collins et al., 1995).

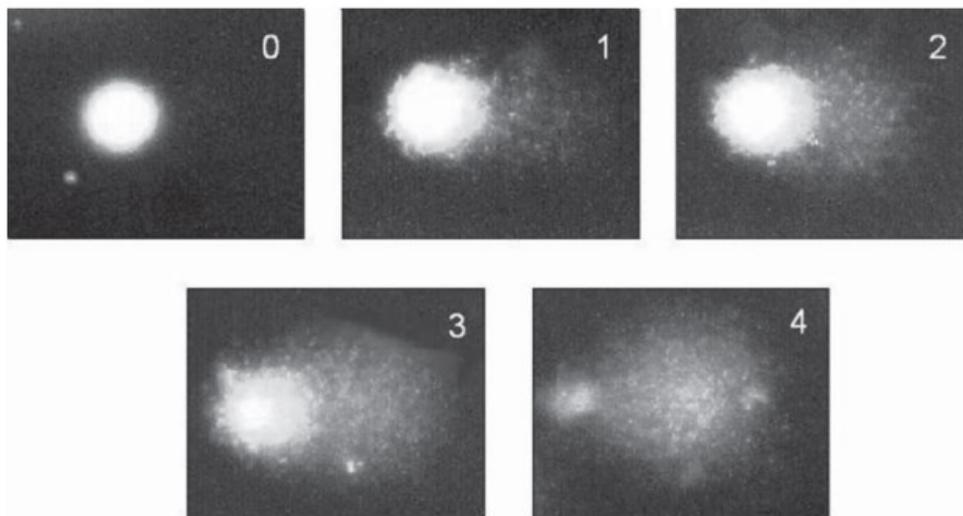


Abbildung 4: Visuelle Klassifizierung, vorgeschlagen von Collins et al. (1995).

Die visuelle Methode ist zuverlässig, schnell, kostengünstig und liefert Ergebnisse, die mit anspruchsvolleren und teureren Bildanalyse-Systemen vergleichbar sind. Zusätzlich sind die Ergebnisse reproduzierbar zwischen den Labors und zwischen den Bewertern (Koppen et al., 2017).

Die alternative Methode ist die Computerbildanalyse, die aus zwei Hauptphasen besteht: Kometenerkennung oder -segmentierung und Kometenbewertung. Je nachdem, ob der Erkennungs- oder Segmentierungsprozess automatisiert erfolgt, kann er in ein halb- oder vollautomatisches Instrument unterteilt werden. Verschiedene Programme werden dafür genutzt, darunter Comet Assay IV, HiComet, OpenComet, Comet Score and CASP (Hong et al., 2020). Mithilfe der Computerbildanalyse können verschiedene Deskriptoren

analysiert werden, darunter Gesamtintensität (DNA-Gehalt) (total intensity), Schweiflänge (tail length), prozentuale DNA im Schweif (% tail-DNA) und Schweifmoment (tail moment) (Olive & Banath, 2006). Hinsichtlich der Objektivität sollte die automatisierte Bildanalyse der halbautomatischen Bildanalyse und der visuellen Bewertung überlegen sein. Es gibt jedoch potenzielle Einschränkungen bei der Erfassung von Kometen vor einem verrauschten Hintergrund und der Unterscheidung zwischen zwei Zellen, also überlappenden Kometen, die aber visuell aufgelöst werden können (Azqueta et al., 2019, Hong et al., 2020).

Um die Ergebnisse von Comet-Assay-Analysen zu beschreiben, werden verschiedene Deskriptoren benutzt. Am häufigsten werden der Prozentsatz der DNA im Schweif, die Schweiflänge und der Schweifmoment (das Produkt aus %T und Schweiflänge) verwendet. Die Schweiflänge als Maß für DNA-Schäden wird von vielen Forschern in Frage gestellt, da bereits bei geringen Mengen an DNA-Strangbruchmitteln die maximale Wanderung der DNA erreicht wird. Es herrscht eine Debatte, ob die Daten einer Comet-Assay-Analyse als % tail-DNA oder als Schweifmoment angegeben werden sollen. Ein Einwand gegen den Schweifmoment ist, dass es schwierig sei, sich die Kometen anhand dieses Deskriptors vorzustellen (Moller et al., 2014). Derzeit wird die Nutzung des % tail-DNA als Maß für DNA-Schäden empfohlen (Koppen et al., 2017).

### 1.6.3. Aktuelles Prinzip

Die weit verbreitetste Version des Comet-Assay ist die alkalische Methode mit zusätzlichen Modifikationen (Behandlung der Zellen mit ROS oder Behandlung der Zellkerne mit läsionsspezifischen Enzymen) (Collins et al., 2023, Hoelzl et al., 2009).

Das umfasst die Einbettung der Zellen in Agarose auf einem Mikroskopobjektträger, unterschiedliche Behandlungen (Lyse-Behandlung, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung, läsionsspezifische Enzym-Behandlung), die alkalische Behandlung (Unwinding-Periode), Elektrophorese, Neutralisation und Waschen sowie Färbung der DNA, Visualisierung der Kometen und Quantifizierung (Collins, 2004 und Azqueta et al., 2019).

Die Lyse-Behandlung führt zur Entfernung von Membranen und löslichen Zellbestandteilen sowie Befreiung der DNA von Histonen durch hochmolekulares NaCl, was zu proteinarmen Kernen mit supergeknäulter DNA führt – bekannt als Nukleoid. Nach Befolgung der weiteren Schritte entstehen sowohl einzelne als auch doppelte

Strangbrüche sowie ALS, die endogene DNA-Schäden widerspiegeln. ALS sind jene DNA-Modifikation, die unter alkalischen Bedingungen zu einem SB wird, z.B. Apurin-/Apyrimidin-Stellen (AP) (Collins et al., 2023, Azqueta et al., 2019, Hoelzl et al., 2009).

Hinzu kommt dass viele Protokolle Referenzstandards verwenden, wie z.B. Zellen, die mit Oxidationsmitteln ( $H_2O_2$ ) behandelt wurden. Die Exposition gegenüber ROS ( $H_2O_2$ ) ist ein Hinweis auf Veränderungen der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber exogenen oxidativen DNA-Schäden und gibt somit Aufschluss über den antioxidativen Status (Azqueta et al., 2019, Hoelzl et al., 2009).

Jedoch liefert die Messung von DNA-Strangbrüchen nur begrenzte Informationen, da sie rasch repariert werden und verschiedene Ursachen haben können. SSBs können auf eine größere zelluläre Schädigung hinweisen, sind aber im Allgemeinen nicht mutagen und stellen keine große Bedrohung für die genomische Stabilität dar. Im Gegensatz dazu haben Veränderungen an den DNA-Nukleobasen, wie Oxidation oder Alkylierung, größere Auswirkungen auf die Genotoxizität und Karzinogenese, als Einzelstrangbrüche. Diese Nukleobasenläsionen werden langsamer repariert und können zu Mutationen führen. Um den Assay spezifischer und empfindlicher zu gestalten, wurde ein zusätzlicher Schritt eingeführt: läsionsspezifische Endonukleasen, die spezifische DNA-Schäden erkennen und zusätzliche Brüche erzeugen. Die am häufigsten verwendeten Enzyme sind das bakterielle DNA-Reparaturenzym Endonuklease III, zum Nachweis oxidierter Pyrimidine, und Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG), das oxidierte Purine (wie 8-oxoG) erkennt (Collins, 2004, Collins et al., 2023).

Parallel zur Verwendung des Enzyms wird ein zweiter Gelsatz zur Kontrolle mit einem Reaktionspuffer (ohne Enzym) inkubiert. Subtrahiert man die mit dem Reaktionspuffer inkubierten Proben, von dem mit dem Enzym inkubierten Proben, erhält man die Ergebnisse des Assays als „netto enzymempfindlichen Stellen“, d.h. die Differenz der Kometen DNA-Migration (Schwanzintensität, TI) [enzymempfindliche Stellen = % Schweif-DNA Enzym - % Schweif-DNA Puffer] (Collins et al., 2023).

Bei der alkalischen Behandlung, auch Unwinding-Periode (Entwischung der DNA) genannt, werden alkalilabile Stellen in Brüche umgewandelt. Ein wichtiger Schritt, denn in der Elektrophorese können nur DNA-Strukturen, die Brüche enthalten, in Richtung Anodenende wandern. Danach erfolgt eine Neutralisierung (d.h. Entfernung der

alkalischen Lösung aus den Gelen) und ein Waschen der Objektträger. Der letzte Schritt beinhaltet den Nachweis der Kometen durch Fluoreszenzmikroskopie nach Anfärbung mit einem DNA-bindenden Farbstoff (Collins et al., 2023, Azqueta et al., 2019).

Als Orientierung, wie stark der DNA-Schaden in nicht exponierten und unbelasteten Zellen sein sollte, dient die Faustregel: nicht mehr als 10 % der „tail DNA“ (Collins et al., 2023).

## 2. Methoden und Material

Dieser Abschnitt umfasst eine detaillierte Darstellung des Studiendesigns, der Probandenauswahl sowie der Interventionen, die im Rahmen der Studie durchgeführt wurden. Darüber hinaus werden die spezifischen Schritte des Comet-Assay eingehend behandelt, beginnend mit der Vorbereitung der Zellen bis hin Quantifizierung der Ergebnisse. Zum Schluss erfolgt eine Erläuterung der statistischen Auswertung der erhobenen Daten.

### 2.1. Studiendesign

Die vorliegende Arbeit ist Teil der Arbeitsgruppe Ernährung, Bewegung und Gesundheit der Universität Wien und wurde als kontrollierte, offene, randomisierte, nicht-verblindete Studie konzipiert. Ein Ziel dieser Studie war es herauszufinden, inwiefern sich verschiedene Diäten und das Training auf den oxidativen Stress und Marker für DNA-Schäden auswirken. Insgesamt nahmen 30 Probanden teil, die auf 3 Gruppen aufgeteilt wurden. Die Studiendauer betrug 10 Wochen und beinhaltete ein vorgeschriebenes Ausdauertraining mit einer Ernährungsintervention.

Der Trainingsplan und die durchgeführten Tests waren für alle Probanden gleich, unterschieden sich jedoch in ihrer Ernährungsweise. Die Ernährungsintervention setzte sich aus einer Low-GI, High-GI und LCHF-Diät zusammen. Zu Beginn (pre) und am Ende (post) der Studie wurde zweimal venös Blut abgenommen. Anhand dieser Blutproben wurden die Auswirkungen der Trainings- und Ernährungsintervention auf Marker für DNA-Schäden und oxidativen Stress mittels Comet-Assay untersucht.

### 2.2. Probanden

Die Studienpopulation beinhaltete 30 normalgewichtige, nicht-professionelle Athleten.

Einschlusskriterien für diese Studie waren: männliches Geschlecht; Alter zwischen 18 und 40 Jahren; keine akuten oder chronischen Erkrankungen; hobbymäßig sportlich aktiv (ca. 2x/Woche); keine Erfahrungen mit den Diäten der Intervention.

Ausschlusskriterien beinhalteten: Kontraindikationen gegen körperliche Belastung entsprechend der Richtlinien der ACSM; Alter <18 beziehungsweise > 40 Jahre; Einnahmen von Medikamenten, die die Messungen beeinflussen könnten oder laut

WADA-Code im Training und/oder Wettkampf verboten sind; Leistungssportler mit eigenem Trainingsplan.

Zu Beginn und nach der 10-wöchigen Intervention wurden Analysen zur Körperzusammensetzung durchgeführt, einschließlich eines gestuften Belastungstests zur Bestimmung der maximalen Sauerstoffaufnahme sowie ein 5-km-Zeitfahren. Auf Grundlage der ermittelten maximalen  $VO_2$ -Werte wurden die Probanden zufällig zu einer der drei Diätgruppen zugeteilt.

