

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Harald Gündel

**Der Einfluss von mentalem Stress und kardiovaskulärem
Risiko auf die Entstehung von oxidativem Stress
bei Bundeswehrsoldaten**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Kirsten Kässens

geboren in Frankfurt am Main

2020

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christiane Waller

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Enrico Calzia

Tag der Promotion: 21.10.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Mentaler Stress hat Einfluss auf somatische und psychische Krankheitsbilder.....	1
1.1.1 Stress und das Kardiovaskuläre System.....	2
1.1.2 Stress und die Depression.....	3
1.2 Oxidativer Stress und DNA-Schäden durch oxidativen Stress.....	4
1.3 Comet Assay als Methode zur Messung von DNA-Strangbrüchen.....	8
1.4 TSST-G an Soldaten in der Studie BEST.....	8
1.5 Fragestellung der Arbeit	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Material.....	11
2.1.1 Lösungen	13
2.2 Studie	14
2.2.1 Trierer Social Stress Test for Groups (TSST-G)	15
2.2.2 MDBF Fragebogen.....	16
2.2.3 STAI Fragebogen	17
2.2.4 PASA Fragebogen	17
2.2.5 PROCAM-Score.....	18
2.3 Methoden	20
2.3.2 Herstellung der LMP-Agarosealiquote.....	21
2.3.3 Probeneinbettung und Lyse	21
2.3.4 Alkalidenaturierung und Elektrophorese.....	22
2.3.5 Auswertung	23
2.4 Statistik.....	25
3 Ergebnisse.....	26
3.1 Soziodemographische Merkmale	26
3.2 Medizinische Merkmale insbesondere hinsichtlich des kardiovaskulären Risikos	27
3.3 DNA-Strangbrüche unter mentalem Stress während des TSST-G.....	29

3.4 Geschlechterspezifische Unterschiede in der Bildung von DNA-Schäden unter mentalem Stress	30
3.5 Einfluss des kardiovaskulären Risikos auf die Bildung von DNA-Schäden unter mentalem Stress	31
3.5.1 Einfluss der Parameter des PROCAM-Score - Rauchen	33
3.5.2 Einfluss der Parameter des PROCAM-Score - positive Familienanamnese	34
3.5.3 Einfluss der Parameter des PROCAM-Score - LDL-, HDL-Cholesterin und Triglyceride.....	35
3.5.4 Einfluss der Parameter des PROCAM-Score - Alter	37
3.5.5 Einfluss der Parameter des PROCAM-Score - systolischer Blutdruck.....	38
3.6 Zusammenhänge zwischen gemessenen DNA-Schäden und den Fragebögen	39
3.6.1 DNA-Schäden unter mentalem Stress in Abhängigkeit zum MDBF.....	39
3.6.2 DNA-Schäden unter mentalem Stress in Abhängigkeit zum Fragebogen STAI-S ..	40
3.6.3 Stressindex des PASA im Zusammenhang zur Bildung von DNA-Schäden	41
4 Diskussion	42
4.1 Strangbrüche in der DNA unter mentalem Stress	42
4.2 Geschlechterspezifische Unterschiede	44
4.3 DNA-Schäden und kardiovaskuläres Risiko	45
4.4 Zusammenhang des subjektiv erlebten Stresses mit DNA-Schäden	50
4.5 Eignung der Methodik und Limitationen im Versuchsablauf	51
4.5.1 Eignung und Limitationen des Comet Assay.....	51
4.5.2 Eignung und Limitationen des TSST	52
4.5.3 Die Stichprobe.....	53
4.6 Ausblick	55
5 Zusammenfassung	57
6 Literaturverzeichnis.....	59
Danksagung	72
Lebenslauf	73

Abkürzungsverzeichnis

BEST	BundeswehrEinsatz und STress (Name der Studie)
CBG	Corticosteroid binding Protein
CRH-BP	Corticotropin-releasing-Hormon-Binding-Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
ESR	Elektrospinresonanz
G	Gruppe
GS	Skala "Gute/Schlechte Laune" des MDBF-Fragebogen
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathion-Disulfid
HDL	High Density Lipoprotein
HPA-Achse	hypothalamisch-pituitär-adrenale Achse
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low Density Lipoprotein
Li-Heparin	Lithium-Heparin
LMP-Agarose	low melting point Agarose
M	männlich
MDBF	Multidimensionaler Befindlichkeitsfragebogen
MEEO-Agarose	Medium elektroendoosmosis-Agarose
MZP	Messzeitpunkt
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells
NR	Messzeitpunkt Nach Ruhephase
NO	Stickstoffmonooxid
NT	Messzeitpunkt nach Stresstest
PASA	Primary Appraisal Secondary Appraisal (Fragebogen)
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PROCAM	Prospective Cardiovascular Munster Study
ROS	Reactive Oxygen Species
RU	Skala "Ruhe/Unruhe" des MDBF

SAM-Achse	sympathische adrenomedulläre Achse
STAI	State-Trait-Angst-Inventar
STAI-S	State-Trait-Angst-Inventar - State Angst
t	Zeit
t0, t1, t2	Studienzeitpunkte vor (t0) und nach Auslandseinsatz (t1, t2)
TSST	Trierer Social Stress Test
TSST-G	Trierer Social Stress Test for Groups
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
VT	Messzeitpunkt Vor Stresstest
W	weiblich
WM	Skala "Wach/Müde" des MDBF

Statistische Kenngrößen:

f	Effektstärke
MW	Mittelwert
n	Stichprobengröße
ns	nicht signifikant
p	Signifikanzwert
r	Korrelationskoeffizient
SD	Standardabweichung
SE	Standard Error

1 Einleitung

1.1 Mentaler Stress hat Einfluss auf somatische und psychische Krankheitsbilder

Mentaler chronischer Stress in Beruf und Alltag stellt in der modernen Welt einen zunehmenden Belastungsfaktor dar. Tagtäglich werden wir Stress ausgesetzt, sei es in emotionalem, sozialem oder beruflichem Kontext oder Stress aufgrund chronischer Erkrankungen und körperlicher Beschwerden. Laut einer Studie in Großbritannien gaben 74% der Studienteilnehmer an, innerhalb des letzten Jahres mindestens eine Situation erlebt zu haben, in der sie so gestresst waren, dass sie sich überwältigt und handlungsunfähig fühlten (Mental Health Foundation, 2018).

Das Wort "Stress" wurde 1956 von Dr. Hans Selye erstmals im medizinischen Kontext verwendet. Stress sei die unspezifische Antwort des Körpers auf jegliche Veränderungen oder äußere Einflüsse, denen das Individuum ausgesetzt ist (Selye, H., 1956). Dabei strebe der Körper die Erhaltung einer Homöostase an (Selye, H., 1956). Der Begriff "Homöostase" wurde bereits 1929 beschrieben als die anpassenden Reaktionen eines offenen Systems auf die äußere Umgebung, die dieses System direkt beeinflusst (Cannon, W., 1929). Schon Selye beobachtete, dass schwerwiegende und langanhaltende Stressreaktionen zu Krankheiten führen können (Selye, H., 1956).

Eine angemessene akute Reaktion des Körpers auf Stress ist an sich nicht als negativ zu bewerten, sondern wichtig für das Individuum, sodass es anpassungsfähig bleibt und auf Situationen, die das Gleichgewicht in Gefahr bringen, reagieren kann durch bspw. eine höhere Aufmerksamkeit der Umwelt gegenüber und schnelleren kognitiven Prozessen (Oyola et al., 2017). Chronische Stressoren hingegen führen zu physiologischen Veränderungen und letztlich zur Förderung verschiedener Krankheitsbilder (Oyola et al., 2017). Bezüglich dieser Krankheitsbilder wird im Folgenden auf jene eingegangen, die für den Kontext dieser Arbeit von Relevanz sind.

1.1.1 Stress und das Kardiovaskuläre System

Mentaler Stress trägt Studien zufolge einen Anteil an der Entwicklung der koronaren Herzkrankheit (KHK), nicht nur durch das höhere Aufkommen eines gesundheitsgefährdenden Lebensstils hinsichtlich Ernährung und Rauchverhalten bei mentalem chronischen Stress, sondern auch durch direkte pathophysiologische Mechanismen (Rozanski et al., 1999). Zu den neun vermeidbaren Risikofaktoren für einen Myokardinfarkt zählen laut der INTERHEART-Studie neben Rauchen, Alkohol, Hypertonie, Diabetes, Stammfettsucht, Lipiddysbalancen im Cholesterin, fehlendem Obst und Gemüse in der Ernährung und mangelnder körperlicher Aktivität auch psychosoziale Faktoren (Yusuf et al., 2004). Darunter fallen erstens die Depression, zweitens einschneidende Lebensereignisse und drittens beruflicher, finanzieller und privater Stress (Yusuf et al., 2004).

Chronischer Stress führt zu neurohumoraler Aktivierung (Theorell et al., 1988). Bei Stress wird die hypothalamisch-pituitär-adrenale Achse (HPA-Achse) aktiviert, durch welche infolge einer Hormonkaskade Glukokortikoide wie Kortisol vermehrt produziert werden, und über die sympathische adrenomedulläre Achse (SAM-Achse) das sympathische Nervensystem aktiviert und Katecholamine ausgeschüttet (Oyola et al., 2017; Rivier & Vale; 1985). Letzteres resultiert in einer höheren Herzfrequenz, stärkerer Kontraktion des Myokards und erhöhtem Blutdruck durch Vasokonstriktion sowie verringerter Kochsalz-Ausscheidung der Nieren (Herd, JA., 1991). Ein chronisch erhöhter Blutdruck führt auf Dauer zu einer Linksherzhypertrophie, da das Herz stärker belastet wird (Brownley et al., 2000). Die Mechanismen dieser beiden Achsen sind in der Vergangenheit umfassend untersucht worden und stehen nicht im Fokus dieser Arbeit. Die Stressreaktion besitzt einige Mechanismen zur Regulation wie negative Feedback-Mechanismen und es ist bekannt, dass die Geschlechtshormone in den Regelkreis der HPA-Achse eingreifen und Unterschiede in der Stressantwort von Männern und Frauen bewirken (Reul & De Kloet, 1985; Oyola et al., 2017).

Kommt es somit in dem Gleichgewicht der Stressachsen durch chronischen oder traumatischen Stress zu Dysregulationen, kann dies zur Förderung kardiovaskulärer Erkrankungen beitragen (Levine et al., 2014).

Mentaler Stress steht in Verbindung mit einer erhöhten Zahl kardialer Ereignisse wie dem Herzinfarkt und dem plötzlichen Herztod, denn Stress wurde mit myokardialer Ischämie, koronarer Vasokonstriktion sowie vermehrter Häufigkeit von Wandveränderungen des linken Ventrikels in Zusammenhang gebracht (Rozanski et al., 1999). Ein einzelnes Ereignis verbunden mit starkem akuten Stress kann bereits temporär das Risiko für einen Herztod erhöhen, so zum Beispiel stieg laut einer Studie nach einem massiven Erdbeben im Jahre 1994 in Los Angeles die Zahl der Herztode von durchschnittlich 4,5 pro Tag auf 24 mit dem Tag des Erdbebens (Lear et al., 1996).

Ebenso ist bekannt, dass Stress Arteriosklerose fördert (Kaplan et al., 1982) und zu erhöhten Cholesterinwerten und Endotheldysfunktionen führt - weitere der Risikofaktoren für Erkrankungen des kardiovaskulären Systems - sowie zu Veränderungen der Blutplättchen und der Blutgerinnung, sodass die Blutviskosität durch Stress erhöht wird (Rozanski et al., 1999). Stress trägt ebenfalls durch vagale Dysregulation und erhöhte sympathische Aktivität zur Genese von kardialen Arrhythmien bei, wobei hier die myokardiale Instabilität z.B. durch eine KHK, auslösende (stressreiche) Events und chronische psychische Belastung gleichermaßen eine Rolle spielen (Lown et al., 1977).

Beispielsweise führt Stress durch soziale Isolation laut Studien zur Ausschüttung von Kortisol sowie zu einer Steigerung der Herzfrequenz und einem erhöhten Risiko für Arteriosklerose (Sapolsky et al., 1997; Watson et al., 1998). Sozialer Stress durch instabile zwischenmenschliche Beziehungen resultiert ebenso in erhöhten Katecholaminwerten und somit erhöhten Herzfrequenzen (Seeman et al., 1994).

1.1.2 Stress und die Depression

Die Prävalenzen psychischer Erkrankungen wie der Depression zeigten in den letzten Jahrzehnten eine steigende Tendenz und stellen ein wichtiges Thema in der Weltgesundheit dar (Ferrari et al., 2013). Die Depression zählt mittlerweile zu einer der größten ökonomischen und soziologischen gesundheitlichen Belastungen der westlichen Welt und zeigt eine zunehmende Tendenz in den vergangenen Jahren (Egede et al., 2016). Das Aufkommen von Depression ist höher bei Stressbelastung und dreimal so hoch unter KHK-Patienten als in der Gesamtbevölkerung (Rozanski et al., 1999). Somit besteht auch ein Zusammenhang zwischen Stress, Depression und kardiovaskulärem Risiko, denn schon das Depressionskriterium "Hoffnungslosigkeit" für sich genommen scheint laut einer

Studie eine höhere Wahrscheinlichkeit für den plötzlichen Herztod zu bedeuten (Bruhn et al., 1974).

Auf der einen Seite sind Personen, die an einer Depression leiden, anfälliger dafür, einen ungesunden Lebensstil zu führen, aber es finden sich auch Hinweise für pathophysiologische Effekte durch eine Depression (Ziegelstein et al., 1998). Die Depression zeigt ähnlich wie die Stressbelastung einen Zusammenhang mit abnormaler Kortisol-Ausschüttung und Dysfunktionen der Blutplättchen - beides beschriebene Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen (Caroll et al., 1976; Musselman et al., 1996). So könnten Veränderungen in der Kortisolausschüttung während der Stressantwort, wie sie bei depressiven Erkrankungen vorzuliegen scheinen, im positiven Zusammenhang mit der Progression von Arteriosklerose und vermehrten Inflamationsprozessen stehen (Waller et al., 2016). Ursache einer Depression können außerdem stressreiche Lebensereignisse sein (Kendler et al., 1999). Studien zufolge wirkt sich sogar bereits *in utero* der Stress der Mutter während der Schwangerschaft auf ein erhöhtes Risiko für Depression aus, vor allem bei Männern - während bei Frauen der postnatale Stress stärkere Auswirkungen zeigt (Herbison et al., 2017).

1.2 Oxidativer Stress und DNA-Schäden durch oxidativen Stress

Oxidativer Stress wird definiert als eine Dysbalance pro- und antioxidativer Mechanismen durch übermäßiges Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Verhältnis zu den Kapazitäten der Gegenreaktion durch antioxidative Systeme des Körpers (Persson et al., 2014; siehe Abbildung 1). Dieses Übermaß an ROS steht im Zusammenhang mit der Genese diverser Krankheiten, besonders kardiovaskulärer Erkrankungen wie Arteriosklerose, neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, der Entstehung von Krebs und chronisch-entzündlichen Erkrankungen (Halliwell et al., 1992).

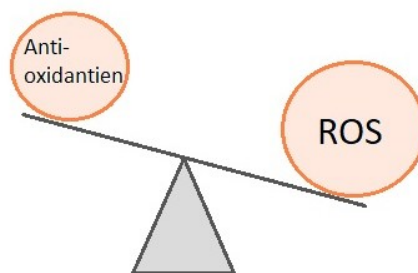


Abbildung 1 Oxidativer Stress entsteht durch ein Überverhältnis von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu den antioxidativen Schutzsystemen des Körpers

ROS sind freie Radikale, also Moleküle, die ein ungepaartes Elektron in einem Orbital enthalten, wozu z.B. Moleküle wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxid ($\bullet\text{O}_2^-$), elementarer Sauerstoff, das Hydroxyl-Radikal ($\bullet\text{OH}$) und Stickstoffmonoxid (NO) gehören (Riley, P.A., 1994). Sie können entstehen bei aeroben Prozessen wie der Zellatmung in den Mitochondrien, bei Phagozytose in aktivierten Makrophagen, während starker körperlicher Aktivität oder durch Gifte wie UV-Strahlung, Alkohol, Zigarettenrauch und radioaktiver Strahlung (Pisoschi & Pop, 2015).

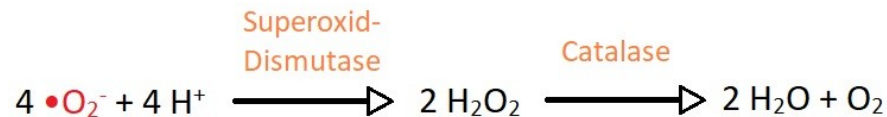
Durch oxidativen Stress werden eine Vielzahl an Biomolekülen geschädigt, besonders empfindlich für die Oxidation durch ROS sind dabei Lipide, sodass Zellmembranen geschädigt werden (Milne et al., 2005). Auch bewirken ROS eine Oxidation von Proteinen, sodass diese beschädigt werden oder Fehlfaltungen entstehen und die Proteine ihre Funktion verlieren (Headlam & Davies, 2004). Als drittes und für diese Arbeit am wichtigsten, beschädigen ROS die DNA, indem sie Strangbrüche, DNA-Protein-Crosslinking und Veränderungen der Basenstruktur hervorrufen. Daraus resultieren letztlich Mutationen in der DNA (Gandhi & Abramov, 2012).