### 2.3. Interventionen

#### 2.3.1. Trainingsintervention

Die Trainingsintervention bestand aus fünf Laufeinheiten pro Woche für 10 Wochen, von denen drei im gleichmäßigen Tempo und zwei als Intervalleinheiten durchgeführt wurden. Die Trainingseinheiten konnten unabhängig voneinander über die Woche verteilt werden, unter der Bedingung, dass lange Läufe und Intervalleinheiten nicht an aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt werden und mindestens ein Ruhetag zwischen den beiden Intervalleinheiten liegt.

Für die Einbeziehung in die abschließende Analyse war eine Mindestanforderung von 75% der vorgeschriebenen Schulungsminuten erforderlich. Um dies kontrollieren zu können, wurden alle Trainingseinheiten mit einer Sportuhr (Polar Vantage M, Polar Electro Oy, Kempele, Finnland) und einem Herzfrequenzgurt (Polar H10, Polar Electro Oy, Kempele, Finnland) aufgezeichnet und überprüft.

#### 2.3.1. Ernährungsintervention

Die Ernährungsintervention umfasste drei Gruppen:

- LGI-Diät: 50-60 % Kohlenhydrate mit  $\geq 65$  % der Energie aus kohlenhydratreichen Lebensmitteln mit niedrigem glykämischen Index ( $GI < 50$ ) pro Tag
- HGI-Diät: 50-60 % Kohlenhydrate mit  $\geq 65$  % der Energie aus kohlenhydratreichen Lebensmitteln mit hohem glykämischen Index ( $GI > 70$ ) pro Tag
- LCHF-Diät:  $\geq 65$  % Fett, maximal 50 g Kohlenhydrate pro Tag

Während der Studie sollten die Teilnehmer wöchentlich einen Werktag und einen Wochenendtag protokollieren. Die Protokolle wurden von geschulten Ernährungsfachleuten mithilfe der Software nut.s (dato Denkwerkzeuge, Wien, Österreich) überprüft. Zur Bewertung der Studien-Compliance und für weitere Berechnungen wurde der Durchschnitt von 20 24-Stunden Erinnerungsprotokolle pro Teilnehmer herangezogen.

Der glykämische Index der verzehrten Lebensmittel wurde nach den Methoden von Atkinson, Foster-Powell und Atkinson, Brand-Miller berechnet (Atkinson et al., 2008; Atkinson et al., 2021). Dabei wurde die Kohlenhydratmenge pro Mahlzeit in Gramm bestimmt. Der GI für jedes Lebensmittel in der Mahlzeit wurde proportional berechnet und summiert, um einen GI für jede Mahlzeit des Tages zu erhalten. Diese wurden addiert und durch die Anzahl der Mahlzeiten geteilt. Schließlich wurde der durchschnittliche GI aller Protokolle für jeden Teilnehmer ermittelt.

## 2.4. Comet-Assay

### 2.4.1. Technische Geräte und Equipment

*Tabelle 1: Firmen und Produktnamen der technischen Geräte und der Materialien*

<b>Material / Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Objektträger	VWR
Objektgläser	VWR
Mikrowelle	ELTA
Inkubator	Memmert
Wasserbad	GFL – Gesellschaft für Labortechnik
Magnetrührer	Heidolph
Elektrophorese Power Supply	PEQLAB-Biotechnologie GmbH
Elektrophorese	PEQLAB-Biotechnologie GmbH
Fluoreszenzmikroskop	PEQLAB-Biotechnologie GmbH

Comet-IV Programm	Comet-IV
Fluoreszenzmikroskop	Prior
Fluoreszenzlampe	Nikon
pH-Meter	Metrohm Inula
Waage	Sartorius
Vortex	Heidolph

#### 2.4.2. Chemikalien

*Tabelle 2: Chemikalien*

<b>Chemikalien</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Hersteller</b>
Normal Melting Agarose	NMP	Invitrogen
Low Melting Agarose	LMP	Invitrogen
Dulbecco's Phosphate buffered saline	PBS	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	NaCl	Sigma-Aldrich
Trizma Base	Tris	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	NaOH	Sigma-Aldrich
Triton X-100		Sigma-Aldrich
Kaliumhydroxid	KOH	Sigma-Aldrich
2-Ethansulfonsäure	HEPES	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid	KCl	Sigma-Aldrich
Rinderserumalbumin	BSA	Sigma-Aldrich

Wasserstoffperoxid	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma- Aldrich
Formamidopyrimidin-DNA- Glykosylase	FPG	New England Biolabs
Ethanol Absolut 99,9%		AustrAlca
GelRed		Botum
Ethylendiamintetraaceticacid	EDTA	Sigma- Aldrich

#### 2.4.2. Vorbereitung der Zellen

In dieser Untersuchung wurden zwei venöse Blutabnahmen aus der Armbeuge durchgeführt. Jeweils 50µl Vollblut der Probanden wurden aliquotiert und bei -20°C für den Comet-Assay eingefroren.

Die Vollblutproben wurden vor Gebrauch aus dem Tiefkühlschrank entnommen, in der Hand aufgetaut und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

#### 2.4.3. Durchführung

##### 2.4.3.1. Beschichtung der Slides

1000 mg Normal Melting Agarose (NMA) wurden mit 100 ml destilliertem Wasser (Aqua dest.) vermischt und langsam in der Mikrowelle erhitzt. Bis die Agarose nach mehreren Durchgängen (ca. vier) ganz klar und flüssig war. Das Wasserbad wurde auf 55°C erwärmt und die Agarose wurde während des gesamten Vorgangs hineingestellt. Die Slides wurden nacheinander in Agarose getaucht und nach langsamem Herausziehen wurde die Hinterseite mit einem Papiertuch sorgfältig gesäubert und über Nacht oder Wochenende zum Trocknen ausgelegt. Nach der Trocknung wurde die beschichtete Seite markiert, in eine Slidebox gegeben und im Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert.

##### 2.4.3.2. Herstellung der Lösungen

###### 2.4.3.2.1. 1M KOH und 10M NaOH

Für 1M KOH wurden 56.11g 1Mol KOH in 1L Aqua dest. aufgelöst und für 10M NaOH wurden 400g 10Mol NaOH in 1L Aqua dest. aufgelöst. Beide Lösungen sind jeweils 1 Jahr haltbar.

#### 2.4.3.2.2. Low Melting Agarose (LMA) 0,8 %

800mg LMA wurden in 100ml PBS in der Mikrowelle gelöst, um eine 0,8%ige Agaroselösung zu erhalten. Danach wurde die Agarose à 10ml in kleine Fläschchen aliquotiert und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

#### 2.4.3.2.3. Puffer F – 10x Stock (Enzymreaktionspuffer für FPG)

Zur Herstellung der Puffer F Lösung wurden 190.6g 40mM HEPES, 149.12g 0.1M KCl, 2.92g 0.5mM EDTA und 4g 0.2mg/ml BSA in 2L Aqua dest. aufgelöst. Nachdem ein pH von 8 mittels 1M KOH erreicht wurde, wurde Puffer F in Falcon Tubes aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Bei Verwendung wurde Puffer F in einem Wasserbad (37°C) aufgetaut und danach in einem 50ml Messzylinder abgemessen. Anschließend wurde der Puffer in einem 500ml Messzylinder mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt und der gewünschte pH von 8 wurde mittels 1M KOH eingestellt. Die Verdünnung wurde ebenfalls auf Eis gelagert.

#### 2.4.3.2.4. Lyselösung

Täglich wurde 1 Liter Lyselösung hergestellt. Die Reagenzien (146.1g 2.5M NaCl, 29.2g 0.1M EDTA und 1.211g 10mM Tris) wurden in 1 Liter Aqua dest. mittels Magnetrührer aufgelöst und danach wurden tröpfchenweise 10 M NaOH hinzugefügt, um einen pH von 10 einzustellen. Kurz vor der Verwendung wurde Triton X-100 mittels Pasteurpipette hinzugefügt (1ml/100ml).

#### 2.4.3.2.5. Elektrophoreselösung

Ebenso wurde die Elektrophoreselösung jeden Tag frisch hergestellt. Dafür wurden 24g 0.3M NaOH und 0.58g 0.001M EDTA in 2L Aqua dest. aufgelöst und danach im Kühlschrank gelagert.

#### 2.4.3.2.6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Stocklösung

Wöchentlich wurde eine 0.1M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stocklösung hergestellt, die anschließend im Kühlschrank gelagert wurde. Dafür wurden 10ml Aqua dest. in ein Falcon Tube gegeben, 103µl wieder entnommen und 103µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hineinpipettiert.

Vor der Verwendung musste die Stocklösung (100µM Stock 1:769 Verdünnung) verdünnt werden. Hierzu wurden 100ml Aqua dest. in ein Schraubglas gegeben, 130µl wieder

entnommen und 130µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stocklösung dazu pipettieren. Das Ganze wurde danach auf Eis gelagert.

#### 2.4.3.2.7. FPG

Am Tag der Verwendung wurde FPG-Stock aus dem Gefrierfach entnommen und es wurde eine 1:250 Verdünnung hergestellt. Dafür wurden 5µl FPG mit 1250µl Puffer F vermischt und auf Eis gelagert.

#### 2.4.3.3. Aufbringen der Zellen auf die Slides

Die Vorbereitungen für die Aufbringung der Zellen auf die Slides umfassen mehrere Schritte. Pro Proband wurden 8 Slides (4x Original und 4x Backup) verwendet, die zuvor beschriftet wurden. Die Beschriftung enthielt die Behandlungsart (Lyse, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Puffer und FPG), das Datum, die Probanden-ID, Kürzel der Labormitarbeiter: innen und zusätzlich ein B für die Backup-Slides. Ebenso wurden jeweils 2 Eppis pro Zeitpunkt (pre, post, TT1, TT2), vier Eppis für die Kontrolle und fünf Küvetten (2x Lyse, 1x H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2x FPG + Puffer) für die spätere Behandlung vorbereitet. Die Proben zusammen mit der Lyse- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wurden währenddessen auf Eis gelagert.

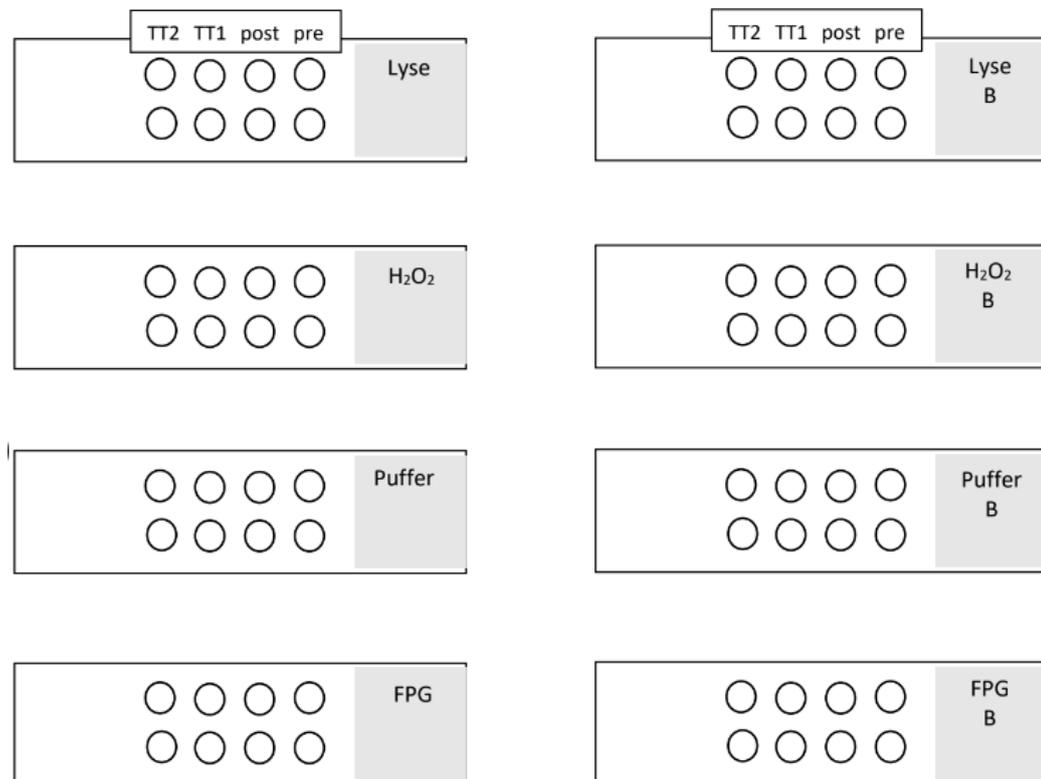


Abbildung 5: Pipettierschema für einen Probanden (Anna Moitzi, 2023)

Die LMA-Agarose wurde in der Mikrowelle aufgelöst und in das vorgewärmte Wasserbad (37°C) gestellt. Parallel wurde das Vollblut in der Hand aufgetaut und dann wurden jeweils 10µl Vollblut je Probe in die Eppis aliquotiert.