Gegenspieler der ROS sind die antioxidativen Schutzmechanismen des Körpers. Primäre Antioxidantien sind Substanzen, die durch die Abgabe eines Wasserstoffatoms (H^+) Radikale abfangen können und so die Oxidationsreaktion verhindern. Sekundäre Antioxidantien sind Stoffe, die z.B. H_2O_2 abbauen, UV-Strahlung abfangen, Inhibitoren oxidativer Enzyme sind oder für die Regeneration primärer Antioxidantien sorgen und diese unterstützen (Pisoschi & Pop, 2015). Desweiteren lassen sich Antioxidantien in enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien unterteilen (Čolak et al., 2017; Beispiele siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Einige wichtige enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien (nach Čolak et al., 2017)

Enzymatische Antioxidantien	Nicht-enzymatische Antioxidantien
Superoxid-Dismutase	Vitamin C (Ascorbinsäure)
Catalase	Vitamin E (α -Tocopherol)
Glutathion-Peroxidase	β -Carotin
	Glutathion

Enzyme werden im Gegenteil zu nicht-enzymatischen Verbindungen bei der Umsetzung von Substraten selbst nicht verbraucht. Wichtige Enzyme sind hier die Superoxid-Dismutase und die Catalase, die Redox-Reaktionen katalysieren. Mit folgender Reaktion bewirken sie, dass das Radikal Superoxid ($\bullet\text{O}_2^-$) zu Wasser und Sauerstoff reduziert wird (Pisoschi & Pop, 2015):



Ein weiteres wichtiges antioxidatives System ist das Glutathion (GSH), das ebenfalls H_2O_2 zu Wasser reduzieren kann indem es zu Glutathion-Disulfid (GSSG) oxidiert wird (Dröge, W., 2002):



Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören die Vitamine C und E (Ascorbinsäure und α -Tocopherol), denn sie fangen freie Radikale ab, auch jene die Lipide oxidieren, NO und Wasserstoffperoxid (Descamps-Latscha et al., 2001). β -Carotin wirkt UV-schützend und fängt ebenfalls Radikale wie elementaren Sauerstoff ab (Huang et al., 2005).

Entstandenen DNA-Schäden stehen letztlich weitere Mechanismen zur Erhaltung der Homöostase zu Verfügung in Form von Reparaturmechanismen. Die wichtigsten fünf davon sind die Basenexzisionsreparatur, die Nukleotidexzisionsreparatur, die Mismatch Reparatur, die homologe Rekombination und die nicht-homologe End-zu-End Kombination. Die ersten drei dienen der Reparatur kleinerer Schäden wie durch UV-Strahlen, die nicht-homologe Rekombination der Reparatur ganzer Doppelstrangbrüche (Chatterjee & Walker, 2017).

Es existieren Studien, die Konzentrationen von 8-Hydroxy-2-Desoxyguanosin im Zusammenhang mit psychischem Stress gemessen haben - einen Marker im Urin für DNA-Schäden. Diese deuten darauf hin, dass mentaler Stress sich als oxidativer Stress in DNA-Schäden äußern kann (Shimano et al., 2018). Außerdem konnten Studien zeigen, dass

Patienten, die an einer Depression leiden, eine erhöhte Menge an oxidativen DNA-Schäden wie Einzel- und Doppelstrangbrüchen aufweisen (Czarny et al., 2015).

Akuter Stress lässt Studien zufolge Entzündungsmediatoren im Körper ansteigen (Streptoe et al., 2007). Proinflammatorische Zytokine hauptsächlich aus Makrophagen induzieren eine lokale Entzündungsreaktion und stimulieren die Freisetzung von ROS, während die Produktion von ROS wiederum die Bildung proinflammatorischer Zytokine auslöst (Xu et al., 2015; Ghezzi et al., 2018; siehe Abbildung 2). Möglicherweise stellt das Inflammasom nicht nur eine Verbindung zwischen psychischen Stressoren und einer Entzündungsreaktion des Körpers dar, sondern auch einen direkten Zusammenhang der Entzündung zu ROS (Iwata et al., 2013; Zhou et al., 2011; siehe Abbildung 2).

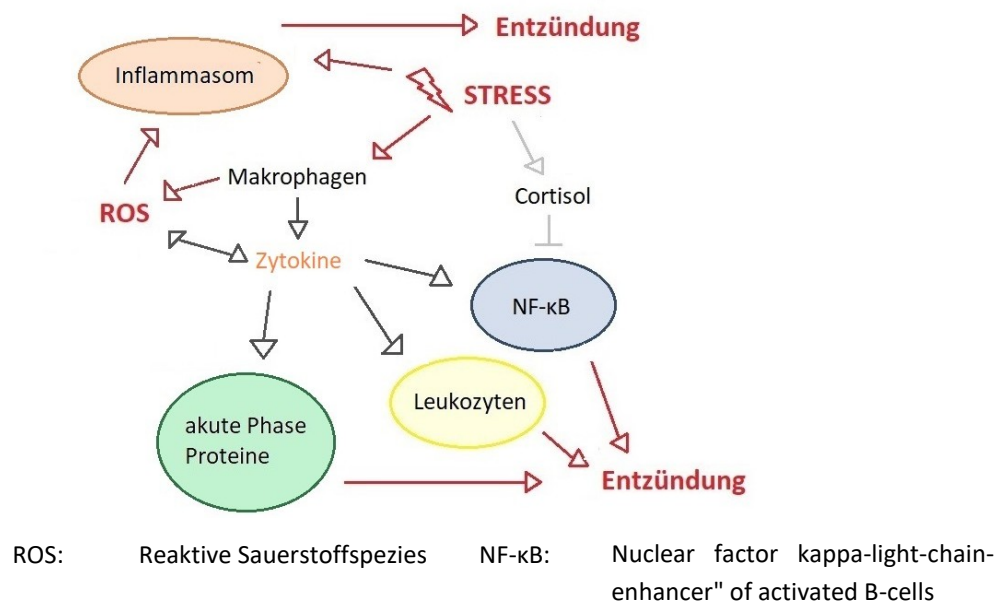


Abbildung 2 Zusammenhang zwischen ROS und inflammatorischen Prozessen. ROS entstehen u.a. aus Makrophagen im Inflamationsprozess, welcher durch Stress ausgelöst werden kann. Möglicherweise stellt das Inflammasom außerdem eine direkte Verbindung zwischen ROS und der Entzündungsreaktion dar.

Desweiteren konnte das vermehrte Auftreten von ROS mit Übergewicht und Diabetes assoziiert werden (Silver et al., 2007; Shin et al., 2001). Dysbalancen im Lipidprofil mit erhöhtem LDL-Cholesterin zeigten ebenfalls positive Korrelationen mit erhöhtem oxidativen Stress und dasselbe gilt auch für Bluthochdruck (Wang et al., 2017; Togliatto et al., 2017). Diverse Studien beschrieben einen direkten Zusammenhang von ROS zu kardiovaskulären Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt, Linksherzhypertrophie und

Arteriosklerose (Lambeth, J.D., 2007). Desweiteren induziert Zigarettenrauch ROS (Ellegaard & Poulsen, 2016).

1.3 Comet Assay als Methode zur Messung von DNA-Strangbrüchen

Die Einzelzell-Gelelektrophorese, auch genannt Comet Assay, ist eine Methode zur Messung von DNA Strangbrüchen (Collins, A.R., 2004).

Zuerst entwickelt wurde die Methode 1984 von Östling und Johanson (1984). Mit ihrer Technik unter der Verwendung neutraler Bedingungen konnten Doppelstrangbrüche der DNA detektiert werden, die als negativ geladene DNA mithilfe der Einzelzellelektrophorese aus dem Zellkern zur Anode gezogen wurden (Östling & Johansen, 1984). Vier Jahre später wurde die Methode um alkalische Bedingungen bei einem pH-Wert von >13 ergänzt. Unter Alkalidenaturierung findet eine Entspiralisierung der DNA statt, sodass sowohl Doppelstrang- als auch Einzelstrangbrüche detektiert werden können (Singh et al, 1988). Im Jahre 1990 wurde die Einzellelektrophorese von Olive et al. (1990) um das Konzept des Parameters "Tail Moment" zur Auswertung erweitert und die unter dem Mikroskop sichtbaren Zellen nach ihrem Erscheinungsbild erstmals als "Comets" bezeichnet. (Olive et al., 1990).

Der Comet Assay eignet sich somit unter Ausschluss anderer DNA-schädigender Faktoren dazu, ROS-induzierte DNA-Schäden zu detektieren. Die beschädigten Fragmente werden im elektrischen Feld zur Anode gezogen, während intakte DNA-Moleküle zu groß sind, um die Matrix zu durchwandern (Fang et al., 2015). Diese Arbeit verwendet den Comet Assay unter alkalischen Bedingungen und den Parameter Tail Moment zur Auswertung.

1.4 TSST-G an Soldaten in der Studie BEST

Der Trierer Social Stress Test (TSST) wurde von Kirschbaum und Kollegen (1993) entworfen, als Methode zur Untersuchung von psychobiologischen Stressreaktionen unter Laborbedingungen (Kirschbaum et al., 1993). Der TSST basiert auf den zwei Komponenten der sozialen Bewertung und der Unvorhersehbarkeit der Situation und gilt heutzutage als Goldstandard für die Untersuchung akuter mentaler Stressreaktionen (Allen et al., 2016). Von Dawans und Kollegen (2011) modifizierten die Methode und schufen ein Protokoll für den TSST in Gruppen (TSST-G) mit bis zu sechs Teilnehmern. Dabei konnte gezeigt werden, dass der TSST-G den Kortisolspiegel um das Dreifache

erhöht und ebenfalls die Herzfrequenz signifikant steigert (van Dawans et al., 2011). Diese Arbeit nutzt den TSST-G, um akuten mentalen Stress bei den Probanden unter reproduzierbaren Bedingungen zu schaffen.

Studien zur Methodik des TSST zeigten, dass die Kortisolspiegel durch den TSST höhere Werte bei Männern erzielten und Frauen häufiger als Männer non-responder auf diese Methodik waren, also bei ihnen öfter keine Stressreaktion durch den TSST hervorgerufen werden konnte (Herbison et al., 2016). Es scheinen also geschlechterspezifische Unterschiede in der Reaktion auf den TSST zu existieren.

Der TSST-G wurde durchgeführt im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress) der Universität Ulm. Ziel der Studie ist es, im Zusammenhang mit Auslandseinsätzen das Ausmaß an psychologischen und biologischen Belastungsfaktoren sowie deren Auswirkung auf die Herzgesundheit zu erfassen. Soldaten und Soldatinnen mit erhöhtem Risiko sollen erfasst und Schutzfaktoren identifiziert werden, welche die Einsatzfähigkeit der Soldaten und Soldatinnen im Ausland erhöhen können. Dazu wurden subjektive Kriterien in Form standardisierter Fragebögen ermittelt sowie biologische Parameter wie Plasma- und Serummarker und Katecholamine erhoben. Außerdem wurden für molekularbiologische Analysen periphere mononukleäre Zellen (PBMC) gewonnen, mittels Elektronenspinresonanz (ESR) Radikale und NO-Werte erfasst und mithilfe des Comet Assay Strangbrüche der DNA detektiert. Für die vorliegende Arbeit relevant ist die Methode des Comet Assay.

Allgemein würde man annehmen, Soldaten oder Soldatinnen besäßen aufgrund guten körperlichen Trainings und jungen Alters eine niedrigere Wahrscheinlichkeit für kardiovaskuläre Erkrankungen als die Durchschnittsbevölkerung. In der Tat zeigen Soldaten aber ein erhöhtes Aufkommen von KHK auf, und exzessive körperliche Belastung erhöht das Risiko für ein akutes Koronarsyndrom (Wilson & Folkes, 2015; Kales et al., 2003). Krieg und der Kampf in der Schlacht als starke mentale Stressoren werden assoziiert mit einer erhöhten Anzahl kardialer Events und kardiovaskulärer Risikofaktoren (Meisel et al., 1991). Desweiteren haben Soldaten und Soldatinnen in Auslandseinsätzen ein doppelt so hohes Risiko, eine posttraumatische Belastungsstörung zu entwickeln als diejenigen ohne Auslandseinsatz (Hoge et al., 2004).

1.5 Fragestellung der Arbeit

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben wurde, wirkt mentaler Stress sich vielfältig auf die Physiologie des Körpers aus und steht in engem Zusammenhang mit einer Vielzahl an Erkrankungen. Da sich außerdem in der Literatur Hinweise finden, dass mentaler Stress zu oxidativem Stress und somit zu DNA-Schäden führen kann, beschäftigt sich diese Doktorarbeit damit, den Zusammenhang zwischen akutem mentalen Stress und der Entstehung von DNA-Strangbrüchen an gesunden Soldaten und Soldatinnen der Bundeswehr zu untersuchen.

Es ergeben sich damit folgende Hypothesen für diese Arbeit:

1. Mentaler Stress führt bei Soldatinnen und Soldaten der Bundeswehr zu einem Anstieg der DNA-Strangbrüche.
2. Die Menge an DNA-Strangbrüchen fällt in einer sich dem mentalen Stress anschließenden Ruhephase ab auf sein Ausgangsniveau.
3. Es gibt geschlechterspezifische Unterschiede in der Menge an DNA-Strangbrüchen unter mentalem Stress.
4. DNA-Schäden stehen in positivem Zusammenhang mit dem kardiovaskulären Risikoscore PROCAM.
 - 4.1 Raucher weisen mehr DNA-Strangbrüche unter Stress auf als Nichtraucher.
 - 4.2 Bei positiver Familienanamnese bezüglich Herzinfarkten entstehen mehr DNA-Schäden.
 - 4.3 Es kommt zu mehr DNA-Strangbrüchen mit steigendem Alter.
 - 4.4 Je höher der systolische Blutdruck in Ruhe ist, desto mehr DNA-Strangbrüche entstehen.
 - 4.5 Die Anzahl an DNA-Schäden steht in Zusammenhang mit dem Lipidprofil.
5. Es bestehen Zusammenhänge zwischen Fragebögen zum erlebten Stress und der Menge an DNA-Strangbrüchen unter mentalem Stress.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
MEEO(Medium elektroendoosmosis)-Agarose	Merck
LMP(Low melting point)-Agarose	Sigma-Aldrich
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Thermo-Fisher Scientific
Natriumchlorid NaCl	Sigma-Aldrich
Na ₂ EDTA	Panreac-AppliChem
Trizma base	Sigma-Aldrich
NaOH pellets	Sigma-Aldrich
HCl 8 M	AppliChem
Ethanol 99,8%, vergällt	Apotheke des Uniklinikums Ulm
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH
Triton X-100	Sigma-Aldrich
DMSO	Carl Roth GmbH

Tabelle 3: Verwendete Geräte und weitere Materialien

Materialien und Geräte	Hersteller
Objektträger	VWR
Wasserbad	GFL
Mikrowelle	Imtron GmbH
Reaktionsgefäße 1,5 mL	Eppendorf
Erlenmeyerkolben	Duran

Fortsetzung Tabelle 3

Objektträger	VWR
Heizblock Unitek HBS-130	Scientific Plastics
Heizblock QBD1	Grant Instruments
Deckgläser	Menzel B.V.&Co.KG / Thermo-Fisher Scientific
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT BASIC	BIO RAD
Elektrophoresis power supply Consort E835	Sigma-Aldrich
Elektrophoresis power supply Consort EV231	Sigma-Aldrich
Lichtschließende Boxen	ABM Italia
Glasküvetten	Glaswerk Wertheim
Fluoreszenzmikroskop	Olympus Optical Co.
Li-Heparin Monovetten 2,6 mL	Sarstedt
Vasofix Safety Venenverweilkanüle	Sarstedt
Papiertücher	VWR
Pipetten (1000 µL, 200 µL, 10 µL)	Brand
Pipettenspitzen	Eppendorf
Kühlschrank (4°C)	Liebherr
Eismaschine	Manitowoc

Tabelle 4: Verwendete Software

Software	Hersteller
Comet IV	Instem, UK
SPSS Statistics Version 25	IBM, USA

2.1.1 Lösungen

Lysepuffer

pH = 10	2,5 M NaCl	146,1 g
	100 mM Na ₂ EDTA	37,2 g
	Trizma Base	1,2 g
	NaOH	8 g
	auf 890 mL dH ₂ O auffüllen	

Elektrophoresepuffer

pH > 13	10 M NaOH	300 mL
	200 mM Na ₂ EDTA	50 mL
	auf 10 L dH ₂ O auffüllen	

Neutralisationspuffer

pH = 7,5	Trizma Base	48,5 g
	HCl 37%	28 mL
	auf 1 L dH ₂ O auffüllen	

LyseLösung

Triton X-100	1 mL
DMSO	10 mL
Lysepuffer	89 mL

Ethidiumbromidlösung

Ethidiumbromid	0,33 µg/mL
in dH ₂ O	

2.2 Studie

Die Methoden dieser Arbeit wurden etabliert im Rahmen der Studie BEST ("BundeswehrEinsatz und STress") der Klinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie der Universität Ulm. Die Studie wurde durchgeführt an Soldaten und Soldatinnen der Bundeswehr, die zu den entsprechenden Zeitpunkten in den standortnahen Bundeswehreinrichtungen Laupheim, Ulm und Dornstadt für die Studie rekrutiert werden konnten. Durch die Ethikkommission der Universität Ulm wurde die Studie genehmigt (Nr. 253/12). Die Studie untergliederte sich wie in Abbildung 3 dargestellt in drei Messzeitpunkte, im Folgenden bezeichnet als t0, t1 und t2.

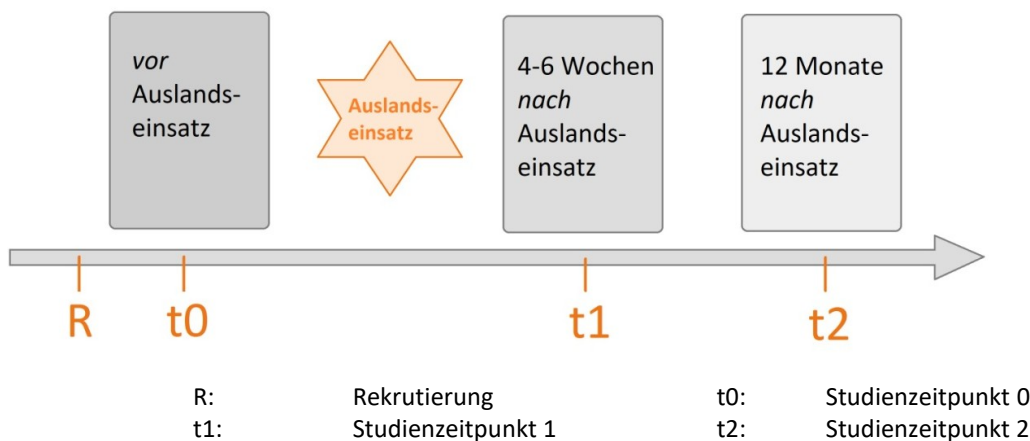


Abbildung 3 Zeitlicher Ablauf der BEST (BundeswehrEinsatz und STress) Studie (durchgeführt am Universitätsklinikum Ulm von 2017 bis laufend) Für die Messungen des Comet Assay dieser Arbeit wurden nur Proben zum Messzeitpunkt t0 verwendet.

Bei der Rekrutierung (R) wurden Probanden der Bundeswehr zwischen 18 und 50 Jahren ausgewählt. Nach der Rekrutierung fand der Messzeitpunkt t0 statt. An diesem Versuchstag wurde der Trierer Social Stress Test for Groups (TSST-G) an drei bis sechs Probanden durchgeführt, an dem mehrere Blutentnahmen für die biologischen Messwerte stattfanden. Am Messzeitpunkt t0 nahmen 234 Probanden teil.

Zu den Messzeitpunkten t1 und t2 nach dem Auslandseinsatz wurde erneut der TSST-G durchgeführt und dieselben Parameter erhoben. Für diese Arbeit sind diese Zeitpunkte von untergeordneter Bedeutung, da hierfür ein Probandenkollektiv ausschließlich zum Zeitpunkt t0 ausgewählt wurde. Dabei wurde der Comet Assay an 105 Probanden der Gruppe t0 durchgeführt. Als technisch durchführbar, vollständig und unbeschädigt erwiesen sich die Probensätze von 72 Probanden.

2.2.1 Trierer Social Stress Test for Groups (TSST-G)

An dem jeweiligen Versuchstag wurde der Trierer Social Stress Test for Groups (TSST-G) an drei bis sechs Probanden durchgeführt, an dem mehrere Blutentnahmen für die biologischen Messwerte stattfanden. Den zeitlichen Ablauf zeigt Abbildung 4.

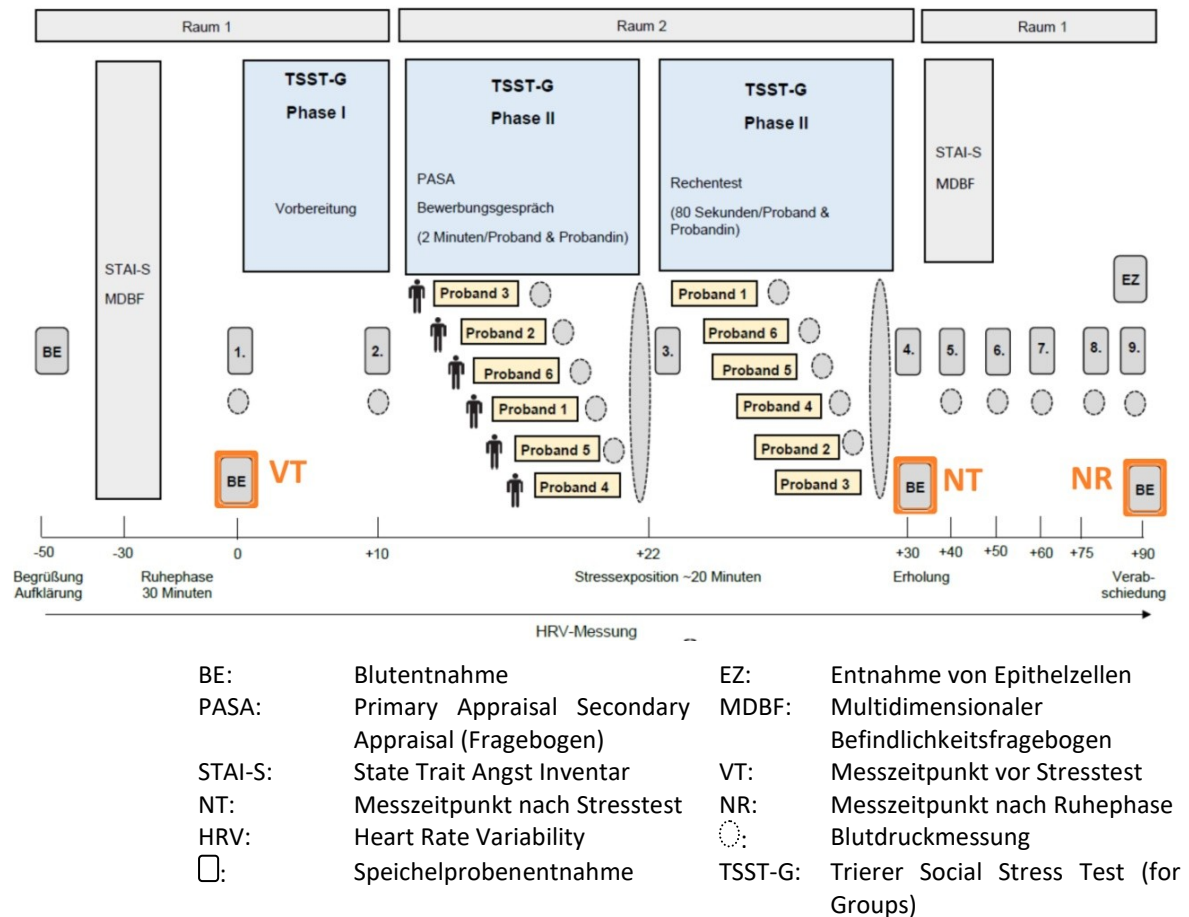


Abbildung 4 Zeitlicher Ablauf des TSST-G (durchgeführt am Universitätsklinikum Ulm im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress) von 2017 bis laufend). Die Blutentnahmen (BE) vor und nach Stressexposition (VT bzw. NT) sowie nach der Ruhephase (NR) sind für den Comet Assay relevant.

Zu Beginn des Versuchsabends wurde jedem Probanden eine Venenverweilkanüle gelegt. Danach bekamen die Probanden eine Ruhephase, in der sie Zeit hatten die Fragebögen MBDF und STAI-S auszufüllen. Nun erfolgte die Entnahme der Blutproben vor Stressexposition - im Folgenden bezeichnet als VT - und die Phase I des TSST-G beginnt. Hier bereiteten sich die Probanden einige Minuten auf ein zu simulierendes Bewerbungsgespräch für ihren Traumjob vor. Der Test wurde für die Phase II in einen zweiten Raum verlegt, in dem ein Gremium von zwei Personen auf die Probanden

wartete. Jeder Proband hatte nun zwei Minuten Zeit, sich für die Stelle zu präsentieren. Dabei zeigte das Gremium keine Reaktionen oder Unterstützung für den Sprechenden und der Proband sah sich einer (Fake)Kamera gegenüber. Als nächstes unterliefen die Probanden je 80 Sekunden einem Rechentest. Danach erfolgte die zweite Blutentnahme - hier bezeichnet als NT. Während Phase II füllten die Probanden die PASA Fragebögen aus. Nun kehrten die Probanden in den ersten Raum zurück. Hier begann eine Ruhephase von 60 Minuten, in der die Fragebögen MBDF und STAI-S erneut ausgefüllt wurden und Zeitschriften zum Lesen bereitlagen. Nach den 60 Minuten wurde ein drittes Mal Blut abgenommen - dieser Zeitpunkt wird im Folgenden bezeichnet als NR.

2.2.2 MDBF Fragebogen

Der Mehrdimensionale Befindlichkeitsfragebogen (MDBF) dient der Erfassung der aktuellen psychischen Befindlichkeit (Steyer et al., 1997). Diese wird anhand dreier bipolarer Skalen erfasst - Gute-/Schlechte Stimmung (GS), Wachheit/Müdigkeit (WM) und Ruhe/Unruhe (RU) (Steyer et al., 1997). Der MDBF enthält 24 Items, aber hier wurden die Kurzformen mit 12 Items verwendet. Die Zugehörigkeit der Items zu den Skalen zeigt Tabelle 5. Jedes Item beschreibt ein Adjektiv, das auf einer fünfstufigen Antwortskala von 1 ("überhaupt nicht") bis 5 ("sehr") beurteilt werden kann (Steyer et al., 1997).

Tabelle 5: Zugehörigkeit der Items zu den Skalen des MDBF (nach Steyer et al., 1997)
Jedes Item kann mit Punktwerten von 1 bis 5 bewertet werden. Die Punktwerte innerhalb einer Skala werden addiert bzw. werden dabei negative Adjektive in ihren Werten umgepolt.

GS: Gute/Schlechte Stimmung (Skala) WM: Wach/Müde (Skala)
RU: Ruhe /Unruhe (Skala) MDBF: Multidimensionaler
Befindlichkeitsfragebogen

Skala	Kurzform A		Kurzform B	
GS	gut	schlecht	wohl	unglücklich
	zufrieden	unwohl	glücklich	unzufrieden
WM	ausgeruht	schlapp	wach	schläfrig
	munter	müde	frisch	ermattet
RU	gelassen	ruhelos	ruhig	angespannt
	entspannt	unruhig	ausgeglichen	nervös

Jede Skala enthält vier Items, somit liegen die möglichen Werte jeweils zwischen 4 und 20, wobei bei negativ formulierten Items die Werte umgepolt werden müssen (Steyer et al., 1997). Dabei bedeuten hohe Skalenwerte eine gute Stimmungslage, Wachheit und Ruhe (Steyer et al., 1997).

Der MDBF wurde in der BEST-Studie von den Probanden einmal zu Beginn der ersten Ruhephase und ein zweites Mal direkt nach Stressexposition zu Beginn der zweiten Ruhephase ausgefüllt.

2.2.3 STAI Fragebogen

Das State-Trait-Angstinventar (STAI) besteht aus zwei unabhängigen Skalen für die Zustandsangst (State-Angst/STAI-S) und die Angst als Eigenschaft (Trait-Angst) mit jeweils 20 Items (Laux et al., 1981). In dieser Studie wurde mit der Skala für Zustandsangst gearbeitet (STAI-S). Jedes Item enthält eine Feststellung wie z.B. "Ich bin beunruhigt" oder "Ich fühle mich ausgeruht" und kann mit den Ziffern von 1 ("überhaupt nicht") bis 4 ("sehr") bewertet werden (Laux et al., 1981). Zur Auswertung werden die Werte aller 20 Items aufsummiert, wobei diejenigen Werte von Items, die Richtung Angstfreiheit abzielen, umgekehrt werden müssen, sodass sich Werte von 20 bis maximal 80 ergeben (Laux et al., 1981).

Der STAI-S wurde in der BEST-Studie gemeinsam mit dem MDBF von den Probanden einmal zu Beginn der ersten Ruhephase und ein zweites Mal direkt nach Stressexposition zu Beginn der zweiten Ruhephase ausgefüllt.

2.2.4 PASA Fragebogen

Der Fragebogen für Primary Appraisal Secondary Appraisal (PASA) dient der Erfassung kognitiver Bewertungen nach der transaktionalen Stresstheorie von Lazarus und Folkman (Gaab et al., 2003). Die Stresstheorie nach Lazarus beschreibt, dass eine Stresssituation zunächst in der Erstbewertung (primary appraisal) auf ihre Bedrohung und das Ausmaß an Herausforderung bewertet wird und anschließend in der Zweitbewertung (secondary appraisal) die Bewältigungsmöglichkeiten beurteilt werden (Lazarus & Folkman, 1984). Der PASA besteht aus den vier Primärskalen "Bedrohung", "Herausforderung", "Selbstkonzept" und "Kontrollüberzeugung" mit jeweils vier Items (Gaab, J., 2009). Jedes der insgesamt 16 Items kann von 1 "ganz falsch" bis hin zu 6 "ganz richtig" bewertet

werden (Gaab, J., 2009). Zu Sekundärskalen berechnen sich die Erstbewertung als Summenmittelwert der Skalen "Bedrohung" und "Herausforderung" sowie die Zweitbewertung als Summenmittelwert der Skalen "Selbstkonzept" und "Kontrollüberzeugung", wie in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Sekundärskalen des PASA Fragebogens (nach Gaab, J., 2009) Die Punktwerte aus den Items der zugehörigen Skalen ergeben als Summenmittelwerte die Werte für die Erstbewertung und die Zweitbewertung.

	Erstbewertung	Zweitbewertung
Skalen	Bedrohung + Herausforderung	Selbstkonzept + Kontrollüberzeugung

Aus den beiden Sekundärskalen lässt sich der Stressindex berechnen (Gaab, J., 2009):

$$\text{Stressindex} = \text{Erstbewertung} - \text{Zweitbewertung}$$

Der Stressindex zeigt das Ausmaß an individueller Gesamtbelastung empfunden in der aktuellen Situation an (Gaab, J., 2009).

2.2.5 PROCAM-Score

In der vorliegenden Arbeit wird zur Beurteilung der kardiovaskulären Gefährdung der Probanden der PROCAM-Score herangezogen. Die Prospective Cardiovascular Munster Studie (PROCAM-Studie) entwickelte diesen Score, der mithilfe von acht Parametern das Risiko einschätzt, in den nächsten zehn Jahren einen Herzinfarkt zu erleiden (Assmann et al., 2002). Die Punkte werden dabei nach folgendem Schema auf die acht Parameter verteilt, welches in Tabelle 7 zu finden ist. Summenscores größer 20 Punkten wurden als PROCAM-positiv gewertet, Punktzahlen darunter als PROCAM-negativ.

Tabelle 7: Kategorien mit Punkteverteilung des Summscores PROCAM (nach Assmann et al., 2002) Die Punktzahlen der acht Parameter werden zum PROCAM-Score aufsummiert.

LDL: Low density Lipoprotein

HDL: High density Lipoprotein

Alter (Jahre)		LDL-Cholesterin (mg/dL)		HDL-Cholesterin (mg/dL)		Triglyceride (mg/dL)	
35 - 39	0	< 100	0	< 35	11	< 100	0
40 - 44	6	< 130	5	< 45	8	< 150	2
45 - 49	11	< 160	10	< 55	5	< 200	3
50 - 54	16	< 190	14	> 55	0	> 200	4
55 - 59	21	> 190	20				
60 - 65	26						

Systolischer Blutdruck (mmHg)		Infarkt in der Familie?		Raucher		Diabetes	
< 120	0	nein	0	nein	0	nein	0
< 130	2	ja	4	ja	8	ja	6
< 140	3						
< 160	5						
> 160	6						

2.3 Methoden

Für die Erhebung der Daten wurde an Vollblutproben der Probanden der Comet Assay unter alkalischen Bedingungen durchgeführt, um Doppel- und Einzelstrangbrüche in der DNA zu detektieren. Die Abbildung 5 zeigt einen Überblick über die Versuchsdurchführung des Comet Assay.