Abschließend wurden 200µl Agarose mit einer Pipette in ein Eppi mit Vollblut gegeben und nach einem kurzen Mischen wurde die Lösung auf die Slides, die sich in silbernen Kammern befanden, mit einer elektronischen Pipette aufgetragen. Dabei wurde darauf geachtet, dass jeder Tropfen präzise und gleichmäßig platziert wurde. Nachdem die Gelpunkte ausgehärtet waren, wurden die Slides in die entsprechenden Küvetten gegeben und mit den entsprechenden Lösungen aufgefüllt. Alle Küvetten bis auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Küvette, die mit der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung gefüllt wurde, wurden mit der Lyse-Lösung befüllt. Alle Küvetten wurden im Kühlschrank (4°C) für eine Stunde inkubiert. Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Slides wurden zu Beginn für 21 Minuten inkubiert, gefolgt von einer 2-minütigen PBS-Wäsche, bevor sie in die Lyse-Küvetten überführt wurden.

#### *2.4.3.4. Enzymbehandlung mit FPG*

Nach einer Stunde wurden die FPG- und Puffer-Slides aus der Lyse-Küvette genommen und sie wurden dreimal für jeweils fünf Minuten mit Puffer F gewaschen. Im Anschluss wurde die Unterseite der Slides gut abgewischt und in die Silberkammern gelegt. Mit einem speziellen Silikon Aufsatz mit Löchern werden die Slides in der Silberkammer durch Metallklammern eingespannt und in einer Box mit Eis gelagert. Bei diesem Schritt muss vorsichtig gearbeitet werden, da es ansonsten zu Verlusten der Gele kommen kann (z.B. durch zu festes Einspannen).

Parallel wurden je 30µl Puffer bzw. FPG in die Löcher des Silikon Aufsatzes auf die Gelpunkte pipettiert. Nach dem Pipettieren wurden die Silberkammern noch zusätzlich mit einem Silikondeckel leicht abgedeckt und wurden für 30 Minuten bei 37°C in den Inkubator gestellt. Die Lyse- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Slides blieben währenddessen in der Lyse.

#### *2.4.3.5. Alkali-Behandlung und Elektrophorese*

Nach Ablauf der 30 Minuten im Inkubator, wurde jede Behandlungsmethode in eine Reihe gelegt und mit Platzhalter-Slides aufgefüllt. Die gekühlte Elektrophoreselösung wurde rechts in die Elektrophorese geleert, bis alle Slides gut bedeckt waren. Darauf folgte für 20 Minuten die Unwinding-Periode im Dunkeln, bei der die Elektrophorese

abgedeckt war. Im Anschluss an die Unwinding-Periode, erfolgte die Elektrophorese für 30 Minuten bei 25V, 330mA und maximalen Strom sowie maximaler Leistung.

#### *2.4.3.5. Neutralisation*

Nach der Elektrophorese wurden die Slides auf der Unterseite abgewischt und für 5min in kalten PBS inkubiert und danach für 5min in Aqua dest. Anschließend wurden die Slides einmal für 15min in 70%igem Ethanol dehydriert und zum Schluss in 100%igem Ethanol.

Die Slides wurden wieder auf der Unterseite abgewischt und über Nacht getrocknet. Am nächsten Tag wurden sie in Boxen eingeordnet und im Kühlschrank gelagert. Wichtig ist es die Gele gekühlt zu lagern, denn dann halten sie lange.

#### *2.4.3.5. Färbung, Visualisierung und Quantifizierung*

Zum Färben wurde 3µl Gelred mit 10ml destilliertem Wasser in einem dunklen Falcon Tube vermischt. Alle Gelpunkte wurden so mit Gelred bedeckt, dass das Gelred miteinander verbunden war. Danach wurden die Gelpunkte mit einem Deckglas zugedeckt und bei überschüssigem Farbstoff wurden die Slides auf der Unterseite und der Seite trockengewischt. Da der Farbstoff lichtempfindlich ist, wurde im Dunkeln gearbeitet.

Pro Proband und Zeitpunkt wurden je 50 Zellen pro Gel ausgezählt, d.h. insgesamt 100 Zellen. Beim Auszählen wurde darauf geachtet, dass überlappende Kometen vermieden werden, sowie Kometen in der Nähe des Gelrandes oder in der Nähe von Blasen, da diese dazu neigen, anomal zu sein. Es wurde angestrebt, 3-5 Kometen pro Bild auszuwählen. Die Selektion der Gelpunkte wurde systematisch initiiert, beginnend mit dem Gelpunkt links oben, gefolgt vom darunterliegenden Gelpunkt und anschließend mit dem Gelpunkt neben dem zuerst ausgewählten Gelpunkt. Dieser Prozess wurde schrittweise fortgeführt bis zum letzten Gelpunkt. Für die Quantifizierung wurde die Software „Comet IV-Video Imaging System“ verwendet, während die Visualisierung mittels einer Kamera ermöglicht wurde, die das Programm mit dem Fluoreszenzmikroskop verknüpfte.

Die Software ermittelt die DNA-Schäden durch die Berechnung des prozentualen Anteils der DNA im Kopf- bzw. Schweifbereich. Zur Auswertung wurde der Durchschnitt der DNA-Anteile für jeweils 50 Zellen ermittelt und anschließend der Gesamtdurchschnitt

aus diesen beiden Werten berechnet. Die Ergebnisse des Comet Assays wurden als Prozentsatz der DNA im Schweif (% tail-DNA) ausgedrückt.

## 2.5. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS Statistics 29 für Windows und Microsoft Office Excel 2023. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (Std.) dargestellt und ein Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  wurde als statistisch signifikant gewertet. Vor der Analyse erfolgte eine Überprüfung auf Ausreißer mittels Boxplot, auf Normalverteilung durch den Shapiro-Wilk-Test ( $p > 0.05$ ) und auf Homogenität der Varianzen mit Hilfe des Levene's Tests. Da die Voraussetzungen erfüllt waren, wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen (two-way mixed ANOVA) durchgeführt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Studienkollektiv

Zu Beginn nahmen 30 Probanden an der Studie teil. Während der nachfolgenden Trainings- und Ernährungsintervention gab es 2 Teilnehmer in der LCHF-Gruppe, die aus der Studie ausschieden, weil sie die Interventionen nicht befolgten. Infolgedessen wurden am Ende nur die Daten von 28 Probanden (Tabelle 3) für die abschließende statistische Analyse berücksichtigt. Es wurden ausschließlich jene Probanden mit einbezogen, die beide Zeitpunkte (pre und post) erfolgreich absolviert hatten.

*Tabelle 3: Anzahl der ausgewerteten Probanden*

Gruppe	Häufigkeit
LGI	10
HGI	10
LCHF	8
Total	28

#### 3.1.1. Alter

Die Stichprobe umfasste Teilnehmer im Altersbereich von 23 bis 39 Jahren. Das durchschnittliche Alter betrug  $29.29 \pm 4.29$  Jahre.

*Tabelle 4: Deskriptive Analyse des Alters*

	Minimum	Maximum	Mittelwert $\pm$ Std.
LGI	23	35	$29,7 \pm 3,68$
HGI	24	39	$30 \pm 5,5$
LCHF	23	34	$27,88 \pm 3,4$
Insgesamt	23	39	$29,29 \pm 4,29$

Die grafische Darstellung verdeutlicht, dass die HGI-Gruppe die höchsten Alterswerte aufwies, während in der LCHF-Gruppe viele Teilnehmer tendenziell jünger waren.

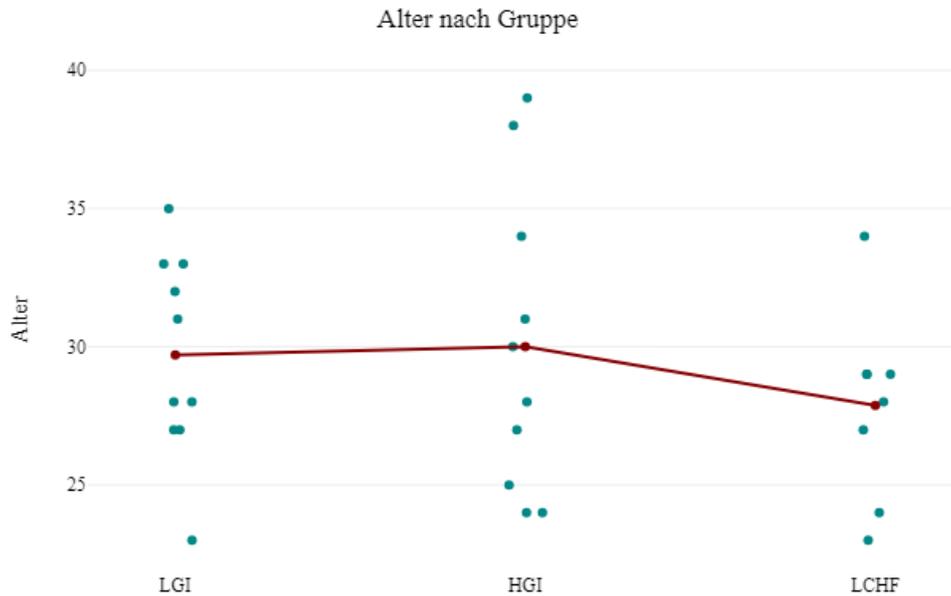


Abbildung 6: Altersverteilung pro Gruppe

### 3.1.1. Body Mass Index

Die vorliegende Tabelle präsentiert Daten zu den Body-Mass-Index (BMI)-Werten der Probanden. Der BMI variiert je nach Gruppe, wobei die HGI-Gruppe mit  $22.95 \pm 2.55$  den niedrigsten durchschnittlichen BMI aufweist. Die LCHF-Gruppe zeigt einen breiteren BMI-Bereich von 20.6 bis 35.0, mit einem Mittelwert von  $25.61 \pm 4.56$ .

Tabelle 5: Deskriptive Analyse des BMIs

	Minimum	Maximum	Mittelwert $\pm$ Std.
LGI	19,8	28,4	24,04 $\pm$ 2,7
HGI	19,3	26,9	22,95 $\pm$ 2,55
LCHF	20,6	35,0	25,61 $\pm$ 4,56
Insgesamt	19,3	35,0	24,1 $\pm$ 3,34

Es ist wichtig anzumerken, dass in der LCHF-Gruppe ein Ausreißer vorhanden war. Dennoch deutet der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung der Daten in dieser Gruppe hin ( $p > 0.153$ ).