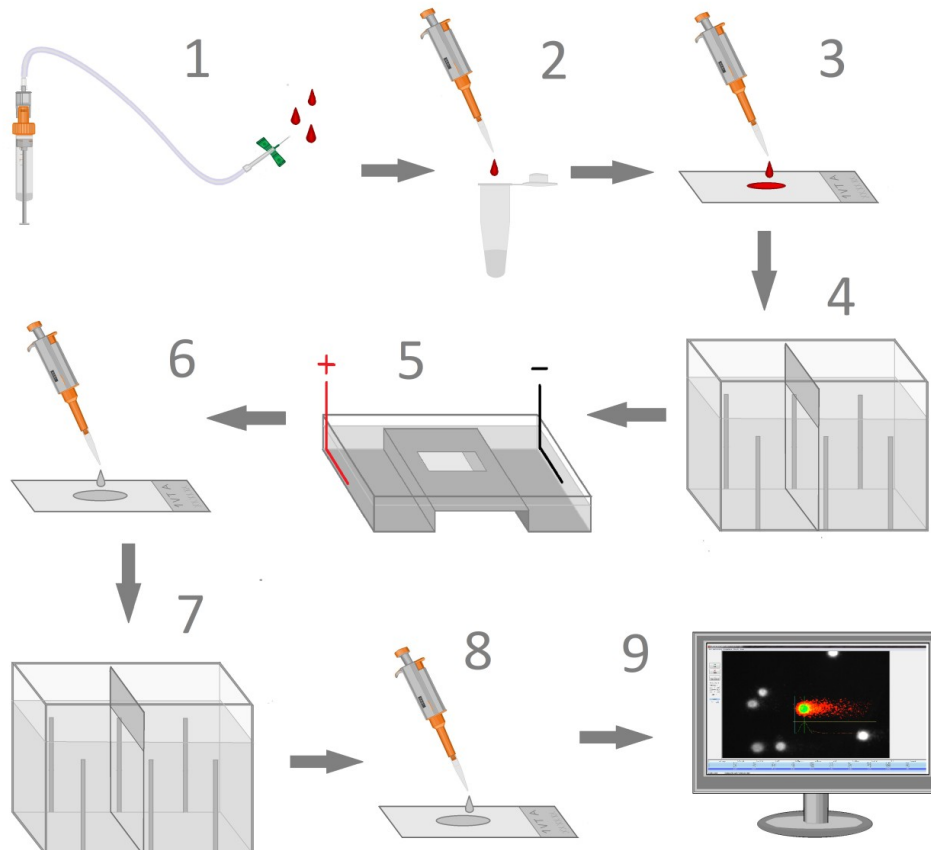


Abbildung 5 Überblick über die Durchführung des Comet Assay

Zunächst fand die Gewinnung von Material für den Versuch statt. Nachdem den Probanden am Versuchstag zum jeweiligen Messzeitpunkt Blut abgenommen wurde, erfolgte der sofortige Transport der Proben auf Eis und die direkte Bearbeitung (1). Dafür wurde eine kleine Menge Vollblut in bereits vorbereitete LMP-Agarosealiquote pipettiert (2), durchmischt und auf Objektträger aufgetragen (3), die vorher mit MEEO-Agarose beschichtet worden waren. Anschließend standen die Objektträger über Nacht in einer Lösung, die die Zellen lysiert (4). Nun konnten am folgenden Tag die Objektträger in eine Elektrophoresekammer gelegt werden und die Einzelzell-Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen erfolgen (5). Nach mehreren Schritten zur Neutralisierung des pH-Wertes (6), wurden die Objektträger in Ethanol gestellt (7), damit das Wasser verdrängt wird und somit der Farbstoff später besser an die DNA binden kann. Als Farbstoff wurde nach dem Trocknen eine Ethidiumbromid-Lösung verwendet (8) und so konnten die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und mit der entsprechenden Software ausgewertet werden (9).

2.3.1 Beschichtung der Objektträger

Für die Herstellung 1,5%iger MEE0-Agarose wurden zunächst 1,5 g Agarose auf 100 mL PBS eingewogen. Diese wurde in der Mikrowelle zweimal aufgekocht und in das auf 60° C vorgewärmte Wasserbad gestellt, damit die Agarose nicht bereits im Erlenmeyerkolben erhärtet. Die mehrmals abgewischten Objektträger wurden nun bis einige Millimeter in das Beschriftungsfeld hinein in die flüssige Agarose getaucht, kurz ablaufen gelassen und an der Rückseite abgewischt.

Anschließend wurden die Objektträger zur Trocknung auf Ablageflächen gelegt. Die so beschichteten Objektträger ließen sich für längere Zeit bei Raumtemperatur lagern.

2.3.2 Herstellung der LMP-Agarosealiquote

Zunächst wurde eine 0,5%ige Agarose hergestellt, indem 0,5 g LMP-Agarose auf 100 mL PBS gegeben wurde. So wurde die Agarose in der Mikrowelle zweimal aufgekocht. Die Agarose wurde dann zu je 120 µL in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Diese Gefäße mit Agarose konnte man für einige Monate bei 4° C im Kühlschrank aufbewahren. Wichtig hierbei ist, Unterschiede in der Agarose-Konzentration beispielsweise durch erneutes Aufkochen zu vermeiden, da dies sich auf die Strecke der Wanderung der DNA in der Elektrophorese auswirken könnte.

2.3.3 Probeneinbettung und Lyse

Für die Durchführung des Comet Assay lässt sich jede eukaryotische Zelle heranziehen (Tice et al., 2000). Hier verwendet wurden alle Blutzellen. An den Versuchstagen wurde den Probanden jeweils zu drei Messzeitpunkten eine 2,6 mL Li-Heparin Monovette Blut aus einer Venenverweilkanüle abgenommen und auf Eis gelagert. Das Blut wurde sofort und direkt vor Ort weiterverarbeitet.

Dazu wurden im Vorfeld die LMP-Agarosealiquote in einem Becherglas mit siedendem Wasser geschmolzen und bei 37° C in einem Heizblock warmgehalten. Außerdem wurde einige Stunden vorher in einer Plastikküvette eine frische Lyselösung aus gekühltem Lysepuffer, Triton X-100 und DMSO angesetzt und bei 4° C im Kühlschrank gelagert. Durch eine Temperatur von 4° C wird sichergestellt, dass die Agaroseschicht auf den Objektträgern später fest bleibt und sich nicht ablöst.

EDTA verhindert in dieser Lösung die Bildung von Endonukleasen, die zu künstlichem weiteren DNA-Abbau führen könnten (Hartmann et al., 2003). DMSO fängt Radikale ab, um so *in vitro* entstandene oxidative DNA-Schäden zu vermeiden, die durch das Eisen ausgelöst werden, das aus lysierten Erythrozyten freigesetzt wird (Tice et al, 2000). Triton X-100 wird eingesetzt für die Zelllyse (McKelvey-Martin et al., 1993). Durch 2,5 M Natriumchlorid werden Proteine wie z.B. Histone entfernt (Collins et al., 2008).

Aus den auf Eis gelagerten Monovetten wurden 10 µL Vollblut entnommen und in 120 µL Agarose pipettiert. Eine größere Menge an Material könnte bedeuten, dass sich unter dem Mikroskop sichtbare Comets überlappen und so möglicherweise die Auswertung erschwert wird. Mit einer 200 µL Pipette wurden Blut und Agarose resuspendiert, um eine gleichmäßige Vermischung von Blut und Agarose zu gewährleisten. Nun wurde das Gemisch auf einen der beschichteten Objektträger aufgetragen, mit einem Deckglas eingedeckt und für vier Minuten zum Aushärten in den Kühlschrank gelegt. Nach dem Aushärten der Agarose wurde das Deckglas wieder entfernt und der Objektträger in eine Küvette mit Lyselösung gestellt.

Dies wurde pro Proband jeweils für zwei Objektträger pro Messzeitpunkt durchgeführt. Die Durchführung bis zum Hineinstellen in die Lyselösung sollte nicht länger als 20 Minuten dauern, damit eine Reparatur der DNA-Schäden möglichst vermieden wird. Vor allem Einzelstrangbrüche könnten sonst von den zelleigenen Mechanismen in relativ kurzer Zeit repariert werden (Collins et al., 2008).

Die Objektträger standen über Nacht in der Lyselösung und am nächsten oder übernächsten Tag wurden die weiteren Arbeitsschritte durchgeführt.

2.3.4 Alkalidenaturierung und Elektrophorese

Nachdem die Objektträger aus der Lyselösung entnommen wurden, legte man sie mit der Gelschicht nach oben und der Beschriftung zur Kathode zeigend auf die Auflagefläche der Elektrophoresekammer. Nun wurde die Kammer mit alkalischem Elektrophoresepuffer befüllt, sodass die Objektträger etwa 2-3 mm hoch bedeckt wurden. Anschließend wurde die Kammer abgedeckt, um die Proben vor UV-Strahlung zu schützen und die Objektträger für 25 Minuten zur Alkalidenaturierung stehen gelassen, denn ab einem pH-Wert von 12 wird die DNA denaturiert und entwunden, da Wasserstoffbrücken getrennt

werden und ab einem pH > 12,3 werden weitere Resultate von DNA-Schäden, die nicht direkt als Strangbrüche auftreten, sogenannte alkalilabile Stellen, zu detektierbaren Einzelstrangbrüchen umgewandelt (Kohn K.W., 1991). Zu solchen alkalilabilen Stellen zählen z.B. apurinische Stellen, die ebenfalls durch DNA-Schäden induziert werden (Tice et al, 2000).

Anschließend wurde das Elektrophoreseprogramm gestartet mit 25 V und 300 mA für erneut 25 Minuten. Spannung und Stromstärke wurden mithilfe der Puffermenge eingestellt. Auch während dieses Schrittes wurde die Kammer gegen Licht abgedeckt. Durch Anlegen dieses elektrischen Feldes werden die negativ geladenen DNA-Strangbruchfragmente aus dem Kern und zum positiven Pol - der Anode - gezogen. Je kleiner ein Fragment ist, desto weiter wandert es im elektrischen Feld durch die Matrix der Agarose (Collins et al., 2008).

Nun wurden die Objektträger auf ein Abtropfgestell gelegt und dreimal für fünf Minuten mit einem Neutralisationspuffer inkubiert. Danach wurden sie in eine Küvette mit destilliertem Wasser getaucht und für weitere fünf Minuten in 98%igen Ethanol gestellt. Durch den Ethanol werden die Präparate dehydriert (Hartmann et al., 2003).

Zuletzt wurden die fertigen Objektträger dunkel in einer Schublade zum Trocknen ausgelegt. Die getrockneten Objektträger konnten bis zur Auswertung einige Monate gelagert werden.

2.3.5 Auswertung

Für die Auswertung wurden 50 µL Ethidiumbromid-Lösung auf den Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas eingedeckt. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA zwischen den Basenpaaren (Collins et al., 2008). Nun wurde die Probe bei 250-facher Vergrößerung über einen Anregungsfilter von 515-560 nm und einem Barrierefilter von 590 nm unter dem Fluoreszenzmikroskop angeschaut. Über eine Kamera ist das Programm Comet IV mit dem Mikroskop verbunden, in dem nun pro Objektträger 50 Zellen beurteilt wurden. Als Messgröße wurde das Tail Moment herangezogen. Die Abbildung 6 zeigt einige Beispiele für Zellen mit verschiedenen Werten für das Tail Moment und erläutert die Bedeutung der Werte.

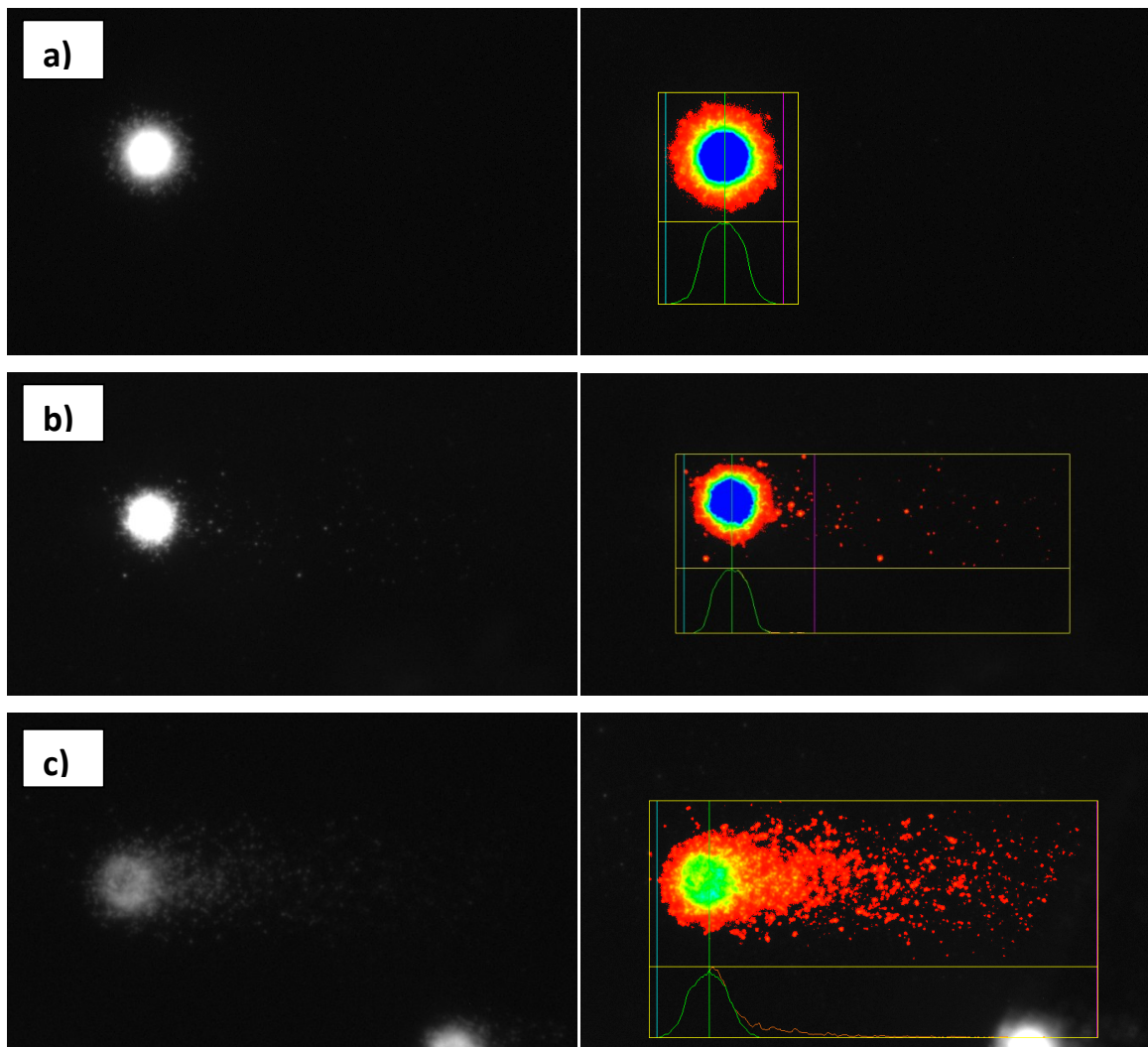


Abbildung 6 Messung des Tail Moment mithilfe des Programms Comet IV von Instem

In a) zeigt sich eine Zelle mit einem Tail Moment von 0,0. Bei dieser Zelle sind somit keine Strangbrüche nachzuweisen. In b) ist eine Zelle mit einem Tail Moment von 0,10 dargestellt. Die Zelle weist somit mäßig viele Fragmente auf. Es liegt also eine gewisse Menge an Strangbrüchen der DNA vor. In c) ist eine Zelle mit einem Tail Moment von 5,81 zu sehen. Im Kometenschweif dieser Zelle sind äußerst viele DNA-Fragmente nachzuweisen. Dies bedeutet, dass sehr viele Strangbrüche zu finden sind.

Sichtbar werden nun Abbildungen einzelner Zellen, die aufgrund ihres Aussehens ähnlich Kometen als "Comets" bezeichnet werden. Der Kopf des Kometen enthält die unbeschädigte DNA und der Kometenschweif stellt die Fragmente beschädigter DNA dar (Olive et al., 1994). Das Tail Moment ist das Produkt aus dem Verhältnis der Schweifintensität und der Verlagerung von Material aus dem Kopf relativ zum Zentrum des Kopfes. Parameter wie die Schweifintensität beruhen auf der Annahme, dass der Kopf symmetrisch ist und alle fluoreszierenden Teilchen außerhalb dessen zum Schweif gehören (McCarthy et al., 1997). Dabei wurde zusätzlich die "Yes or No"-Methode nach

Witte et al. (2014) zur Auswertung herangezogen. Demnach werden Zellen in zwei Kategorien - jene mit Zellschaden und jene ohne - eingeteilt, sodass die alleinige Bewertung der tatsächlich beschädigten Zellen eine größere Aussagekraft innerhalb der Menge an Zellschäden aufzeigt (Witte et al., 2014). Dabei wurde der Cut-off-Wert für das Tail Moment, unter welchem die Zelle als "nicht beschädigt" angesehen wird, auf $<0,1$ festgesetzt.