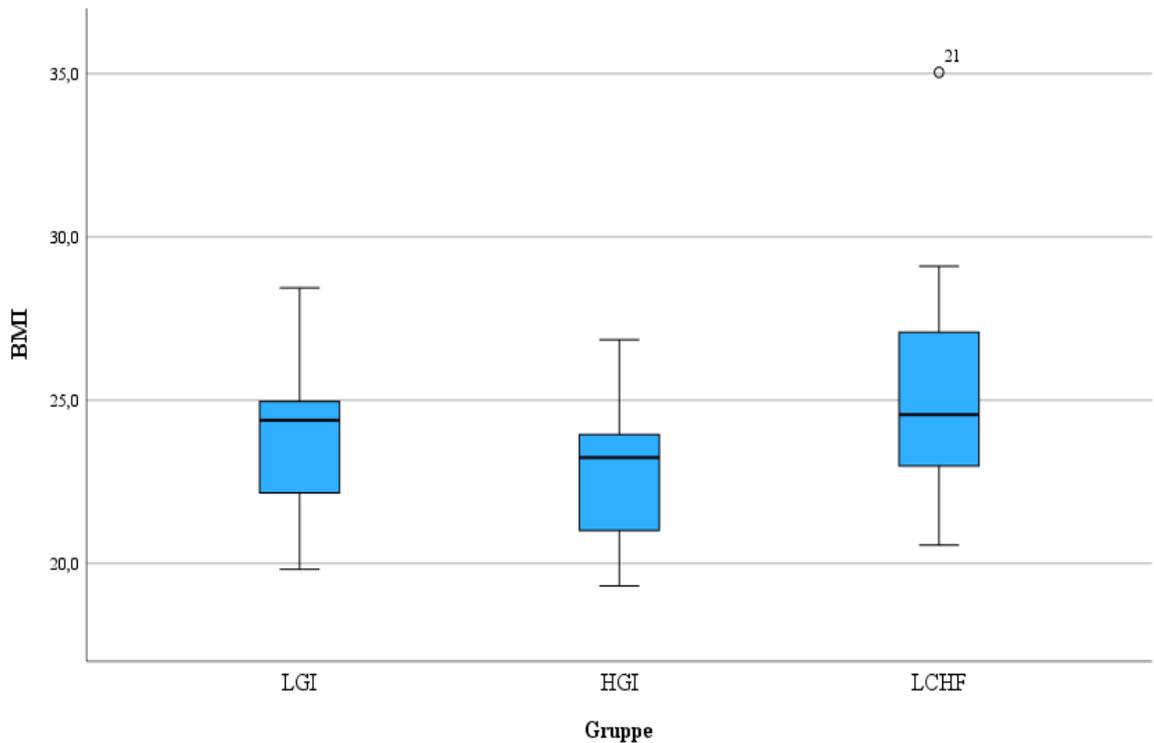


Abbildung 7: Boxplot

## 3.2. Ergebnisse Comet-Assay

### 3.2.1. Lysis Behandlung

Die Mittelwerte der Lyse Behandlung vor Beginn der Intervention variieren nur geringfügig zwischen den Ernährungsgruppen. Nach 10 Wochen ist der höchste Anstieg in der HGI-Gruppe ( $37.21 \pm 15.63$ ) zu beobachten, dicht gefolgt von der LCHF-Gruppe ( $35.84 \pm 13.52$ ). Die LGI-Gruppe zeigt einen leichten Rückgang ( $27.23 \pm 13.92$ ) und den geringsten Unterschied zwischen den zwei Zeitpunkten.

Tabelle 6: Deskriptive Analyse der Lyse Behandlung auf % tail-DNA

Gruppe	Zeitpunkt	n	Mittelwert	Standardabweichung
LGI	Lyse_pre	10	29,19	7,95
	Lyse_post	10	27,23	13,92
LCHF	Lyse_pre	8	29,27	8,09
	Lyse_post	8	35,84	13,52
HGI	Lyse_pre	10	29,08	12,65
	Lyse_post	10	37,21	15,63

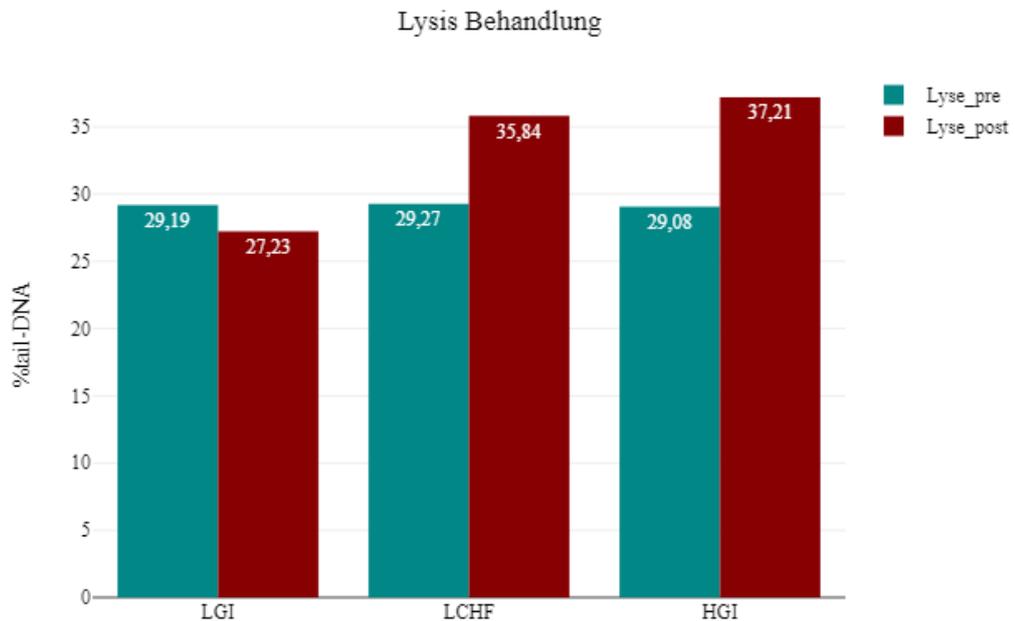


Abbildung 8: Effekte der Ernährungsintervention auf % tail-DNA vor und nach der Intervention

Die durchgeführte multivariate Analyse hat ergeben, dass es keine statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen der Intervention und der Zeit auf die % tail-DNA gab ( $F(2, 25) = 1.07, p = 0.36, \eta^2 = 0.08$ ). Der Haupteffekt der Zeit ( $F(1, 25) = 1.85, p = 0.19, \eta^2 = 0.07$ ) sowie der Gruppe ( $F(2, 25) = 0.82, p = 0.45, \eta^2 = 0.06$ ), zeigten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 7: Two-way mixed ANOVA: Einfluss von Zeitpunkt und Gruppe auf % tail-DNA

	df	F	p	$\eta^2$
Zeitpunkt (Lyse_pre, Lyse_post)	1	1,85	0,19	0,07
Gruppe	2	0,82	0,45	0,06
Zeitpunkt x Gruppe	2	1,07	0,36	0,08
Residuen (zwischen Probanden)	25			
Residuen (innerhalb von Probanden)	25			

### 3.2.2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung

Beobachtet wird eine Abnahme der prozentualen tail-DNA in der LGI-Gruppe nach der Durchführung der Ernährungsintervention. Im Kontrast dazu zeigen die Gruppen LCHF und HGI eine Zunahme der % tail-DNA.

Tabelle 8: Deskriptive Analyse der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung auf % tail-DNA

Gruppe	Zeitpunkt	n	Mittelwert	Standardabweichung
LGI	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> _pre	10	38,15	13,38
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> _post	10	34,26	17,78
LCHF	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> _pre	8	40,85	8,89
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> _post	8	43,29	13,1
HGI	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> _pre	10	35,28	11,15
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> _post	10	40,43	13,14

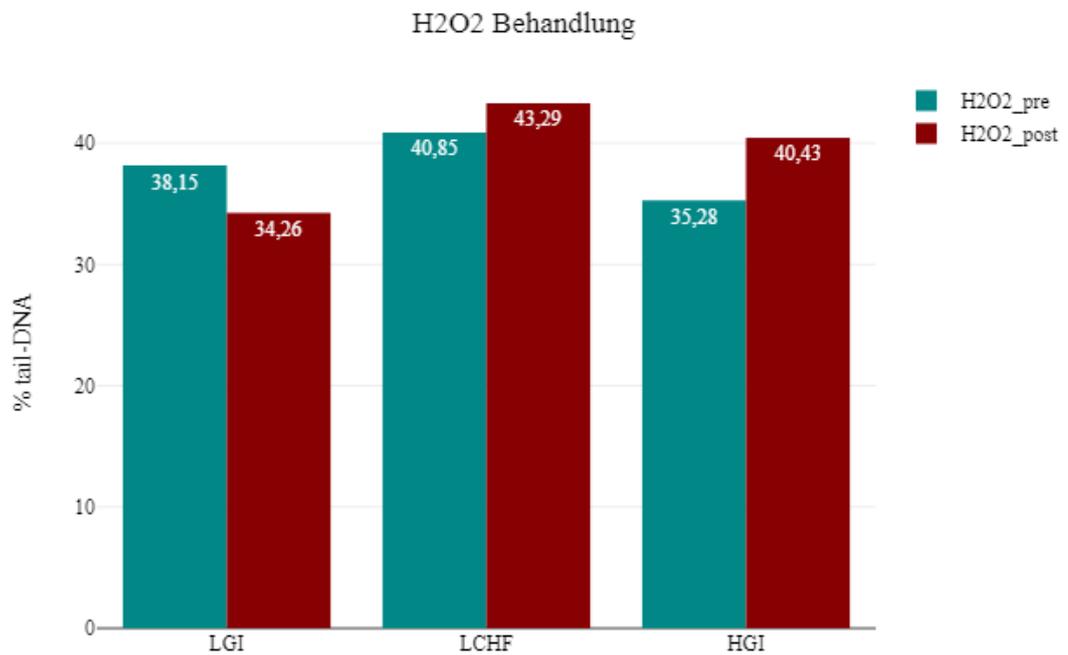


Abbildung 9: Effekte der Ernährungsintervention auf % tail-DNA vor und nach der Intervention

Ebenso zeigte auch hier eine Varianzanalyse mit Messwiederholungen, dass keine statistisch signifikante Wechselwirkung vorhanden war ( $F(2, 25) = 0.88, p = 0.43, \eta^2 = 0.07$ ). Die Haupteffekte Zeitpunkt ( $F(1, 25) = 0.17, p = 0.68, \eta^2 = 0.01$ ) und Gruppe ( $F(2, 25) = 0.68, p = 0.52, \eta^2 = 0.05$ ) waren ebenfalls nicht signifikant.

Tabelle 9: Two-way mixed ANOVA: Einfluss von Zeitpunkt und Gruppe auf % tail-DNA

	df	F	p	$\eta^2$
Zeitpunkt (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> _pre, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> _post)	1	0,17	0,68	0,01
Gruppe	2	0,68	0,52	0,05
Zeitpunkt x Gruppe	2	0,88	0,43	0,07
Residuen (zwischen Probanden)	25			
Residuen (innerhalb von Probanden)	25			

### 3.2.3. FPG-Behandlung

Vor Beginn der Intervention wiesen die durchschnittlichen Prozentsätze der tail-DNA in den Gruppen mit kohlenhydratarmer Ernährung (LGI und HGI) höhere Werte auf als in der LCHF-Gruppe. Nach der Intervention wurde eine Abnahme der % tail-DNA in allen drei Ernährungsgruppen beobachtet.

Tabelle 10: Deskriptive Analyse der FPG-Behandlung auf % tail-DNA

Gruppe	Zeitpunkt	n	Mittelwert	Standardabweichung
LGI	nettoFPG_pre	10	15,72	8,17
	nettoFPG_post	10	10,55	6,42
LCHF	nettoFPG_pre	8	11,83	5,8
	nettoFPG_post	8	7,49	5,93
HGI	nettoFPG_pre	10	15,33	9,55
	nettoFPG_post	10	10,45	6,41

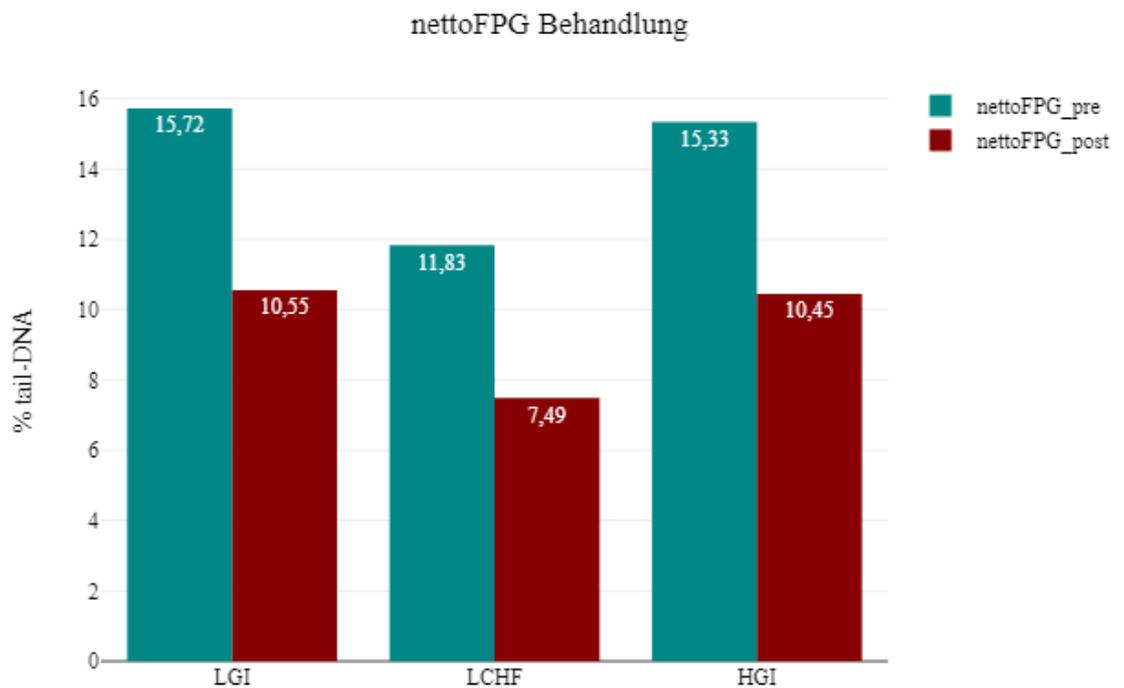


Abbildung 10: Effekte der Ernährungsintervention auf % tail-DNA vor und nach der Intervention

Eine multivariate Analyse zeigte keine statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen der Intervention und der Zeit auf die % tail-DNA ( $F(1, 25) = 0,02$ ,  $p = 0,98$ ,  $\eta^2 = 0,002$ ). Der Haupteffekt der Gruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $F(2, 25) = 0,91$ ,  $p = 0,42$ ,  $\eta^2 = 0,07$ ). Im Gegensatz dazu wies der Haupteffekt der Zeit einen signifikanten

Unterschied der % tail-DNA zu den verschiedenen Zeitpunkten auf ( $F(1, 25) = 9.18$ ,  $p = 0.006$ ,  $\eta^2 = 0.27$ ).

*Tabelle 11: Two-way mixed ANOVA: Einfluss von Zeitpunkt und Gruppe auf % tail-DNA*

	df	F	p	$\eta^2$
Zeitpunkt (nettoFPG_pre, nettoFPG_post)	1	9,18	0,006	0,27
Gruppe	2	0,91	0,42	0,07
Zeitpunkt x Gruppe	2	0,02	0,98	0,002
Residuen (zwischen Probanden)	25			
Residuen (innerhalb von Probanden)	25			

## 4. Diskussion

Ziel dieser Masterarbeit war es, die Auswirkungen verschiedener Ernährungsformen (LGI, HGI oder LCHF) auf den oxidativen DNA-Status bei Ausdauersportlern zu überprüfen. Das Hauptergebnis dieser Forschung ist, dass keine der drei Ernährungsinterventionen im Laufe der Zeit eine schützende Wirkung gegenüber oxidativen DNA-Schaden bei Ausdauersportlern gezeigt hat.

Trotz der fehlenden statistischen Signifikanz sind bestimmte Trends in den Gruppen erkennbar. Vor Beginn der Studie bestand ein gleiches Maß an DNA-Schäden (Lyse) in allen drei Ernährungsinterventionsgruppen. Nach der Lysis-Behandlung zeigte sich ein Anstieg der % tail-DNA in der HGI- und LCHF-Gruppe, aber ein Rückgang in der LGI-Gruppe. Ähnliches wurde nach der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung beobachtet: eine Abnahme der % tail-DNA in der LGI-Gruppe, während die LCHF- sowie HGI-Gruppe eine Zunahme aufwies. Diese Beobachtungen können darauf hinweisen, dass die kohlenhydratreiche Ernährung mit einem niedrigen glykämischen Index möglicherweise protektive Effekte gegenüber oxidativen DNA-Schaden aufweist, im Vergleich zu den anderen Gruppen.

Hervorzuheben ist der signifikante zeitliche Effekt nach der FPG-Behandlung. Das weist darauf hin, dass sich die % tail-DNA im Laufe der Zeit, unabhängig von der Ernährungsform, statistisch signifikant verringert hat. Es ist wichtig anzumerken, dass dieser Effekt nicht durch Unterschiede zwischen den Ernährungsinterventionen erklärt werden kann, da der Haupteffekt der Gruppe nicht signifikant war.

Die vorliegenden Tendenzen deuten darauf hin, dass eine kohlenhydratreiche Diät mit niedrigem glykämischen Index das Potenzial besitzt, die Resistenz gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Schäden und oxidative DNA-Schäden zu verbessern, obwohl eine statistische Signifikanz durch weitere Forschung bestätigt werden muss.

Der Comet-Assay wird in der humanen Biomonitoring-Forschung weitreichend eingesetzt, um die Auswirkungen von Lebensmitteln, spezifischen Nährstoffen sowie Nahrungsergänzungsmitteln auf Biomarker der DNA-Stabilität zu beurteilen. Obwohl die schützende Wirkung von Ernährungsweisen gegenüber oxidativer DNA-Schäden von Interesse ist, existieren derzeit keine Studien, die die Effekte einer umfassenden Ernährungsweise, wie z.B. LGI, HGI oder LCHF, auf oxidative DNA-Schäden speziell

bei Ausdauersportlern untersucht haben. Aber angesichts der vielversprechenden Anzeichen, dass eine LGI-Diät das Potenzial besitzt, oxidativen Stress zu reduzieren, wird im Folgenden näher untersucht, welche Faktoren für diese mögliche Schutzwirkung sprechen.

Eine Hypothese ist, dass eine akute Hyperglykämie oxidativen Stress induzieren kann. Dies geschieht durch zwei Mechanismen: die nicht-enzymatische Glykosylierung und das Ungleichgewicht von NADH/NAD<sup>+</sup>, das durch die Anwesenheit von Glukose in den Zellen induziert wird (Ceriello, 1997). Untersuchungen von Ceriello et al. haben gezeigt, dass eine Hyperglykämie oxidativen Stress auslösen und die antioxidative Abwehr schwächen kann (Ceriello et al., 1998). Eine Studie mit 292 gesunden Erwachsenen untersuchte den Zusammenhang zwischen der Ernährung mit hohem glykämischen Index und oxidativem Stress, gemessen anhand von MDA und F2-Isoprostane. Die Ergebnisse zeigen eine positive Assoziation zwischen hohem GI und erhöhten Konzentrationen von MDA und F2-Isoprostane. Die MDA- (0.55 auf 0.73 µmol/L,  $p < 0.02$ ) sowie F2-Isoprostane-Konzentrationen (0.034 auf 0.040 ng/mL,  $p < 0.03$ ) stiegen mit zunehmenden GI vom niedrigsten zum höchsten Quartil (Hu et al., 2006). Eine weitere Studie untersuchte den akuten Einfluss von LGI- Diäten im Vergleich zu HGI-Diäten auf oxidativen Stress und kardiovaskulären Risikofaktoren. Zwölf übergewichtige Probanden konsumierten beide Diäten mit gleicher Nährstoffzusammensetzung. Nach einer Woche war die Gesamtoxidationskapazität des Plasmas im nüchternen Zustand in der LGI-Gruppe signifikant höher als bei der HGI-Gruppe (Botero et al., 2009). Beide Forschungsarbeiten legen nahe, dass der langfristige Konsum von Lebensmitteln mit einem hohen glykämischen Index oxidativen Stress verursachen und eine Ernährung mit niedrigem glykämischen Index vorteilhaft für die Reduzierung von oxidativem Stress zu sein scheint.

Ein weiterer Punkt, der die Annahme stützt, dass eine LGI-Diät vor oxidativen Stress stützt, ist, dass eine LGI-Diät eine günstige Lebensmittelauswahl fördert, die reich an Antioxidantien, Mineralstoffen und Vitaminen ist. Diese Lebensmittelauswahl unterscheidet sich deutlich von der LCHF-Diät, in der täglich größere Mengen an ungünstigen Fetten (gesättigte Fettsäuren) verzehrt werden und geringere Mengen an Antioxidantien (Buyken, 2012, Bilborough & Crowe, 2003).

Mehrere Studien haben bereits gezeigt, dass eine Diät mit antioxidativen Eigenschaften, d.h. die reich an Polyphenolen, Tocopherolen, Ascorbinsäure und Carotinoiden ist, zur Reduzierung von oxidativen DNA-Schäden führen kann. In einer humanen Interventionsstudie wurde untersucht, ob der Konsum von Gemüse mit hohem Carotinoidgehalt einen Schutz vor oxidativen Stress bieten kann. Die Ergebnisse zeigten sowohl eine signifikante Verringerung von DNA-Strangbrüchen nach der Ergänzung der Ernährung mit Tomaten-, Karotten- oder Spinatprodukten als auch eine Reduzierung von oxidativen DNA-Schäden nach dem Verzehr von Karottensaft. Mit Hilfe des Comet Assays wurde nachgewiesen, dass Antioxidantien, insbesondere Carotinoide, in der Lage sind, oxidativen DNA-Schaden zu reduzieren (Pool-Zabel et al., 1997).

Prado et al. untersuchte an gesunden Personen den Einfluss einer Ernährung, die reich an Vollkorn, Obst und Gemüse und arm an verarbeiteten Lebensmitteln (Gruppe 1) ist und einer Ernährung, die reich an verarbeiteten Lebensmitteln und arm an Obst und Gemüse (Gruppe 2) ist. Durch den Comet Assay konnten belegt werden, dass eine Ernährung, die der Gruppe 1 ähnelt, vor oxidativen DNA-Schäden und durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-verursachte DNA-Schäden schützen kann (Prado et al., 2010). Es ist jedoch anzumerken, dass in dieser Studie keine spezifischen Angaben dazu gemacht wurden, ob es sich um Lebensmittel mit einem niedrigen glykämischen Index handelt. Dennoch weist sie Ähnlichkeiten mit einer LGI-Diät auf.

Diese Untersuchungen unterstreichen die Ergebnisse dieser Masterarbeit, dass eine LGI-Diät durch seine antioxidativen Kapazitäten oxidative DNA-Schäden reduzieren kann. Dennoch war in der LGI-Gruppe nach der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung nur eine sinkende Tendenz der % tail-DNA zu beobachten, die nicht signifikant war.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse nahe, dass eine LGI-Diät das Potenzial besitzt, oxidativen DNA-Schaden zu reduzieren. Dies könnte auf die förderliche Lebensmittelauswahl reich an Antioxidantien sowie auf die Vermeidung akuter Hyperglykämie zurückzuführen sein, was langfristig zu einem verbesserten Schutz führen könnte. Weitere Forschung ist jedoch erforderlich, um diese Tendenzen bei Ausdauersportlern statistisch zu bestätigen.

## 5. Limitationen

Die vorliegende Studie zur Untersuchung der Auswirkungen einer 10-wöchigen Ernährungs- und Trainingsintervention auf oxidative DNA-Schäden liefern wertvolle Erkenntnisse. Dennoch ist es unerlässlich die Limitationen zu betrachten, die möglicherweise zu keiner statistischen Signifikanz in den Ergebnissen geführt haben könnten.