2.4 Statistik

Die Ergebnisse wurden mithilfe der Software SPSS Version 25 von IBM ausgewertet. Fehlten für die Rechnung relevante Daten in einem Fall, wurde dieser aus der Berechnung herausgenommen. Es wurden alle verwendeten Daten mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf das Vorliegen einer Normalverteilung getestet. Für normalverteilte Daten wurden parametrische Tests angewandt, lag keine Normalverteilung vor, wurden nicht-parametrische Tests gewählt. Dabei wurde gemäß der Fragestellungen jeweils zweiseitig getestet.

Für Varianzanalysen mit Messwiederholung in Intervallskala - wie es für die drei Messzeitpunkte des Comet Assay vorlag - wurde je nach Fragestellung eine einfaktorielle oder zweifaktorielle Analyse gewählt und zunächst der Mauchly-Test auf Sphärizität durchgeführt. Wurde die Annahme der Sphärizität verletzt, wurde die Korrektur von Greenhouse-Geisser angewandt. Das Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgelegt. Die Effektstärken f wurden aus dem partiellen η^2 berechnet. Ab $f > 0,25$ gilt eine mittlere Effektstärke und ab $f > 0,4$ eine starke Effektstärke.

Für Korrelationen wurde die Korrelation nach Pearson verwendet bei Daten in Intervallskala und unter Normalverteilung oder unter Annahme des zentralen Grenzwertsatzes. Trafen die Bestimmungen für die Korrelation nach Pearson nicht zu, wurde die Korrelation nach Spearman angewandt.

3 Ergebnisse

Zunächst werden einige soziodemographische und medizinische Merkmale zur Stichprobe beschrieben. Daraufgehend werden die Ergebnisse zu den Hypothesen der vorliegenden Arbeit gezeigt. Ergeben sich keine Stichprobengrößen von $n = 72$, hat ein Proband oder mehrere zu der vorliegenden Fragestellung in den Anamnesebögen oder Fragebögen keine Auskunft gemacht. Diese Wertepaare wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

3.1 Soziodemographische Merkmale

Die Tabelle 8 zeigt die soziodemographischen Merkmale zur Stichprobe. Die Stichprobe besteht mit 82% aus männlichen Soldaten während nur 15% der Probanden weiblich sind. Die Stichprobe hat ein Durchschnittsalter von 30 Jahren ($SD = 5,62$) mit einer Altersspanne von 21 bis 46 Jahren. Die Männer sind mit einem Durchschnittsalter von 31 Jahren etwas älter als die Frauen mit durchschnittlich 28 Jahren. Der Großteil der Probanden lebt in fester Partnerschaft oder in einer Ehe (67%). Beinahe die Hälfte der Stichprobe hat ein Abitur gemacht, der zweithäufigste Schulabschluss ist der Realschulabschluss.

Tabelle 8: Soziodemographische Merkmale ($n = 72$) (erhoben am Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von November 2017 bis Juni 2018 im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress))

n: Stichprobengröße

		n	%
Geschlecht	Männlich	59	81,9
	Weiblich	11	15,3
Familienstand	Ledig	20	28,6
	Feste Partnerschaft	27	38,6
	Verheiratet	21	30,0
	geschieden	2	2,9
Bildung	Hauptschulabschluss	8	11,3
	Realschulabschluss	27	38,0
	Abitur	35	49,3
	Sonderschule	1	1,4

Die Tabelle 9 zeigt Merkmale zur beruflichen Situation der Probanden innerhalb der Bundeswehr. Die meisten Probanden (85%) sind Soldaten auf Zeit. Im Mittel dienen die Probanden seit 9 Jahren der Bundeswehr und haben sich durchschnittlich für 15 Jahre verpflichtet. Der Anteil an Probanden, die bereits einen Auslandsaufenthalt in ihrem Lebenslauf zu verzeichnen haben, und der Anteil derer, die noch in keinem Auslandsaufenthalt eingesetzt wurden, sind in etwa ausgeglichen.

Tabelle 9: Berufliche Merkmale der Bundeswehrsoldaten (n = 72) (erhoben am Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von November 2017 bis Juni 2018 im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress))

n: Stichprobengröße

		n	%
Status	Berufssoldat	10	14,1
	Soldat auf Zeit	60	84,5
	Reservist	1	1,4
Bisherige Zeit bei der Bundeswehr (Jahre)	1 - 5	12	17,1
	6 - 10	39	55,7
	11 - 15	9	12,6
	16 - 30	10	13,9
Verpflichtungszeit (Jahre)	1 - 5	4	5,6
	6 - 10	7	9,7
	11 - 15	22	30,6
	15 - 20	21	29,2
	21 - 25	6	8,3
Bisheriger Auslandseinsatz	nein	34	49,3
	ja	35	50,7

3.2 Medizinische Merkmale insbesondere hinsichtlich des kardiovaskulären Risikos

In Tabelle 10 sind medizinische Merkmale der Stichprobe insbesondere hinsichtlich des kardiovaskulären Risikos dargestellt. Unter den Probanden sind 31% Raucher (SD = 0,47) und der überwiegende Anteil (70%) gibt an, gelegentlich Alkohol zu konsumieren. Die

Prävalenz kardiovaskulärer Risikofaktoren wie Hypertonie (6%), Diabetes (0%) oder Hypercholesterinämie (8%) ist in der vorliegenden Stichprobe gering ausgeprägt. Kardiovaskuläre Medikamente (z.B. Blutdrucksenker oder Statine) werden ebenfalls von wenigen eingenommen (1-2%). Zum Gesundheitsverhalten gibt ein sehr großer Anteil der Probanden an, täglich Obst und Gemüse zu konsumieren. Von den weiblichen Probandinnen verhütet beinahe die Hälfte hormonell mit der Pille. Nur eine Probandin gibt an, ein Antidepressivum einzunehmen (1%).

Tabelle 10: Medizinische Merkmale insbesondere hinsichtlich kardiovaskulärem Risiko
(n = 72) (erhoben am Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von November 2017 bis Juni 2018 im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress))

n: Stichprobengröße Pos. Positiv

		n	%
Raucher	ja	22	30,6
	nein	50	69,4
Alkohol	ja	50	69,4
	nein	22	30,6
Kardiovaskuläre Risikofaktoren	Hypertonie	4	5,6
	Diabetes	0	0,0
	Hypercholesterinämie	6	8,3
	Pos. Familienanamnese (Infarkt)	16	22,2
	(Davon: >1 Risikofaktor)	(2)	(2,8)
Kardiovaskuläre Medikation	Candesartan	1	1,4
	Ramipril	2	2,8
	Atorvastatin	2	2,8
	(Davon: >1 Medikament)	(1)	(1,4)
Psychiatrische Medikation	Sertralin	1	1,4
	(Davon ebenfalls kardiovaskuläre Medikation)	(0)	(0,0)
Hormone (Anteil innerhalb der Frauen)	Pille	5	45,5
	(Davon: Pille + Sertralin)	(1)	(9,9)
Gesundheitsverhalten	Regelmäßig Obst	59	81,9
	Regelmäßig Gemüse	66	91,7

3.3 DNA-Strangbrüche unter mentalem Stress während des TSST-G

Zur Überprüfung der Hypothese, dass unter akutem mentalem Stress die Menge an DNA-Strangbrüchen ansteigt, sowie der zweiten Hypothese, dass diese in einer anschließenden Ruhephase wieder auf ihr Ausgangsniveau abfällt, wurde zu drei Messzeitpunkten der Parameter Tail Moment im Comet Assay erhoben. In Tabelle 11 sind die Werte für die Anzahl der DNA-Strangbrüche zu den drei Messzeitpunkten vor dem Stresstest (VT), direkt nach dem Stresstest (NT) und nach anschließender Ruhephase (NR) aufgeführt.

Tabelle 11: DNA-Strangbrüche gemessen im Comet Assay (n = 72) (erhoben am Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von November 2017 bis Juni 2018 im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress))

n:	Stichprobengröße	VT:	Messzeitpunkt vor Stresstest
MW:	Mittelwert	NT:	Messzeitpunkt nach Stresstest
SD:	Standardabweichung	NR:	Messzeitpunkt nach Ruhephase
p:	Signifikanzwert (ANOVA mit Messwiederholung)	DNA:	Desoxyribonukleinsäure

VT		NT		NR		Effekt- stärke f	F-Test	p
MW	SD	MW	SD	MW	SD			
0,24	0,10	0,28	0,14	0,25	0,11	0,23	3,689	0,027

Es lässt sich eine signifikante Veränderung an der Menge an DNA-Schäden über die Zeit detektieren ($p = 0,027$). Das Tail Moment der Zeitpunkte VT zu NT, also die Menge an DNA-Schäden nach der mentalen Stressexposition im Vergleich zu davor steigt signifikant an ($p = 0,007$). Während der Ruhephase nach dem Stresstest, also vom Messzeitpunkt NT zum Zeitpunkt NR sinkt die Menge der DNA-Strangbrüche wieder ab ($p = 0,086$) und erreicht beinahe wieder den Mittelwert an DNA-Schäden des Messzeitpunktes VT. Somit bestätigt sich die Hypothese, dass DNA-Strangbrüche durch mentalen Stress ansteigen und sich in der Ruhepause wieder normalisieren.

3.4 Geschlechterspezifische Unterschiede in der Bildung von DNA-Schäden unter mentalem Stress

Desweiteren wurde die Hypothese aufgestellt, dass geschlechterspezifische Unterschiede bestehen bezüglich der Entstehung von DNA-Strangbrüchen unter mentalem Stress. Tabelle 12 zeigt die Werte für den Parameter Tail Moment in Abhängigkeit vom Geschlecht zu den jeweiligen Messzeitpunkten.

Tabelle 12: DNA-Strangbrüche gemessen im Comet Assay in Abhängigkeit vom Geschlecht (n = 72) (erhoben am Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von November 2017 bis Juni 2018 im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress))

n:	Stichprobengröße	ns:	Nicht signifikant
MW:	Mittelwert	VT:	Messzeitpunkt vor Stresstest
SD:	Standardabweichung	NT:	Messzeitpunkt nach Stresstest
p:	Signifikanzwert (ANOVA mit Messwiederholung)	NR:	Messzeitpunkt nach Ruhephase
M:	Männlich	DNA:	Desoxyribonukleinsäure
t:	Zeit	W:	weiblich
		G:	Gruppe

	VT		NT		NR		Effekt- stärke f	F-Test (t*G)	p		
	MW	SD	MW	SD	MW	SD			t	G	t*G
M	0,24	0,09	0,29	0,15	0,26	0,12	0,04	0,119	ns	ns	ns
W	0,23	0,11	0,26	0,07	0,22	0,10					

Es zeigen sich zu allen drei Zeitpunkten höhere Mittelwerte für das Tail Moment bei den Männern als bei den Frauen, jedoch ohne signifikante Unterschiede. Die Anzahl der männlichen Probanden ist in der Studie bedeutend größer (n = 59) als der Anteil an Frauen (n = 11). Die Hypothese kann hiermit also nicht bestätigt werden.

3.5 Einfluss des kardiovaskulären Risikos auf die Bildung von DNA-Schäden unter mentalem Stress

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Unterschiede bestehen in der Entstehung von DNA-Strangbrüchen unter mentalem Stress in Abhängigkeit vom kardiovaskulären Risikoprofil der Probanden. In Tabelle 13 sind die Werte für das Tail Moment in Abhängigkeit zu den zwei Probandengruppen PROCAM-positiv und PROCAM-negativ dargestellt. Da nicht alle Probanden hinsichtlich der Parameter zur Berechnung des PROCAM-Scores vollständige Angaben gemacht haben, wurden die folgenden Berechnungen mit einer Stichprobengröße von $n = 63$ durchgeführt.

Tabelle 13: DNA-Strangbrüche gemessen im Comet Assay in Abhängigkeit zum kardiovaskulären Risikoscore PROCAM ($n = 63$) (erhoben am Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von November 2017 bis Juni 2018 im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress))

n:	Stichprobengröße	ns:	Nicht signifikant
MW:	Mittelwert	VT:	Messzeitpunkt vor Stresstest
SD:	Standardabweichung	NT:	Messzeitpunkt nach Stresstest
p:	Signifikanzwert (ANOVA)	NR:	Messzeitpunkt nach Ruhephase
PROCAM:	Prospektive Cardiovascular Munster Study	t:	Zeit
DNA:	Desoxyribonukleinsäure	G:	Gruppe

	VT		NT		NR		Effekt- stärke f	F-Test (t*G)	p		
	MW	SD	MW	SD	MW	SD			t	G	t*G
PROCAM-positiv	0,25	0,12	0,34	0,20	0,24	0,10	0,25	3,900	0,008	ns	0,023
PROCAM-negativ	0,24	0,09	0,26	0,11	0,26	0,13					

Ein positiver PROCAM-Score ergibt sich für 20 Probanden, ein negativer Score für 43 Probanden. Wie in Tabelle 6 dargestellt, zeigt sich ein signifikanter Interaktionseffekt in der Menge an entstandenen DNA-Schäden zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,023$). In der Kontrastanalyse zeigt sich, dass die Werte der PROCAM-positiven Probanden von VT zu NT signifikant stärker ansteigen als bei der Gruppe PROCAM-negativ ($p = 0,031$). Während der Ruhephase zeigt die PROCAM-positive Gruppe ebenso einen stärkeren Abfall an DNA-Strangbrüchen als die PROCAM-negative Probandengruppe ($p = 0,016$). Somit bestätigen die Ergebnisse die Hypothese und geben den Hinweis auf einen

Zusammenhang zwischen dem kardiovaskulären Risikoprofil und der Entstehung von DNA-Strangbrüchen unter mentalem Stress.

Da insgesamt nur 11 der Probanden Frauen sind und keine der Frauen einen positiven PROCAM-Score aufweist, wurde nun noch einmal die Wechselwirkung zwischen Tail Moment und PROCAM-Score ausschließlich an den männlichen Probanden untersucht. Unter Ausschluss der weiblichen Probandinnen zeigt sich ein noch deutlicheres Ergebnis im Vergleich der Gruppen mit und ohne kardiovaskulärem Risikoprofil ($p = 0,015$). Dieses Ergebnis ist in Abbildung 7 graphisch dargestellt.