Seit vielen Jahren ist es gängige Praxis, Vollblut oder isolierte periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) in einem Gefriermedium zu suspendieren und langsam auf  $-80^{\circ}\text{C}$  einzufrieren. Denn durch die Bildung von Eiskristallen, ist eine zufällige Schädigung der DNA möglich, die z.B. durch DMSO reduziert werden kann. Neuste Untersuchungen zeigten jedoch, dass Vollblut ohne DMSO in kleineren Mengen schockgefroren werden kann, was den Comet-Assay Prozess, im Vergleich zur Isolierung der PBMCs, vereinfacht (Collins et al., 2023).

Salmani et al. haben herausgefunden, dass kleine Volumina an Vollblut ( $\sim 250\mu\text{l}$ ) ohne Zusatz von Kryokonservierungsmitteln entweder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für bis zu 1 Woche oder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  für bis zu 1 Monat ohne signifikante Zunahme des zufälligen Schadens gelagert werden können (Salmani et al., 2011). Die Proben in dieser humanen Interventionsstudie wurden länger als eine Woche bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Blutabnahme fand Ende April 2023 statt und die Durchführung des Comet-Assays begann Ende Juni/Anfang Juli 2023.

Um die Ursache der Nicht-Signifikanz zu ermitteln und sicherzustellen, dass sie nicht auf den Comet-Assay selbst, sondern auf die Lagerbedingungen zurückzuführen war, wurde ein Reproduktionstag durchgeführt. Hierfür wurden Vollblutproben aus einer zuvor durchgeführten Interventionsstudie verwendet. Die replizierten Ergebnisse zeigten Werte in normalen Schwellenbereich für DNA-Schäden, wie sie in diesem Labor erwartet werden.

Da die in dieser Studie beobachteten DNA-Schäden deutlich über dem erwarteten Schwellwert lagen, legt dies nahe, dass die Ursache nicht in der angewandten Methode selbst, sondern möglicherweise in den Lagerbedingungen zu suchen ist. Zusätzlich zu den Lagerbedingungen ist zu berücksichtigen, dass nach dem Auftauen des Vollblutes und vor dem aliquotieren in die Eppendorf-Röhrchen einige Proben teilweise vertrocknet waren.

In solchen Fällen wurden Backup-Proben verwendet. Diese Beobachtung könnte auf eine Verzögerung beim Einfrieren der Proben hindeuten.

Möglicherweise stellt die Zählung der Kometen eine weitere potenzielle Ursache für die Nicht-Signifikanz dar. Die Auszählung der Puffer- und FPG- sowie der Lyse- und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Slides wurde jeweils von zwei Personen durchgeführt. Die Beteiligung von vier Bedienern könnte zu einer erhöhten Variation beitragen, was die hohe Standardabweichung der Ergebnisse erklären könnte (Collins et al., 2023).

Beim Auszählen wurde darauf geachtet, dass alle Bediener systematisch vorgehen. Der Startpunkt befand sich oben links im Gel und die Zählung erfolgte nach rechts. Anschließend wurde unter den bereits gezählten Kometen wieder nach links ausgezählt und das wurde fortgesetzt bis 50 Kometen pro Gelpunkt erreicht waren. Dieses Vorgehen verhinderte, dass ein einzelner Komet mehrfach ausgewertet wurde. Zudem wurde vermieden, Kometen in der Nähe der Ränder und Blasen auszuwählen, und überlappende Kometen wurden ausgeschlossen.

Trotz dieser systematischen Vorgehensweise konnte die Software nicht immer den gesamten Kometen erkennen. Infolgedessen wurden die äußeren gelben Ränder vom Bediener verschoben, wohingegen die blauen, grünen oder violetten Striche in der Mitte vom Bediener nicht verändert wurden. Diese Anpassungen oder auch Nicht-Anpassungen könnten dazu geführt haben, dass das Comet IV-Video Imaging System die Kometen nicht korrekt erfasst hat.

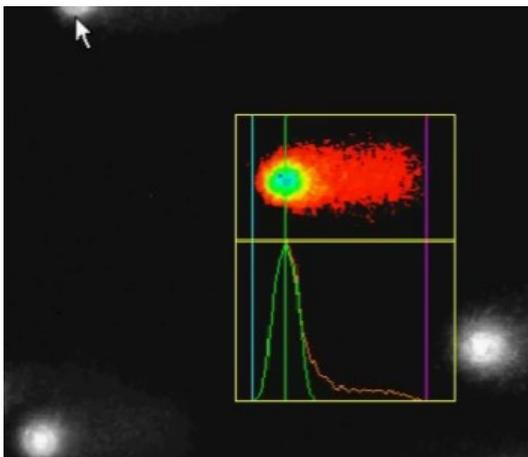


Abbildung 11: Screenshot eines Kometen im Comet-Assay IV Bildanalyse-System (Comet Assay IV, 2023)

Zusätzlich gestaltete sich die Kometenanalyse als anspruchsvoll. Die Bediener berichteten über eine geringe Anzahl von auszählbaren Kometen, teilweise überlappende Zellen und einen rauschigen Hintergrund.

All diese Limitationen, einschließlich der Lagerbedingungen und der Herausforderung bei der Kometenzählung, könnten dazu geführt haben, dass keine statistische Signifikanz in den Ergebnissen dieser humanen Interventionsstudie beobachtet wurde, sondern lediglich Tendenzen erkennbar waren.

## 6. Zusammenfassung

An dreißig männlichen, nicht-professionellen Athleten im Alter von 23 - 39 Jahren wurde eine Interventionsstudie durchgeführt. Die Studie umfasste eine einheitliche Trainingsintervention sowie eine Ernährungsintervention, bei der die Probanden zufällig in drei Gruppen aufgeteilt wurden: eine Gruppe mit fettreicher, kohlenhydratarmer Diät (LCHF), eine Gruppe mit kohlenhydratreicher Diät und hohem glykämischen Index (HGI) sowie eine Gruppe mit kohlenhydratreicher Diät und niedrigem glykämischen Index (LGI).

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, inwiefern sich die verschiedenen Diäten nach einer 10-wöchigen Intervention auf den oxidativen Stress und Marker für DNA-Schäden bei Ausdauersportlern auswirken. Vor und nach der Intervention wurden Blutproben entnommen und DNA-Schäden wurden im Vollblut mit dem Comet-Assay nachgewiesen. Außerdem wurden oxidierte DNA-Basen durch einen zusätzlichen Inkubationsschritt mit FPG ermittelt und die Widerstandsfähigkeit der Zellen gegenüber externem oxidativem Stress wurde durch die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemessen.

Keine der drei Ernährungsinterventionen zeigte eine signifikante Schutzwirkung gegenüber oxidativen DNA-Schäden. Dennoch konnte eine sinkende Tendenz in der LGI-Gruppe nach allen drei Behandlungen beobachtet werden. Reduzierte Werte der % tail-DNA in der LGI-Gruppe nach einer Lyse-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und FPG-Behandlung deuten darauf hin, dass eine Diät, die reich an Antioxidantien ist und eine akute Hyperglykämie vermeidet, das Potenzial besitzt, oxidativen DNA-Schaden zu reduzieren.

In dieser Studie gab es zahlreiche Limitationen, die möglicherweise zu keiner statistischen Signifikanz in den Ergebnissen geführt haben. Dazu gehört die Lagerung der Blutproben bei -20°C statt bei -80°C und die Herausforderung bei der Kometenzählung (geringe Anzahl, überlappende Kometen und ein rauschiger Hintergrund).

Die Ergebnisse stützen die Hypothese dieser Studie, dass eine LGI-Diät den durch Sport induzierten oxidativen Stress möglicherweise reduziert, und sind vereinbar mit der aktuell vorliegenden Studienlage. Jedoch sind weitere Untersuchungen nötig, unter Beachtung der Limitationen dieser Studie, um diese Hypothese zu bestätigen.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aguilar Diaz De Leon, J., & Borges, C. R. (2020). Evaluation of Oxidative Stress in Biological Samples Using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances Assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (159), 10.3791/61122. <https://doi.org/10.3791/61122>
- Alessio, H. M. (1993). Exercise-induced oxidative stress. *Medicine and science in sports and exercise*, 25(2), 218–224.
- Alghannam, A. F., Ghaith, M. M., & Alhussain, M. H. (2021). Regulation of Energy Substrate Metabolism in Endurance Exercise. *International journal of environmental research and public health*, 18(9), 4963. <https://doi.org/10.3390/ijerph18094963>
- Al-Salmani, K., Abbas, H. H., Schulpen, S., Karbaschi, M., Abdalla, I., Bowman, K. J., So, K. K., Evans, M. D., Jones, G. D., Godschalk, R. W., & Cooke, M. S. (2011). Simplified method for the collection, storage, and comet assay analysis of DNA damage in whole blood. *Free radical biology & medicine*, 51(3), 719–725. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.020>
- Andre, C. M., Larondelle, Y., Evers, D. (2010). Dietary Antioxidants and Oxidative Stress from a Human and Plant Perspective: A Review. *Current Nutrition & Food Science*. 6, 2-12. doi: 10.2174/157340110790909563.
- Atkinson, F. S., Brand-Miller, J. C., Foster-Powell, K., Buyken, A. E., & Goletzke, J. (2021). International tables of glycemic index and glycemic load values 2021: a systematic review. *The American journal of clinical nutrition*, 114(5), 1625–1632. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab233>
- Atkinson, F. S., Foster-Powell, K., & Brand-Miller, J. C. (2008). International tables of glycemic index and glycemic load values: 2008. *Diabetes care*, 31(12), 2281–2283. <https://doi.org/10.2337/dc08-1239>
- Azqueta, A., Muruzabal, D., Boutet-Robinet, E., Milic, M., Dusinska, M., Brunborg, G., Møller, P., & Collins, A. R. (2019). Technical recommendations to perform the alkaline standard and enzyme-modified comet assay in human biomonitoring studies. *Mutation research. Genetic toxicology and environmental mutagenesis*, 843, 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2019.04.007>

- Bilsborough, S. A., & Crowe, T. C. (2003). Low-carbohydrate diets: what are the potential short- and long-term health implications?. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 12(4), 396–404.
- Botero, D., Ebbeling, C. B., Blumberg, J. B., Ribaya-Mercado, J. D., Creager, M. A., Swain, J. F., Feldman, H. A., & Ludwig, D. S. (2009). Acute effects of dietary glycemic index on antioxidant capacity in a nutrient-controlled feeding study. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 17(9), 1664–1670. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.203>
- Burdon, C. A., Spronk, I., Cheng, H. L., & O'Connor, H. T. (2017). Effect of Glycemic Index of a Pre-exercise Meal on Endurance Exercise Performance: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 47(6), 1087–1101. <https://doi.org/10.1007/s40279-016-0632-8>
- Burke L. M. (2015). Re-Examining High-Fat Diets for Sports Performance: Did We Call the 'Nail in the Coffin' Too Soon?. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*, 45 Suppl 1(Suppl 1), S33–S49. <https://doi.org/10.1007/s40279-015-0393-9>
- Burke L. M. (2021). Ketogenic low-CHO, high-fat diet: the future of elite endurance sport?. *The Journal of physiology*, 599(3), 819–843. <https://doi.org/10.1113/JP278928>
- Burke, L. M., & Kiens, B. (2006). "Fat adaptation" for athletic performance: the nail in the coffin?. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 100(1), 7–8. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01238.2005>
- Buyken, A. (2012). Kohlenhydratreich, -reduziert oder -modifiziert? *AID - Ernährung im Fokus*, 402-407.
- Ceriello A. (1997). Acute hyperglycaemia and oxidative stress generation. *Diabetic medicine : a journal of the British Diabetic Association*, 14 Suppl 3, S45–S49. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9136\(199708\)14:3+3.3.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9136(199708)14:3+3.3.co;2-i)
- Ceriello, A., Bortolotti, N., Crescentini, A., Motz, E., Lizzio, S., Russo, A., Ezzol, Z., Tonutti, L., & Taboga, C. (1998). Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *European journal of clinical investigation*, 28(4), 329–333. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2362.1998.00295.x>