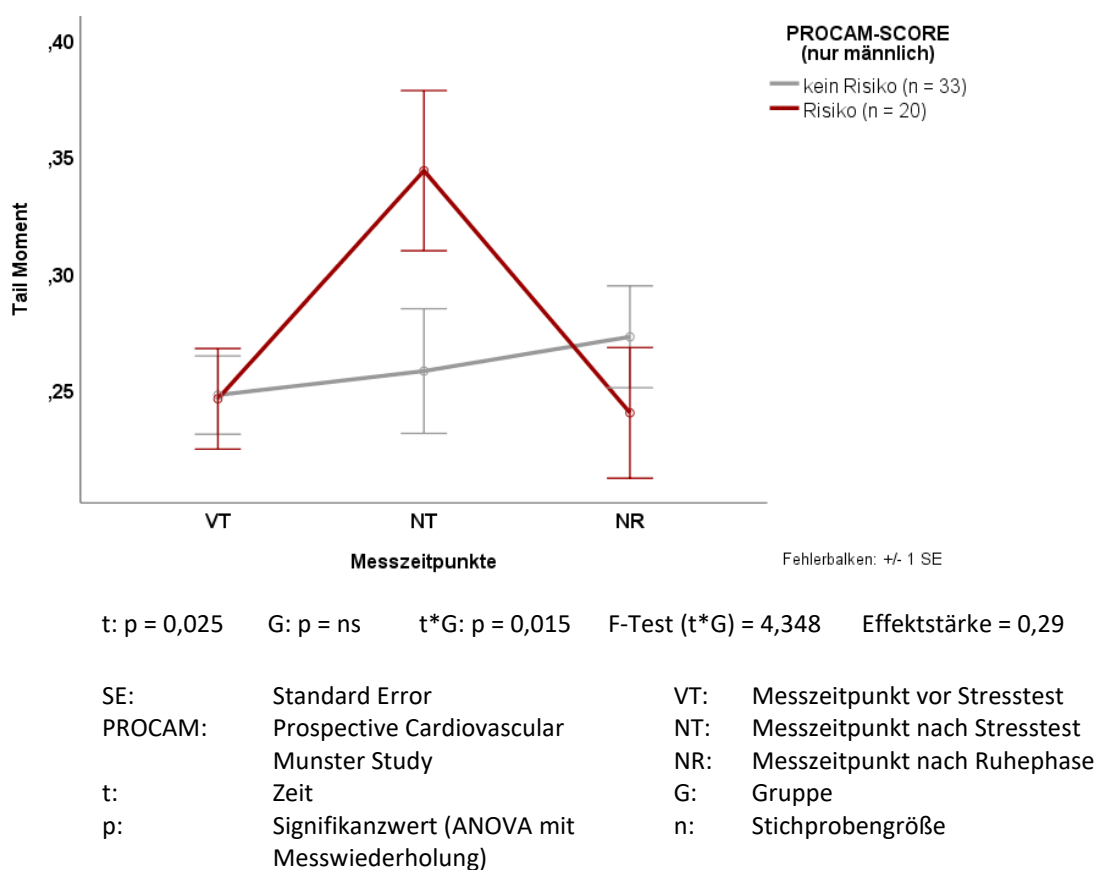


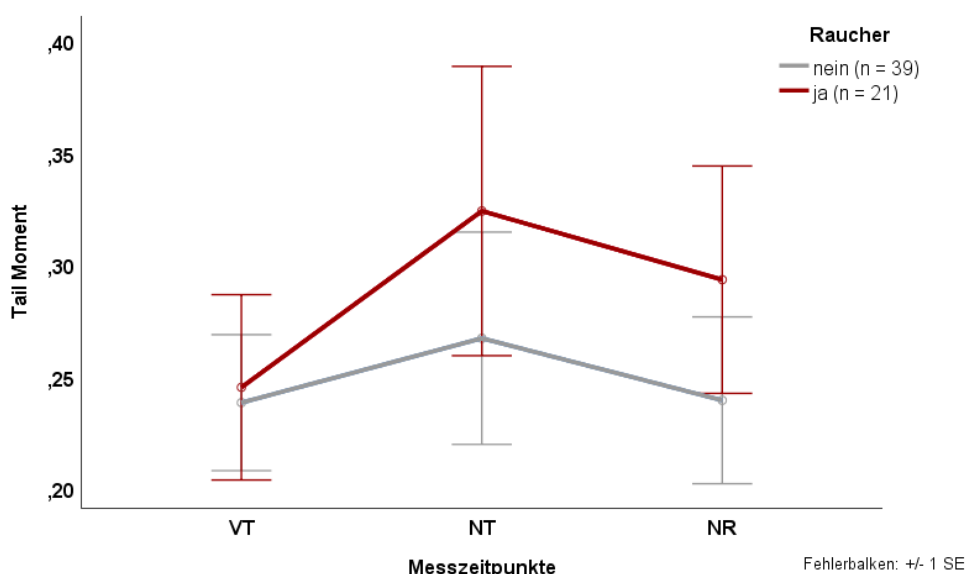
Abbildung 7 Das Tail Moment in Abhängigkeit vom kardiovaskulären Risikoprofil zu den jeweiligen Messzeitpunkten für die Gruppen PROCAM-positiv und PROCAM-negativ unter Ausschluss weiblicher Probanden (erhoben am Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von November 2017 bis Juni 2018 im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress))

In der Kontrastanalyse zeigt sich für den Zusammenhang vom Messzeitpunkt VT zu NT ($p = 0,029$) sowie für NT zu NR ($p = 0,013$) jeweils ein signifikanter Unterschied.

Im Folgenden werden die einzelnen Parameter des PROCAM-Score auf ihre Abhängigkeit zum Tail Moment untersucht. Dabei wurden weiterhin die weiblichen Probandinnen von der Auswertung ausgeschlossen. Der Parameter Diabetes wurde dabei weggelassen, da in der Stichprobe keine Probanden mit Diabetes vorlagen.

3.5.1 Einfluss der Parameter des PROCAM-Score - Rauchen

Gerade auch weil das Rauchen an sich ebenfalls ROS entstehen lassen kann, wurde die Hypothese aufgestellt, dass bei Rauchern mehr DNA-Schäden entstehen unter mentalem Stress als bei Nichtrauchern. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 graphisch dargestellt.



t: $p = 0,025$ G: $p = ns$ t*G: $p = ns$ F-Test (t*G) = 1,032 Effektstärke = 0,13

SE: Standard Error
 n: Stichprobengröße
 t: Zeit
 G: Gruppe
 ns: Nicht signifikant

VT: Messzeitpunkt vor Stresstest
 NT: Messzeitpunkt nach Stresstest
 NR: Messzeitpunkt nach Ruhephase
 p: Signifikanzwert (ANOVA mit Messwiederholung)

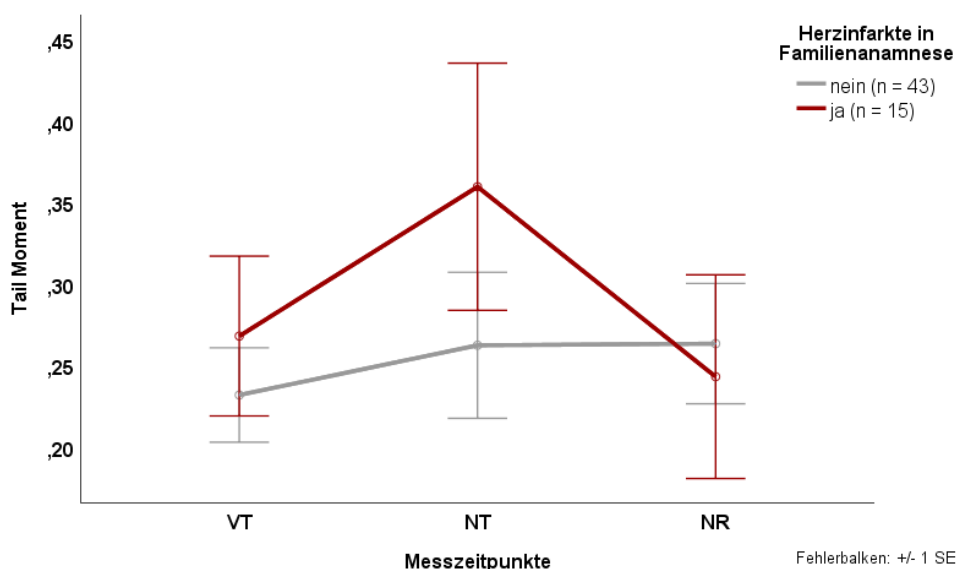
Abbildung 8 Das Tail Moment in Abhängigkeit zum Rauchen unter Ausschluss weiblicher Probanden (erhoben am Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von November 2017 bis Juni 2018 im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress))

Die Raucher weisen unter den Probanden unabhängig von anderen Faktoren höhere Mittelwerte für das Tail Moment auf. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Rauchen und dem Tail Moment konnte dabei nicht gezeigt werden. Die Hypothese bestätigt sich somit nicht.

3.5.2 Einfluss der Parameter des PROCAM-Score - positive

Familienanamnese

Hier lautet die Hypothese, dass unter mentalem Stress mehr DNA-Strangbrüche entstehen, wenn der Proband eine positive Familienanamnese bezüglich Herzinfarkten in der Verwandtschaft angibt. Die Ergebnisse hierzu sind in Abbildung 9 graphisch dargestellt.



t: $p = 0,008$ G: $p = \text{ns}$ t*G: $p = 0,027$ F-Test (t*G) = 3,738 Effektstärke = 0,26

SE: Standard Error
 n: Stichprobengröße
 t: Zeit
 G: Gruppe
 ns: Nicht signifikant

VT: Messzeitpunkt vor Stresstest
 NT: Messzeitpunkt nach Stresstest
 NR: Messzeitpunkt nach Ruhephase
 p: Signifikanzwert (ANOVA mit Messwiederholung)

Abbildung 9 Das Tail Moment in Abhängigkeit zur positiven Familienanamnese bezüglich Herzinfarkten unter Ausschluss weiblicher Probanden (erhoben am Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von November 2017 bis Juni 2018 im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und Stress))

Es zeigt sich ein Zusammenhang zwischen Infarkten in der Familie und dem Tail Moment. Probanden mit einer positiven Familienanamnese weisen mehr DNA-Schäden unter mentalem Stress auf ($p = 0,027$). Die Hypothese bestätigt sich damit. Dies zeigt sich in der Kontrastanalyse insbesondere für die Messzeitpunkte NT zu NR ($p = 0,015$), jedoch nicht von VT zu NT ($p = 0,143$).

3.5.3 Einfluss der Parameter des PROCAM-Score - LDL-, HDL-Cholesterin und Triglyceride

Zu den drei Parametern des PROCAM-Score zum Lipidprofil werden folgende Hypothesen anhand des allgemein bekannten Einflusses des jeweiligen Blutwertes auf das kardiovaskuläre Risiko erhoben: Je niedriger das HDL-Cholesterin ist, desto mehr DNA-Schäden entstehen unter Stress. Je höher hingegen die Werte für LDL-Cholesterin und die Triglyceride sind, desto mehr DNA-Schäden entstehen unter Stress. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 10 bis 12 graphisch dargestellt.

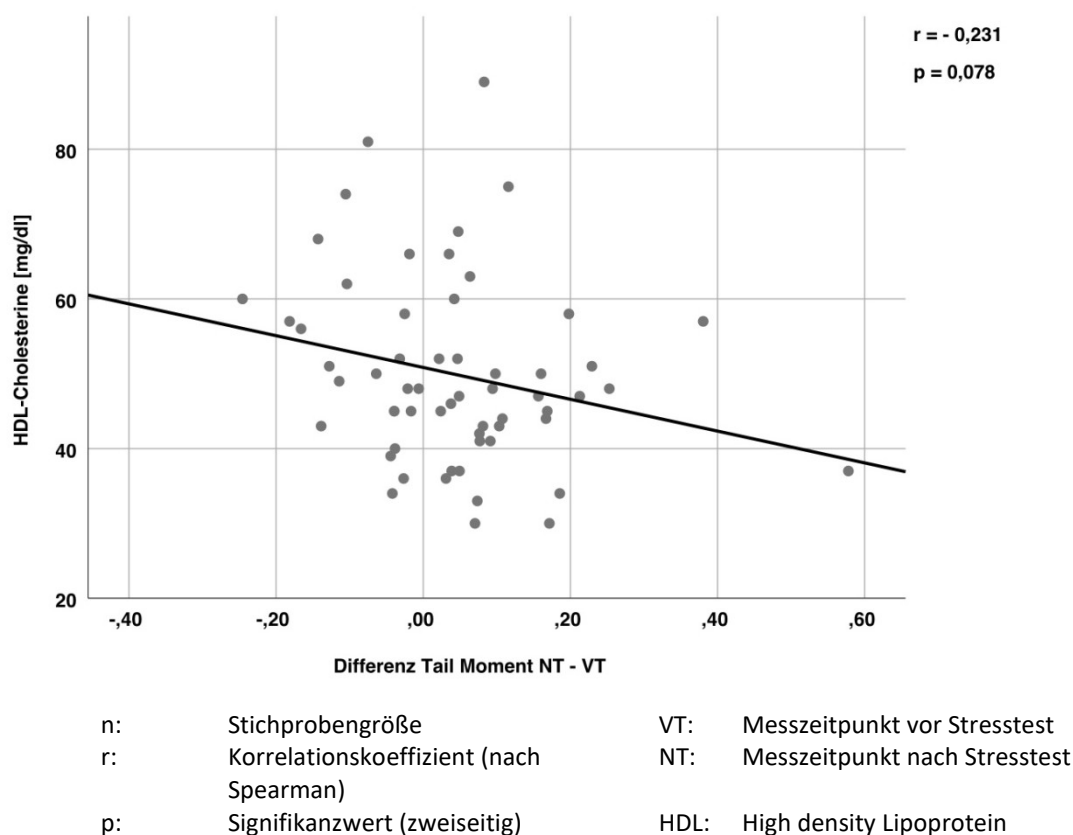


Abbildung 10 Der Anstieg des Tail Moment zwischen den Messzeitpunkten VT und NT in Abhängigkeit zum HDL-Cholesterin (n = 59, nur männliche Probanden) (erhoben am Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von November 2017 bis Juni 2018 im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress))

Die Messwerte für das HDL-Cholesterin korrelieren tendenziell negativ mit den DNA-Schäden (siehe Abbildung 10, zweiseitige Korrelation nach Spearman; n = 59; $r = -0,231$; $p = 0,078$). Die erste Hypothese, je geringer das HDL-Cholesterin, desto höher der DNA-Schaden unter mentalem Stress, trifft damit tendenziell zu.

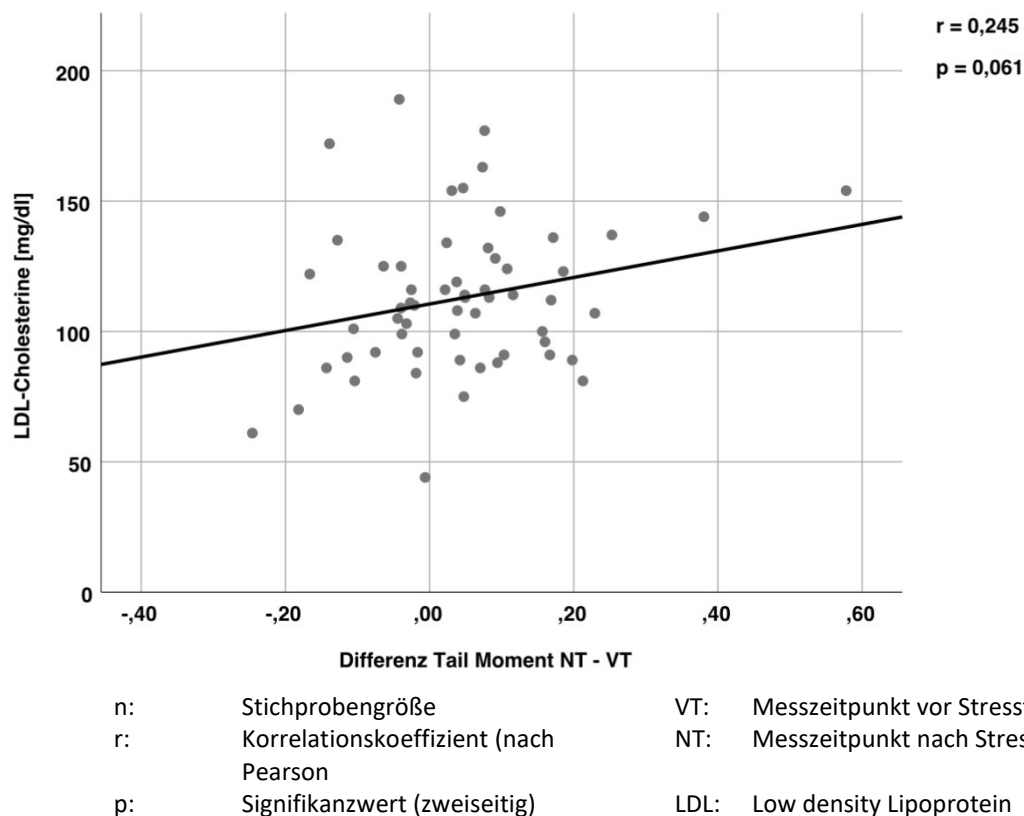


Abbildung 11 Der Anstieg des Tail Moment zwischen den Messzeitpunkten VT und NT in Abhängigkeit zum LDL-Cholesterin (n = 59, nur männliche Probanden)
(erhoben am Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von November 2017 bis Juni 2018 im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress))

Die Messwerte für das LDL-Cholesterin korrelieren tendenziell positiv mit den DNA-Schäden (siehe Abbildung 11, zweiseitige Korrelation nach Pearson; n = 59; $r = 0,245$; $p = 0,061$). Die zweite Hypothese, je höher das LDL-Cholesterin, desto höher der DNA-Schaden unter mentalem Stress, bestätigt sich somit ebenfalls tendenziell.

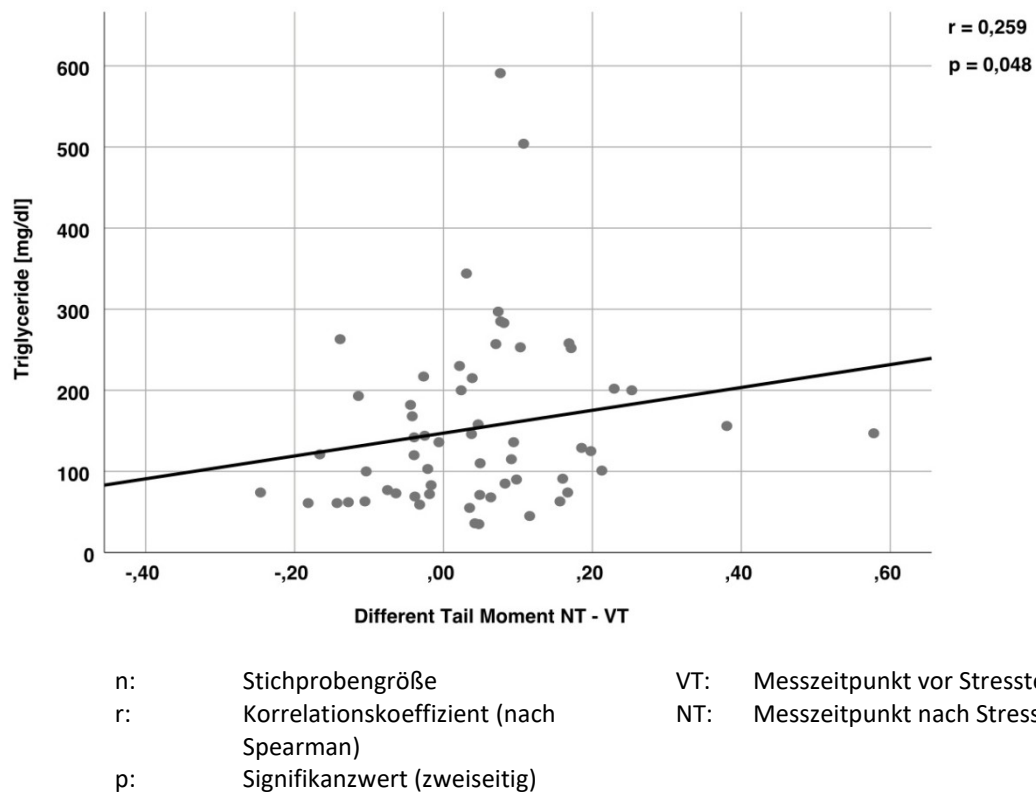


Abbildung 12 Der Anstieg des Tail Moment zwischen den Messzeitpunkten VT und NT in Abhängigkeit zu den Triglyceriden (n = 59, nur männliche Probanden) (erhoben am Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von November 2017 bis Juni 2018 im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress))

Zwischen den Messwerten für die Triglyceride und dem Tail Moment besteht ein signifikanter Zusammenhang (siehe Abbildung 12, zweiseitige Korrelation nach Spearman; n = 59; $r = 0,259$; $p = 0,048$). Die Anzahl an DNA-Schäden korreliert also positiv mit der gemessenen Menge an Triglyceriden im Blut.

3.5.4 Einfluss der Parameter des PROCAM-Score - Alter

Die Hypothese lautet, dass unter mentalem Stress mehr DNA-Strangbrüche entstehen, je älter der Proband ist. Die Abhängigkeit des Probandenalters zum Tail Moment zum Zeitpunkt NT im Vergleich zu VT wurden untersucht.

Es zeigt sich keine Korrelation zwischen dem Probandenalter und der Anzahl an DNA-Strangbrüchen unter mentalem Stress (zweiseitige Korrelation nach Pearson; n = 60; $r = 0,147$; $p = 0,262$). Die Hypothese bestätigt sich hiermit nicht.

3.5.5 Einfluss der Parameter des PROCAM-Score - systolischer Blutdruck

Die Hypothese lautet zu diesem Parameter, je höher der systolische Blutdruck des Probanden in Ruhe ist, desto mehr DNA-Schäden entstehen unter Stress. Auch hier wurde die Abhängigkeit des systolischen Blutdrucks zum Tail Moment zum Zeitpunkt NT im Vergleich zu VT untersucht.

Es zeigt sich auch zu diesem Parameter keine Korrelation zwischen dem systolischem Blutdruck und der Anzahl an DNA-Schäden (zweiseitige Korrelation nach Pearson; $n = 59$; $r = -0,086$; $p = 0,517$). Die Hypothese kann hier ebenso nicht bestätigt werden.

3.6 Zusammenhänge zwischen gemessenen DNA-Schäden und den Fragebögen

Zuletzt werden die Hypothesen aufgestellt, dass mehr DNA-Strangbrüche unter mentalem Stress entstehen, je höher der subjektiv erlebte Stress in den Fragebögen MDBF, STAI-S und PASA angegeben wird.

3.6.1 DNA-Schäden unter mentalem Stress in Abhängigkeit zum MDBF

Durch den mentalen Stress im TSST-G sollten sich die Probanden schlechter gestimmt, müder und unruhiger fühlen als zuvor. Tabelle 14 zeigt die Punktzahlen vor und nach TSST-G unabhängig vom Tail Moment jeweils für die drei Skalen Gute-/Schlechte Stimmung (GS), Wachheit/Müdigkeit (WM) und Ruhe/Unruhe (RU).

Tabelle 14: Punktzahlen im Fragebogen MDBF vor und nach Stresstest (erhoben am Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von November 2017 bis Juni 2018 im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress))

n:	Stichprobengröße	ns:	Nicht signifikant
MW:	Mittelwert	GS:	Skala Gute/Schlechte Laune
SD:	Standardabweichung	WM:	Skala Wach/Müde
p:	Signifikanzwert (ANOVA mit Messwiederholung)	RU:	Skala Ruhe/Unruhe
MZP:	Messzeitpunkt	MDBF:	Multidimensionaler Befindlichkeitsfragebogen
TSST-G:	Trierer Social Stress Test (Groups)		

Skala	n	MZP Vor TSST-G		MZP Nach TSST-G		Effektstärke f	F-Test	p
		MW	SD	MW	SD			
GS	70	17,21	2,00	14,97	3,07	0,78	42,412	<0,001
WM	70	13,01	3,09	12,56	3,31	0,17	2,089	ns
RU	71	16,04	2,47	14,45	3,34	0,45	14,159	< 0,001

Die Probanden sind signifikant schlechter gestimmt nach dem Stresstest im Gegensatz zu davor ($p < 0,001$). In der Müdigkeitsskala WM zeigt sich kein signifikanter Unterschied. In der Skala RU zeigen die Probanden einen signifikanten Unterschied hinsichtlich deutlich mehr Unruhe im Vergleich zu vor dem TSST-G ($p < 0,001$). Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich die Probanden nach dem Stresstest schlechter gestimmt, müder und unruhiger einschätzen als vor dem Test.

Die Hypothese lautet, je schlechter gelaunt, müder und unruhiger sich die Probanden fühlen aufgrund des TSST-G nach Angaben der Probanden im MDBF, desto mehr DNA-Schäden entstehen.

Zur Skala GS zeigt sich, dass die Differenzen der Punktzahlen in der Stimmungsskala des MDBF vor und nach dem TSST-G nicht mit dem Anstieg der DNA-Strangbrüche zwischen den Messzeitpunkten VT und NT korrelieren (zweiseitige Korrelation nach Pearson; $n = 70$; $r = -0,008$; $p = 0,949$).

Desweiteren ist festzustellen, dass die Differenzen der Punktzahlen in der Skala WM des MDBF vor und nach dem TSST-G ebenfalls nicht mit dem Anstieg der DNA-Strangbrüche zwischen den Messzeitpunkten VT und NT korrelieren (zweiseitige Korrelation nach Pearson; $n = 70$; $r = -0,145$; $p = 0,233$).

Es zeigt sich, dass auch die Differenzpunktzahlen in der Skala RU des MDBF vor und nach dem TSST-G nicht mit dem Anstieg der DNA-Strangbrüche zwischen den Messzeitpunkten VT und NT korrelieren (zweiseitige Korrelation nach Pearson; $n = 71$; $r = -0,023$; $p = 0,852$).

3.6.2 DNA-Schäden unter mentalem Stress in Abhängigkeit zum Fragebogen STAI-S

Außerdem untersucht wurden die Punktzahlen des Fragebogens für Zustandsangst, dem STAI-S. Unter mentalem Stress im TSST-G sollten die Probanden sich ängstlicher fühlen nach dem Stresstest als zuvor, die Punktzahlen im STAI-S sollten nach dem Stress also höher angegeben werden (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Punktzahlen im Fragebogen STAI-S vor und nach Stresstest (erhoben am Universitätsklinikum Ulm im Zeitraum von November 2017 bis Juni 2018 im Rahmen der Studie BEST (BundeswehrEinsatz und STress))

n:	Stichprobengröße	p:	Signifikanzwert (ANOVA mit Messwiederholung)
MW:	Mittelwert		
SD:	Standardabweichung	STAI-S:	State-Trade-Angstinventar -State-Angst
MZP:	Messzeitpunkt		
TSST-G:	Trierer Social Stress Test (Groups)		

	n	MZP Vor TSST-G		MZP Nach TSST-G		Effektstärke f	F-Test	p
		MW	SD	MW	SD			
STAI-S	72	25,50	6,31	39,89	9,12	0,50	17,898	< 0,001

Die durchschnittliche Punktzahl im STAI-S sinkt um 14,4 Punkte ab durch den TSST-G. Nach Stressexposition schätzen sich die Probanden signifikant ängstlicher in der Situation ein als zuvor ($p < 0,001$).

Überprüft wurde die Hypothese, dass mehr DNA-Strangbrüche entstehen zwischen den Messzeitpunkten VT zu NT, je weniger Punkte im STAI-S angegeben werden nach dem TSST-G im Vergleich zu davor. Dabei zeigt sich, dass die Differenzen der Punktzahlen des STAI-S vor und nach dem TSST-G nicht mit dem Anstieg der DNA-Strangbrüche zwischen den Messzeitpunkten VT und NT korrelieren (zweiseitige Korrelation nach Pearson; $n = 72$; $r = -0,033$; $p = 0,786$).

3.6.3 Stressindex des PASA im Zusammenhang zur Bildung von DNA-Schäden

Die letzte Hypothese besagt, dass mehr DNA-Schäden entstehen je größer der subjektiv empfundene Stress ist. Dazu wurde desweiteren der Zusammenhang des Stressindex des PASA Fragebogens mit dem Tail Moment untersucht.

Es konnte keine Korrelation zwischen dem Stressindex des PASA und der Anzahl an DNA-Strangbrüchen nachgewiesen werden (zweiseitige Korrelation nach Pearson; $n = 71$; $r = 0,084$; $p = 0,486$). Die Hypothese, dass es einen positiven Zusammenhang zwischen den Fragebögen PASA, MDBF und STAI-S zu der Anzahl an DNA-Schäden gibt, bestätigt sich somit nicht.

4 Diskussion

In dieser Arbeit zeigte sich, dass mentaler Stress, erzeugt durch den TSST-G, in der Lage ist, einen signifikanten Anstieg von DNA-Strangbrüchen hervorzurufen. Dieser Schaden normalisiert sich tendenziell nach einer anschließenden Ruhephase. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass diejenigen Soldaten und Soldatinnen vermehrt DNA-Strangbrüche unter Stress zeigen, die ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko nach dem PROCAM-Score aufweisen. Im Folgenden wird der Zusammenhang von DNA-Schäden und mentalem Stress dargestellt und die Methoden diskutiert sowie der Einfluss der Faktoren Geschlecht, kardiovaskuläres Risiko (PROCAM-Score) und subjektiv erlebter Stress betrachtet. Dabei werden die Parameter Rauchen, Blutdruck, Fettstoffwechsel, Alter und Familienanamnese des PROCAM-Score einzeln näher beleuchtet.

4.1 Strangbrüche in der DNA unter mentalem Stress

Direkt vergleichbare Studien, die den TSST-G nutzen und darunter das Ausmaß an DNA-Schäden mithilfe des Comet Assay untersuchen, finden sich in der Literatur derzeit nicht. Einige Studien zur Untersuchung des Zusammenhangs zu psychischem Stress und der Entstehung von DNA-Schäden liegen jedoch vor.

Sivonova und Kollegen (2004) untersuchten mithilfe des Comet Assay DNA-Schäden im Zusammenhang mit psychischem Stress durch Prüfungen (Sivonova et al., 2004). Die Studie untersuchte 15 gesunde Medizinstudenten im Durchschnittsalter von 22 Jahren am Tag eines Examens kurz vor Prüfungsbeginn im Vergleich zu einer Zeitspanne ohne Klausuren. Es konnte ein "Anstieg von DNA-Strangbrüchen von 128%" am Examenstag im Vergleich zur stressfreien Periode gefunden werden (Sivonova et al., 2004, S.186). Psychischer Stress führte in dieser Studie zum Anstieg von DNA-Schäden, jedoch wurde kein standardisierter Stresstest verwendet, wie er mit dem von uns verwendeten TSST vergleichbar wäre, und die Stichprobe von 15 Probanden war zudem relativ klein.

Hummel und Kollegen (2018) verwendeten den TSST, um einen Zusammenhang von zellulärem mit mentalem Stress näher zu untersuchen (Hummel et al., 2018). Die Probanden waren 20 gesunde männliche Sportstudenten. Als Maß zur Evaluation von zellulärem Stress wurde die Menge zirkulierender zellfreier DNA verwendet, die unter körperlicher Anstrengung um das Fünffache anstieg, unter mentalem Stress um das Zweifache (Hummel et al., 2018). Diese Ergebnisse bestätigen das Vorliegen von Stress

auf zellulärer Ebene, wenn mentaler Stress mittels TSST angewendet wird. Das Probandenkollektiv und die Methode zur Erzeugung reproduzierbaren mentalen Stresses sind mit unserer Studie vergleichbar, wenn auch eine kleinere Stichprobengröße untersucht wurde. Die Menge an zellfreier DNA sank 30 Minuten nach Beendigung des TSST auf den Ausgangswert ab (Hummel et al., 2018). Dies deckt sich ebenso mit unseren Befunden, dass sich der Anstieg von DNA-Schäden in anschließender Ruhepause wieder normalisiert.

In der Literatur finden sich weitere Studien, die den Zusammenhang von körperlichem Stress und DNA-Schäden mithilfe des Comet Assay untersucht haben. Mastaloudis und Kollegen (2004) führten den Comet Assay an 21 Marathonläufern zu den Zeitpunkten vor dem Lauf, währenddessen und zwei Stunden danach durch (Mastaloudis et al., 2004). Sie nutzten ebenfalls das Tail Moment zur Auswertung, zählten allerdings den Anteil geschädigter Zellen über einem festgelegten Grenzwert. So konnte ein prozentualer Anteil an geschädigten Zellen im Vergleich zum Zeitpunkt vor dem Lauf errechnet werden. Die Studie konnte zeigen, dass während des Marathonlaufs der Anteil an Zellen mit geschädigter DNA um 10 % anstieg und zwei Stunden nach dem Lauf der Anteil auf 2% im Vergleich zu vor dem Lauf zurückging (Mastaloudis et al., 2004). Auch physischer Stress ist somit in der Lage, kurzfristig DNA-Schäden hervorzurufen, die sich innerhalb weniger Stunden wieder normalisiert haben, auch wenn in der Studie die Zahlenwerte durch verschiedene Auswertungsmethoden nicht direkt vergleichbar sind mit unserer Studie. Ergänzend hierzu kann eine Studie von Hartmann und Kollegen (1995) angeführt werden, die ebenfalls DNA-Schäden vor, während und nach körperlicher Belastung mittels Comet Assay untersuchte. In der Studie liefen drei Probanden bei maximaler Belastung auf einem Ergometer (Hartmann et al., 1995). Die beschriebenen Werte werden in der Studie ebenfalls mit dem Tail Moment angegeben. Es konnte ein Anstieg des Tail Moment während der Belastung von 0,3 bis maximal 0,9 im Vergleich zum Ruhewert detektiert werden (Hartmann et al., 1995). In unserer Studie zeigte sich unter mentalem Stress ein durchschnittlicher Anstieg von 0,04 im Tail Moment. Durch körperlichen Stress scheint somit eine größere Menge an DNA-Schäden zu entstehen als durch mentalen Stress.

Eine weitere Studie von Banerjee und Kollegen (2007) untersuchte strahleninduzierte DNA-Schäden in der Krebstherapie im Zusammenhang mit mentalem Stress (Banerjee et al., 2007). Es wurden 58 Brustkrebspatientinnen während einer Strahlentherapie

untersucht, die in eine Yogagruppe zur Stressreduktion und eine Kontrollgruppe eingeteilt wurden (Banerjee et al., 2007). Durch psychologische Fragebögen bestätigte die Studie, dass sich nur die Yogagruppe nach der Strahlentherapie deutlich weniger gestresst fühlte als zu Therapiebeginn (Banerjee et al., 2007). Sie zeigten auch, dass die Anzahl an DNA-Schäden durch die Bestrahlung in beiden Gruppen stark anstieg, in der Yogagruppe allerdings um 15% weniger. Hier stellt sich der Zusammenhang dar von mentalem Stress und Stress durch Krankheit und Strahlentherapie auf DNA-Schäden, und dass unter stärkerem mentalem Stress mehr DNA-Strangbrüche entstehen, analog zu den Ergebnissen unserer Studie.

Zusammenfassend kann kurzfristiger mentaler Stress DNA-Schäden durch ROS bewirken. Im Hinblick auf die vielfältigen Schädigungsmechanismen von ROS und der Bedeutung von DNA-Schäden für die Entstehung von kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen sowie Krebserkrankungen, zeigt sich eine hohe medizinische Relevanz in der Vermeidung DNA-schädigender Einflüsse. Die hier vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass auch mentaler Stress ein wichtiger Faktor für eine solche Schädigung der DNA sein kann.

4.2 Geschlechterspezifische Unterschiede

Es konnte in unserer Studie kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Menge an DNA-Schäden in Reaktion auf akuten mentalen Stress gezeigt werden. Aktuell lassen sich in der Literatur wenige, uneinheitliche Ergebnisse dazu finden, ob geschlechterspezifische Unterschiede im Auftreten von DNA-Schäden und deren Reparatur bestehen.