- Chen, Y., Wong, S. H., Xu, X., Hao, X., Wong, C. K., & Lam, C. W. (2008). Effect of CHO loading patterns on running performance. *International journal of sports medicine*, 29(7), 598–606. <https://doi.org/10.1055/s-2007-989265>
- Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*, 26(3), 249–261.
- Collins, A. R. (2015). The comet assay: a heavenly method!. *Mutagenesis*, 30(1), 1–4.
- Collins, A., Koppen, G., Valdiglesias, V., Dusinska, M., Kruszewski, M., Møller, P., Rojas, E., Dhawan, A., Benzie, I., Coskun, E., Moretti, M., Speit, G., Bonassi, S., & ComNet project (2014). The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 759, 27–39.
- Collins, A., Møller, P., Gajski, G., Vodenková, S., Abdulwahed, A., Anderson, D., Bankoglu, E. E., Bonassi, S., Boutet-Robinet, E., Brunborg, G., Chao, C., Cooke, M. S., Costa, C., Costa, S., Dhawan, A., de Lapuente, J., Bo', C. D., Dubus, J., Dusinska, M., Duthie, S. J., ... Azqueta, A. (2023). Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of protocols. *Nature protocols*, 18(3), 929–989. <https://doi.org/10.1038/s41596-022-00754-y>
- Comet Assay IV. (2023). Screenshot eines Kometen im Comet-Assay IV Bildanalyse-System [JPEG]. *Instem Information Solution For Life*. <https://www.instem.com/solutions/genetic-toxicology/comet-assay.php>
- Cook, P. R., Brazell, I. A., & Jost, E. (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of cell science*, 22(2), 303–324. <https://doi.org/10.1242/jcs.22.2.303>
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2007). *Free radicals in biology and medicine* (4. ed., reprint.). Oxford [u.a.]: Oxford University Press.
- Hamzah, S., Higgins, S., Abraham, T., Taylor, P., Vizbaraitė, D., & Malkova, D. (2009). The effect of glycaemic index of high carbohydrate diets consumed over 5 days on exercise energy metabolism and running capacity in males. *Journal of sports sciences*, 27(14), 1545–1554. <https://doi.org/10.1080/02640410903134115>
- Hartmann, A., Niess, A. M., Grünert-Fuchs, M., Poch, B., & Speit, G. (1995). Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutation research*, 346(4), 195–202. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(95\)90035-7](https://doi.org/10.1016/0165-7992(95)90035-7)

- Heung-Sang Wong, S., Sun, F. H., Chen, Y. J., Li, C., Zhang, Y. J., & Ya-Jun Huang, W. (2017). Effect of pre-exercise carbohydrate diets with high vs low glycemic index on exercise performance: a meta-analysis. *Nutrition reviews*, 75(5), 327–338. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux003>
- Hoelzl, C., Knasmüller, S., Misík, M., Collins, A., Dusinská, M., & Nersesyan, A. (2009). Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: recent results and trends. *Mutation research*, 681(1), 68–79. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.07.004>
- Hong, Y., Han, H. J., Lee, H., Lee, D., Ko, J., Hong, Z. Y., Lee, J. Y., Seok, J. H., Lim, H. S., Son, W. C., & Sohn, I. (2020). Deep learning method for comet segmentation and comet assay image analysis. *Scientific reports*, 10(1), 18915.
- Howard, E. E., & Margolis, L. M. (2020). Intramuscular Mechanisms Mediating Adaptation to Low-Carbohydrate, High-Fat Diets during Exercise Training. *Nutrients*, 12(9), 2496. <https://doi.org/10.3390/nu12092496>
- Hu, Y., Block, G., Norkus, E. P., Morrow, J. D., Dietrich, M., & Hudes, M. (2006). Relations of glycemic index and glycemic load with plasma oxidative stress markers. *The American journal of clinical nutrition*, 84(1), 70–267. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.1.70>
- Huang, Q., Baum, L., & Fu, W. L. (2010). Simple and practical staining of DNA with GelRed in agarose gel electrophoresis. *Clinical laboratory*, 56(3-4), 149–152.
- Huang, Q., Ma, S., Tominaga, T., Suzuki, K., & Liu, C. (2018). An 8-Week, Low Carbohydrate, High Fat, Ketogenic Diet Enhanced Exhaustive Exercise Capacity in Mice Part 2: Effect on Fatigue Recovery, Post-Exercise Biomarkers and Anti-Oxidation Capacity. *Nutrients*, 10(10), 1339. <https://doi.org/10.3390/nu10101339>
- Kaminsky, V. O., & Zhivotovsky, B. (2014). Free radicals in cross talk between autophagy and apoptosis. *Antioxidants & redox signaling*, 21(1), 86–102.
- Kolb, H., Kempf, K., Röhling, M., Lenzen-Schulte, M., Schloot, N. C., & Martin, S. (2021). Ketone bodies: from enemy to friend and guardian angel. *BMC medicine*, 19(1), 313. <https://doi.org/10.1186/s12916-021-02185-0>
- Koppen, G., Azqueta, A., Pourrut, B., Brunborg, G., Collins, A. R., & Langie, S. A. S. (2017). The next three decades of the comet assay: a report of the 11th

- International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, 32(3), 397–408.  
<https://doi.org/10.1093/mutage/gex002>
- Kumaravel, T. S., Vilhar, B., Faux, S. P., & Jha, A. N. (2009). Comet Assay measurements: a perspective. *Cell biology and toxicology*, 25(1), 53–64.
- Lushchak V. I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-biological interactions*, 224, 164–175.
- Møller, P., Loft, S., Ersson, C., Koppen, G., Dusinska, M., & Collins, A. (2014). On the search for an intelligible comet assay descriptor. *Frontiers in genetics*, 5, 217.  
<https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00217>
- Møller, P., Wallin, H., & Knudsen, L. E. (1996). Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *Chemico-biological interactions*, 102(1), 17–36.
- Nazarewicz, R. R., Ziolkowski, W., Vaccaro, P. S., & Ghafourifar, P. (2007). Effect of short-term ketogenic diet on redox status of human blood. *Rejuvenation research*, 10(4), 435–440. <https://doi.org/10.1089/rej.2007.0540>
- O'Keefe, J. H., Gheewala, N. M., & O'Keefe, J. O. (2008). Dietary strategies for improving post-prandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health. *Journal of the American College of Cardiology*, 51(3), 249–255.  
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.10.016>
- Olive, P. L., & Banáth, J. P. (2006). The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols*, 1(1), 23–29.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2006.5>
- Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 123(1), 291–298.
- Packer, L., Cadenas, E., & Davies, K. J. (2008). Free radicals and exercise: an introduction. *Free radical biology & medicine*, 44(2), 123–125.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 30(1), 11–26.
- Pingitore, A., Lima, G. P., Mastorci, F., Quinones, A., Iervasi, G., & Vassalle, C. (2015). Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in

- sports. *Nutrition* (Burbank, Los Angeles County, Calif.), 31(7-8), 916–922. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.02.005>
- Piperakis S. M. (2009). Comet assay: a brief history. *Cell biology and toxicology*, 25(1), 1–3.
- Pool-Zobel, B. L., Bub, A., Müller, H., Wollowski, I., & Rechkemmer, G. (1997). Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis*, 18(9), 1847–1850. <https://doi.org/10.1093/carcin/18.9.1847>
- Powers, S. K., & Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*, 88(4), 1243–1276. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>
- Powers, S. K., Deminice, R., Ozdemir, M., Yoshihara, T., Bomkamp, M. P., & Hyatt, H. (2020). Exercise-induced oxidative stress: Friend or foe?. *Journal of sport and health science*, 9(5), 415–425.
- Prado, R. P., dos Santos, B. F., Pinto, C. L., de Assis, K. R., Salvadori, D. M., & Ladeira, M. S. (2010). Influence of diet on oxidative DNA damage, uracil misincorporation and DNA repair capability. *Mutagenesis*, 25(5), 483–487. <https://doi.org/10.1093/mutage/geq030>
- Salminen, A., & Vihko, V. (1983). Endurance training reduces the susceptibility of mouse skeletal muscle to lipid peroxidation in vitro. *Acta physiologica Scandinavica*, 117(1), 109–113.
- Sastre, J., Asensi, M., Gascó, E., Pallardó, F. V., Ferrero, J. A., Furukawa, T., & Viña, J. (1992). Exhaustive physical exercise causes oxidation of glutathione status in blood: prevention by antioxidant administration. *The American journal of physiology*, 263(5 Pt 2), R992–R995.
- Shaposhnikov, S. A., Salenko, V. B., Brunborg, G., Nygren, J., & Collins, A. R. (2008). Single-cell gel electrophoresis (the comet assay): loops or fragments?. *Electrophoresis*, 29(14), 3005–3012.
- Sies, H., Berndt, C., & Jones, D. P. (2017). Oxidative Stress. *Annual review of biochemistry*, 86, 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>

- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175(1), 184–191.
- Siu, P. M., & Wong, S. H. (2004). Use of the glycemic index: effects on feeding patterns and exercise performance. *Journal of physiological anthropology and applied human science*, 23(1), 1–6. <https://doi.org/10.2114/jpa.23.1>
- Stellingwerff, T., Spriet, L. L., Watt, M. J., Kimber, N. E., Hargreaves, M., Hawley, J. A., & Burke, L. M. (2006). Decreased PDH activation and glycogenolysis during exercise following fat adaptation with carbohydrate restoration. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 290(2), E380–E388. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00268.2005>
- Stepanyan, V., Crowe, M., Haleagrahara, N., & Bowden, B. (2014). Effects of vitamin E supplementation on exercise-induced oxidative stress: a meta-analysis. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 39(9), 1029–1037. doi: 10.1139/apnm-2013-0566
- Tomasello, B., Grasso, S., Malfa, G., Stella, S., Favetta, M., & Renis, M. (2012). Double-face activity of resveratrol in voluntary runners: assessment of DNA damage by comet assay. *Journal of medicinal food*, 15(5), 441–447. <https://doi.org/10.1089/jmf.2011.0173>
- Viña, J., Gomez-Cabrera, M. C., Lloret, A., Marquez, R., Miñana, J. B., Pallardó, F. V., & Sastre, J. (2000). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants.
- Welis, W. (2014). The Effect Of Feeding With Different Glycemic Indexs On Oxidative Stress Of College Athletes. In *Proceedings of the Conference: Bridging the Gap in The Advancement of Sport Sciences and Technology Implementation Among South East Asia Countries (S.364-368)*, Bali. URL: [https://www.researchgate.net/profile/Robin-Tuliao/publication/353345877\\_Proceeding\\_AFICSST\\_2014/links/60f66d659541032c6d50bd21/Proceeding-AFICSST-2014.pdf#page=364](https://www.researchgate.net/profile/Robin-Tuliao/publication/353345877_Proceeding_AFICSST_2014/links/60f66d659541032c6d50bd21/Proceeding-AFICSST-2014.pdf#page=364)
- Williams, J. H., Batts, T. W., & Lees, S. (2013). Reduced Muscle Glycogen Differentially Affects Exercise Performance and Muscle Fatigue. *International Scholarly*

*Research Notices*, 2013, Article ID 371235, 8 pages.  
<https://doi.org/10.1155/2013/371235>

- Yavari, A., Javadi, M., Mirmiran, P., & Bahadoran, Z. (2015). Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. *Asian journal of sports medicine*, 6(1), e24898.  
<https://doi.org/10.5812/asjasm.24898>
- Yeo, W. K., Carey, A. L., Burke, L., Spriet, L. L., & Hawley, J. A. (2011). Fat adaptation in well-trained athletes: effects on cell metabolism. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquee, nutrition et metabolisme*, 36(1), 12–22.  
<https://doi.org/10.1139/H10-089>
- Zdzieblik, D., Friesenborg, H., Gollhofer, A., & König, D. (2022). A high carbohydrate diet with a low glycaemic index improves training effects in male endurance athletes. *International journal of food sciences and nutrition*, 73(7), 965–972.  
<https://doi.org/10.1080/09637486.2022.2091525>
- Zdzieblik, D., Friesenborg, H., Gollhofer, A., & König, D. (2022). Effect of a High Fat Diet vs. High Carbohydrate Diets With Different Glycemic Indices on Metabolic Parameters in Male Endurance Athletes: A Pilot Trial. *Frontiers in nutrition*, 9, 802374. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.802374>
- Ziech, D., Franco, R., Georgakilas, A. G., Georgakila, S., Malamou-Mitsi, V., Schoneveld, O., Pappa, A., & Panayiotidis, M. I. (2010). The role of reactive oxygen species and oxidative stress in environmental carcinogenesis and biomarker development.

## 8. Anhang

### 8.1. Vorbereitung Comet-Assay

#### Beschichtung der Slides

Herstellung:

1. 1000 mg Normal Melting Agarose in 100 ml Aqua dest. in der Mikrowelle lösen (Gefäß: Erlenmeyerkolben)
2. in der Mikrowelle Agarose komplett lösen (ACHTUNG: nicht zu lange, wegen Siedeverzug)

Auftragen auf Slide:

1. Agarose ins Wasserbad (55°C) stellen
2. Tisch mit Papierhandtüchern auslegen
3. Cut Edge Frosted Slides eintauchen (langsam herausziehen!)
4. Rückseite gut mit einem Papiertuch säubern (Agarose abwischen)
5. über Nacht / Wochenende trocken
6. nach Trocknung (Folgetag) beschichtete Seite markieren und in Slidebox geben
7. im Kühlschrank lagern

#### Agarose für Gel-Spots

Herstellung:

1. 800 mg low Melting Agarose (LMA, 0,8 %) in 100 ml PBS in Mikrowelle lösen und aufkochen lassen
2. in kleine verschraubbare Fläschchen aliquotieren (max. 10ml)
3. im Kühlschrank lagern

#### Puffer F – 10xStock

Aqua dest.: 2l 40mM

HEPES: 190,6g 0,1M

KCl: 149,12g 0,5mM

EDTA: 2,92g 0,2mg/ml

BSA: 4g

1. Falcon Tubes beschriften und im Rack bereitstellen
2. HEPES, KCl und EDTA in einem großen Becherglas mit Magnetprüher mischen

3. Magnetrührer abschalten, BSA langsam in kleinen Mengen auf die Oberfläche streuen und warten bis eine Schicht gelöst ist (Magnetrührer kann zwischendurch vorsichtig eingeschaltet werden)
4. Ziel-pH = 8  $\diamond$  mit 10 M KOH einstellen
5. auf 2l Aqua dest. auffüllen
6. Aliquote bei -20°C lagern

### 8.1. Durchführung Comet-Assay

#### 1. Vorbereitungen

- Wasserbad auf 37°C einschalten
- Puffer F aus Gefrierschrank ins Wasserbad stellen
- großes Becherglas mit Aqua dest. bereitstellen

#### 2. Lyselösung herstellen

Aqua dest.	1l	Becherglas
2,5M NaCl (ClNa)	146,1g	150ml
0,1M EDTA (C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	29,2g	100ml
10mM Tris (Trizma Base, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	1,211g	10ml
ml NaOH (HNaO)	5g	10ml

1l Becherglas: 2,5M NaCl (ClNa) 146,1g 150 ml 0,1M EDTA (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 29,2g 100 ml 10mM Tris (Trizma Base, C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) 1,211g 10 ml NaOH (HNaO) 8g 10 ml

1. alle Reagenzien in einem 1l Becherglas in etwas Aqua dest. lösen
2. pH mit 10 M NaOH einstellen
3. in 1L Messkolben überführen und mit Aqua dest. auf einen 1L auffüllen
4. kurz schwenken
5. 200 ml Lyselösung in 250 ml Becherglas geben
6. 2 ml Triton X mit Pasteurpipette hinzufügen
7. auf Eis lagern

### **3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stocklösung herstellen bzw. verdünnen**

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stocklösung ist eine Woche haltbar und wird immer am Beginn der Woche hergestellt. **0,1 M Stocklösung:**

*Info: Spitzen benetzen und gut spülen*

1. Falcon Tube mit Alufolie umwickeln
2. 10ml Aqua dest. in ein 15ml Falcon Tube geben
3. 103µl Aqua dest. entnehmen
4. 103µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Stock dazu pipettieren
5. im Kühlschrank lagern

#### **100µM Stock H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1:769 Verdünnung):**

*Info: wird täglich hergestellt*

1. Schraubglas mit Alufolie umwickeln
2. 100ml Aqua dest. in Schraubglas geben (100ml Messzylinder)
3. 130µl Aqua dest. entnehmen
4. Stocklösung vortexen
5. 130µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Stocklösung dazu pipettieren
6. auf Eis lagern

### **4. Beschriftungen**

#### **Slides beschriften:**

- pro Proband werden 8 Slides beschriftet (1x Original plus 1xBackup):
  - 2x Lyse
  - 2x H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - 2x Puffer
  - 2x FPG
- Backup mit B kennzeichnen
- 4 Kontrollslides beschriften
- Datum und Probanden ID (Gl..)

#### **Eppis beschriften:**

- pro Proband werden 8 Eppis benötigt:
  - pro Zeitpunkt 2 Stück
  - pre

- post
- TT1
- TT2
- für die Kontrollen beschriftet man jeweils 4 Eppis

## **5. Vorbereitungen zur Gelaufbringung**

1. Proben mit Lyse und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf Eis lagern
2. Pipette auf 5µl, Speed 5 und 9 Steps stellen
3. 3 Küvetten vorbereiten und beschriften (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Lyse und FPG + Puffer)
4. LMA-Agarose in Mikrowelle auflösen (Deckel aufschrauben, aber drauf lassen) und ins Wasserbad stellen
5. Proben in Hand auftauen
6. 10µl je Probe in Eppi aliquotieren

## **6. Aufbringen auf Slides**

1. 200µl Agarose mit 500µl Pipette in Eppi mit Vollblut geben
2. Kurz mischen
3. Auftragen auf Slides mit elektronischer Pipette
  - a. ! zum Aufziehen nach oben drücken
  - b. ! erstes Mal nach unten drücken in Luft
  - c. ! dann jeden Tropfen möglichst präzise auf Slide aufbringen
  - d. ! am besten rausdrücken und dann aus Slide absetzen
4. Kurz aushärten lassen
5. in jeweilige Küvette geben
6. Küvetten mit Lyse (Lyse und FPG + Puffer) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auffüllen

### **H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Stocklösung:**

21 min im Kühlschrank inkubieren und dann 2min mit PBS waschen und in Lyse Küvette geben ◊ 1h im Kühlschrank inkubieren

## **7. Moist Box**

Moist Box mit WEK-Wasser füllen und in den Inkubator geben

## 8. Bechergläser zum Geschirrspüler bringen

## 9. Puffer F herstellen

1. Puffer F aus Wasserbad nehmen
2. in einem 50 ml Messzylinder füllen und Menge notieren
3. in 500 ml Messzylinder füllen und 1:10 mit Aqua dest. verdünnen
4. 500ml Becherglas auf Magnetprüher stellen
5. Magnetprüher dazugeben
6. pH mit 10M KOH einstellen
7. mit Uhrenglas abdecken und auf Eis lagern

## 10. Elektrophoreselösung herstellen

Aqua dest.	2l	Becherglas
0,3M NaOH (HNaO)	24,0g	25 ml
0,001M EDTA (C10H16)	0,58g	5ml

1. alle Reagenzien in einem 1l Becherglas auflösen
2. Ziel-pH = 13 (muss nicht eingestellt werden)
3. in einen 2l Messkolben überführen und mit Aqua dest. auf 2l auffüllen
4. im Kühlschrank lagern

## 11. FPG + Puffer

1. nach 1h Inkubation Slides aus Lyse (Beschriftung: FPG + Puffer) nehmen
2. 3x 5min in Puffer F waschen, währenddessen Küvette auf Eis lagern
3. in letztem Waschschrift FPG herstellen:
  - a. 5 µl FPG aus Kühlschrank nehmen
  - b. 1250 µl Puffer hinzufügen (auf zweimal: 1x 1000µl + 1x 250µl)
  - c. auf Eis lagern
4. Slides aus Puffer nehmen, Unterseite gut abwischen und in Silberkammer legen
5. Silikon mit Löchern darüberlegen und mit Metallauflage und -klammer fixieren
6. auf Eis lagern
7. 30µl Puffer F oder FPG auf Spots geben (parallel arbeiten) → eventuell Lösung kurz reinschütteln

8. mit Silikondeckel abdecken
9. 30min in Moist Box inkubieren (Zeit erst starten, wenn Inkubator wieder bei 37°C ist)

## **12. Vorbereitung für Elektrophorese**

auf Wagen mitnehmen:

- Elektrophorese-Gerät
- Elektrophoreselösung
- Tücher
- Desinfektionsmittel
- Pasteurpipette
- Becherglas
- 1-2 Küvetten mit PBS

Elektrophorese mit schwarzem Kabel auf linker Seite aufbauen → Luftblase in der Mitte des Kreises

## **13. Elektrophorese**

1. Proben aus Moistbox und Kühlschrank nehmen → Lyse weggleeren und zur Elektrophorese mitnehmen
2. jede Behandlungsmethode in eine Reihe legen → eventuell mit Platzhaltern auffüllen
3. Elektrophoreselösung einfüllen
4. 20min im Dunkeln inkubieren
5. nach 15min Elektrophorese erstmals anschließen und Stromstärke überprüfen (Stecker nicht auf derselben Höhe)
6. Strom einschalten → Set/Run → Spannung 25 V → Strom auf MAX → Leistung auf MAX → Zeiteinheit h → Zeit 30 min → RUN
7. Stromstärke sollte 330 mA sein → circa 60-80 ml Lösung abnehmen und erneut überprüfen)
8. nach 20min Inkubationszeit Elektrophorese starten
9. Zettel mit Licht anlassen auf Schalter kleben

#### **14. Neutralisation**

1. Slides aus Elektrophorese nehmen und mit Papiertüchern abwischen
2. 5 min in Küvette mit PBS inkubieren
3. 5 min in Aqua dest. inkubieren
4. 70% Ethanol im Abzug herstellen: 140ml Ethanol + 60ml Aqua dest. (2 Küvetten)
5. 15 min in 70% Ethanol dehydrieren lassen
6. 15 min in 100% Ethanol dehydrieren lassen
7. mit Papiertüchern abwischen und über Nacht in Lade trocknen
8. in Slidebox einordnen und im Kühlschrank lagern

#### **15. Aufräumen**

- alles zum Geschirrspüler bringen
- Elektrophorese und Silberkammern mit WEK-Wasser und Aqua dest. abspülen und zum Trocknen auflegen

#### **16. Auszählen**

1. 10 mL Aqua dest. mit 3 µl Gelred in dunklem Falcon Tube vermischen
2. vortexen
3. im Kühlschrank lagern

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre eidesstattlich, dass ich die Arbeit selbständig angefertigt, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt und alle aus ungedruckten Quellen, gedruckter Literatur oder aus dem Internet im Wortlaut oder im wesentlichen Inhalt übernommenen Formulierungen und Konzepte gemäß den Richtlinien wissenschaftlicher Arbeiten zitiert, durch Fußnoten gekennzeichnet bzw. mit genauer Quellenangabe kenntlich gemacht habe.

Datum: ..... 08.01.2024 .....

Unterschrift: .....  .....

Batljan Katarina