Die Geschlechtshormone Östrogen und Testosteron greifen in den Regelkreis der HPA-Achse ein. Hohe Östrogenlevel bewirken eine verstärkte Reaktion der HPA-Achse und Testosteron eine abgeschwächte Reaktion (Speert et al., 2002; Lund et al., 2004). Außerdem sollen weibliche Geschlechtshormone für ein abgeschwächtes negatives Feedback im Regelkreis der HPA-Achse verantwortlich sein. Bei Männern und Frauen variieren zudem regulatorische Bindeproteine wie das CRH-binding proteine (CRH-BP), das die HPA-Achse bremst, sowie das corticosteroid binding globulin (CBG), welche beide bei Frauen mehr als bei Männern exprimiert werden (Weiser & Handa, 2009; Gala & Westphal, 1965). Zusammengefasst bewirkt bei Frauen Östrogen somit einerseits eine verstärkte Stressreaktion sowie schwächeres negatives Feedback der HPA-Achse,

andererseits exprimieren Frauen mehr herunterregulierende Bindeproteine. Bei Frauen beeinflussen außerdem mehr Faktoren den Hormonhaushalt, da Frauen einen Hormonzyklus haben oder auch orale Kontrazeptiva einnehmen können. Gestagene wie Progesteron bewirken eine abgeschwächte Stressreaktion im Gegensatz zur Verstärkung der Reaktion durch Östrogen und folglich weisen Frauen mit oralen Kontrazeptiva verringerte Werte einiger Stresshormone auf (Allen et al., 2016).

Auch für den TSST sind in der Literatur geschlechterspezifische Unterschiede zu finden. Die Kortisolspiegel erreichen durch den TSST höhere Werte bei Männern und Frauen sind häufiger non-responder als Männer (Herbison et al., 2016). Betrachtet man Studien, die Ergebnisse aus dem Comet Assay auf Geschlechterunterschiede untersuchten, findet sich uneinheitliche Literatur. Heuser und Kollegen (2008) untersuchten mithilfe des Comet Assay an Mäusen, ob männliche und weibliche Tiere generell unterschiedliche Mengen an DNA-Strangbrüchen aufweisen (Heuser et al., 2008). In ihren Versuchen zeigten sich für die Geschlechter keine Unterschiede (Heuser et al., 2008). Pool-Zobel und Kollegen untersuchten die Anzahl an DNA-Schäden in Zellen aus dem Rektum mittels Comet Assay im Hinblick auf Geschlechterunterschiede (Pool-Zobel et al., 2004). Hier zeigte sich, dass bei Proben von Frauen bedeutend weniger DNA-Schäden gefunden werden konnten als bei Männern (Pool-Zobel et al., 2004). Allerdings verwendeten Pool-Zobel und Kollegen nur eine Stichprobengröße von $n = 9$, von denen nur drei der Proben von Männern stammten.

In unserer Studie fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich des Geschlechts. Einerseits könnte die Aussagekraft abgeschwächt sein durch die Stichprobengröße, da Frauen mit nur 15% Anteil in diesem Probandenkollektiv eher unterrepräsentiert waren. Andererseits stellt sich die Frage, ob Frauen, die der Bundeswehr angehören, bereits andere Voraussetzungen für Stresstoleranz und bestimmte Persönlichkeitsmerkmale mitbringen, wenn sie sich für eine Bundeswehr-Karriere entscheiden als der Bevölkerungsdurchschnitt an Frauen.

4.3 DNA-Schäden und kardiovaskuläres Risiko

Es konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden in der Menge an DNA-Schäden durch den TSST-G in Bezug auf das kardiovaskuläre Risiko, das in dieser Arbeit mit dem PROCAM-Score erfasst wurde. Unter Ausschluss weiblicher Probandinnen, die

alle einen negativen PROCAM-Score aufwiesen, zeigte sich der Unterschied noch deutlicher. Eine Studie von Demirbag und Kollegen (2005) untersuchte ebenfalls mithilfe des Comet Assay, aber unabhängig von mentalem Stress, die Anzahl an DNA-Strangbrüchen in Patienten mit KHK im Vergleich zu gesunden Personen (Demirbag et al., 2005). Auch hier wurde allerdings eine andere Auswertung der Objektträger im Comet Assay vorgenommen als über das Tail Moment. Nach Demirbag und Kollegen (2005) stieg die Anzahl an DNA-Strangbrüchen signifikant mit der Schwere der KHK (Demirbag et al., 2005).

Im Folgenden werden die Untersuchungen zu den einzelnen Parametern des PROCAM-Score auf ihren jeweils eigenen Einfluss auf die Bildung von DNA-Strangbrüchen betrachtet.

Rauchen

Zum Parameter Rauchen des PROCAM-Score wurde untersucht, ob bei Rauchern mehr DNA-Strangbrüche unter mentalem Stress entstehen. Ein Zusammenhang zwischen Rauchverhalten und DNA-Schäden konnte in unserer Studie nicht festgestellt werden. Die Raucher zeigten lediglich etwas höhere Mittelwerte zu allen drei Messzeitpunkten. Die gesundheitsschädliche Wirkung des Zigarettenrauchs auf das kardiovaskuläre System ist allgemein bekannt. Außerdem ist Rauchen einer der wichtigsten Faktoren bei der Entstehung von DNA-Schäden durch oxidativen Stress (Cao et al., 2016). Da die Probanden angehalten wurden, vor dem TSST-G nicht zu rauchen, kann keine Aussage über die kurzfristigen Effekte von Nikotin auf DNA-Schäden aus unseren Daten getroffen werden. Die Studie von Demirbag und Kollegen (2005) konnte hingegen eine positive Korrelation von Rauchen und DNA-Schäden zeigen (Demirbag et al., 2005).

Positive Familienanamnese

Als weiterer Parameter wurde die Familienanamnese hinsichtlich Herzinfarkten der Väter, Mütter und naher Verwandter der Probanden untersucht. Die Probanden gaben in Fragebögen an, ob in ihrer Familie Herzinfarkte vorgekommen seien. Es konnte auf Grundlage dieser Angaben ein relevanter Zusammenhang zwischen positiver Familienanamnese und der Anzahl an DNA-Strangbrüchen festgestellt werden. Aufgrund des recht jungen Alters der Probanden, gaben davon nur wenige Herzinfarkte bei den

Eltern an (6% gaben Infarkte ihrer Väter an, 1% einen Herzinfarkt der Mutter), sondern vor allen bei weiteren Verwandten wie den Großeltern (18%). Insgesamt ist die Gruppe der Probanden mit positiver Familienanamnese mit 22% deutlich kleiner als die Gruppe ohne. In der Studie von Demirbag et al. (2005) konnte im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit kein Zusammenhang zwischen DNA-Schäden und Familienanamnese gezeigt werden (Demirbag et al., 2005).

Alter

Für den Parameter Alter konnte keine positive Korrelation mit dem Anstieg an DNA-Schäden gezeigt werden. Dabei ist das Alter ein Parameter im PROCAM-Score, für welchen bis zum Maximalalter unseres Probandenkollektivs durchaus viele Punkte vergeben werden können.

Es ist ausreichend gezeigt, dass das Alter einen Einfluss ausübt auf den TSST sowie auf die Stressreaktion, indem mit zunehmendem Alter mehr DNA-Schäden hervorgerufen werden unter mentalem Stress. Ältere Menschen zeigen im TSST eine stärkere Ausschüttung von Kortisol und eine höhere Aktivität der HPA-Achse als jüngere (Hidalgo et al., 2015). Auch findet man in der Literatur Hinweise, dass die vermehrte Entstehung von ROS durch oxidativen Stress eine mögliche Erklärung für den Alterungsprozess des Körpers darstellt (Soares et al., 2015). In der Studie von Soares und Kollegen (2015) beobachtete man signifikant mehr DNA-Strangbrüche bei älteren Menschen als bei jüngeren. Allerdings definierte die Studie die Gruppe der älteren Menschen mit älter als 65 Jahren. Die Stichprobe der vorliegenden Arbeit enthielt einen viel jüngeren Altersdurchschnitt und ein Höchstalter von 46 Jahren. In der Studie von Demirbag und Kollegen (2005) konnte sich analog zu unserer Studie keine positive Korrelation zwischen der Anzahl an DNA-Schäden und dem Alter herstellen lassen (Demirbag et al., 2005). Hier waren die Probanden mit durchschnittlich 57 Jahren zwar älter als in unserer Studie, aber weiterhin größtenteils jünger als 65 Jahre.

Zusammenfassend scheint der Parameter Alter in unseren Befunden einen geringeren Einfluss zu haben auf den Zusammenhang zwischen DNA-Schäden und positivem PROCAM-Score als beispielsweise der Parameter Familienanamnese. Dies könnte möglicherweise damit zu erklären sein, dass die vorliegende Stichprobe viele sehr junge Probanden und einen jungen Altersdurchschnitt aufzeigt.

Blutdruck

Als weiterer Parameter des PROCAM-Score wurde der systolische Blutdruck in Ruhe untersucht. Der Blutdruck korrelierte in der vorliegenden Arbeit nicht mit der Anzahl an DNA-Schäden. Dass ein erhöhter Blutdruck als wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor gilt, ist allgemein bekannt. Außerdem spielt oxidativer Stress nach Hinweisen der Literatur eine wichtige Rolle in der Pathogenese arterieller Hypertonie (Korsager & Matchkov, 2016). Trotzdem zeigt der systolische Blutdruck in unseren Ergebnissen keinen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen PROCAM-Score und DNA-Schäden. Dies könnte auch dadurch erklärbar sein, dass nur wenige Probanden mit einer Hypertonie an der Studie teilnahmen (nach Selbstauskunft der Probanden 6%). Die in der Studie gemessenen systolischen Werte in Ruhe ergaben nach der Definition der Hypertonie bei 15% einen Wert, der als hypertont gilt. Dabei lassen sich bis auf eine Ausnahme die Werte als Hypertonie 1. Grades einstufen. Nur bei einem Probanden wurde ein Blutdruckwert gemessen, der als Hypertonie 2. Grades einzustufen ist. Dabei sollte auch berücksichtigt werden, dass das Blutdruckmessen an sich sowie die Situation, an der Studie teilzunehmen, zu höheren Blutdruckwerten führen kann als sie in gewöhnlichen Situationen bei den Probanden zu messen wären. Dadurch erklärt sich möglicherweise auch, warum bei fast 10% mehr der Probanden erhöhte Blutdruckwerte gemessen wurden, als eine bekannte Hypertonie anamnestisch angegeben wurde. Außerdem nahmen drei der vier Hypertoniker der Stichprobe regelmäßig Antihypertensiva ein, sodass hier die therapeutische Korrektur der Blutdruckwerte bei diesen Probanden ebenfalls zu geringeren Blutdruckwerten geführt haben sollte als es ohne Medikation der Fall gewesen wäre. Die Studie von Demirbag und Kollegen (2005) zeigte ähnlich wie unsere Studie keinen Zusammenhang von Anzahl an DNA-Schäden und dem Blutdruck (Demirbag et al., 2005).

Fettstoffwechsel

Als ungünstiges Lipidprofil hinsichtlich des kardiovaskulären Risikos gilt ein zu niedriges HDL-Cholesterin, ein zu hohes LDL-Cholesterin und zu hohe Triglyceride. Diese drei Blutwerte fließen in den PROCAM-Score als drei eigenständige Parameter ein und wurden somit einzeln auf ihren Zusammenhang zur Entstehung von DNA-Strangbrüchen untersucht. Dabei kann der Parameter LDL-Cholesterin mit hohen Punktwerten bis zu 20

Punkten in den PROCAM-Score einfließen, während für die Werte der Triglyceride maximal 4 Punkte vergeben werden können.

Das HDL-Cholesterin korrelierte tendenziell negativ mit den DNA-Schäden. Für das LDL-Cholesterin zeigte sich eine tendenziell positive Korrelation mit der Anzahl an DNA-Schäden. Bei den Triglyceriden konnte keine signifikant positive Korrelation zu den DNA-Schäden festgestellt werden. In unserer Studie zeigt sich für die Blutfettwerte somit ein etwas größerer Einfluss auf die DNA-Schäden als beispielsweise für die Parameter Alter und Blutdruck.

Den Zusammenhang zwischen akutem mentalen Stress und reaktiv erhöhten Cholesterinwerten zeigten bereits andere Studien auf (unter anderem Muldoon et al., 1992). Schon kurze Momente mentalen Stresses scheinen sich demnach ungünstig auf das Lipidprofil auszuwirken. In Hinblick auf den Zusammenhang zu DNA-Schäden ist die Studie von de Sousa und Kollegen (2017) zu nennen. Sie untersuchten die Instabilität der DNA ebenfalls mithilfe des Comet Assay in Mäusen mit Hyperlipidämie. Sie konnten ähnlich den Ergebnissen dieser Arbeit zeigen, dass ein ungünstiges Lipidprofil mit einer erhöhten Anzahl an DNA-Strangbrüchen einhergeht (de Sousa et al., 2017). Auch in der Studie von Demirbag und Kollegen (2005) zeigte sich analog zu unseren Ergebnissen ein signifikanter Zusammenhang zwischen Hyperlipidämie und Anzahl an DNA-Schäden (Demirbag et al., 2005).

Insgesamt lässt sich erkennen, welche Parameter im vorliegenden Zusammenhang von DNA-Schäden und PROCAM-Score eine größere Rolle spielen (Lipidprofil und positive Familienanamnese) und welche anderen Parameter in einer eher untergeordneten Rolle zu dem Ergebnis beitragen (Rauchen, Alter und systolischer Blutdruck). Der PROCAM-Parameter Diabetes konnte nicht untersucht werden, da die Stichprobe keine Probanden mit einem Diabetes aufweist. Für die Parameter, die einen geringeren Einfluss zum Gesamtergebnis beizutragen scheinen, liegt mitunter eine geringe Prävalenz hinsichtlich des betreffenden Parameters in der Stichprobe vor. Hypertonie und höheres Alter weisen nur sehr wenige der Probanden der Studie auf, sodass der geringere Einfluss des Parameters hierdurch zu erklären sein könnte. Keiner der einzelnen Parameter zeigte jedoch einen gleichwertigen oder höheren Signifikanzwert als das Gesamtergebnis des Zusammenhangs der DNA-Schäden mit dem PROCAM-Score, v.a. unter Ausschluss

weiblicher Probandinnen. Dies spricht für die hohe Aussagekraft des Scores in diesem Zusammenhang. Erst die Betrachtung aller Risikoparameter zusammen zeigt den stärksten Zusammenhang mit DNA-Strangbrüchen unter mentalem Stress.

4.4 Zusammenhang des subjektiv erlebten Stresses mit DNA-Schäden

Es konnte kein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden zwischen dem subjektiven Stresserleben während des Stresstests gemessen am Stressindex des Fragebogens PASA sowie der Fragebögen MDBF und STAI-S zu der Menge an DNA-Strangbrüchen. Allerdings konnten die Fragebögen MDBF und STAI-S bestätigen, dass der TSST-G erfolgreich mentalen Stress bei den Probanden hervorrufen konnte.

Es findet sich derzeit noch wenig Literatur zu Zusammenhängen von subjektiv erlebtem Stress und kardiovaskulärem Risiko bzw. der Bildung von DNA-Schäden unter Stress. Ein Beispiel für bisherige Vergleiche des PASA Stressindex mit biologischen Markern für mentalen Stress zeigt die Studie von Wirtz und Kollegen (2007), die den TSST anwendete. Sie zeigte, dass ein höherer Stressindex im PASA mit höheren Werten für proinflammatorische Zytokine einhergeht, welche an Entzündungsprozessen beteiligt sind (Wirtz et al., 2007). Eine weitere Studie von Het und Kollegen (2009) untersuchte den Stressindex des PASA und Kortisolwerte einmal im klassischen TSST und einmal in einer Placebo-Variante des TSST, die keinen Stress induzieren soll. Die Placebo-Variante zeigte eine geringere empfundene Bedrohung im PASA und geringere Kortisolwerte als der klassische TSST (Het et al., 2009). Hier korrelierte somit der Stressindex des PASA mit den Kortisolwerten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bereits Studien zu einigen anderen biologischen Stressparametern einen Zusammenhang zum subjektiv erlebten Stress beschreiben konnten, jedoch bisher diesbezüglich keine Untersuchungen zu DNA-Schäden vorliegen.

4.5 Eignung der Methodik und Limitationen im Versuchsablauf

4.5.1 Eignung und Limitationen des Comet Assay

Der Comet Assay nutzt als Maß die allgemeine Menge an Strangbrüchen in der DNA. Er findet in zahlreichen Studien Verwendung und wird bereits seit mehreren Jahrzehnten als sehr sensitive Methode zur Messung von DNA-Schäden betrachtet (Collins et al., 2008). Schäden an der DNA können jedoch auch zur gleichen Zeit vielfältige Ursachen haben, die nicht ausschließlich auf oxidativen Stress zurückzuführen sind. Auch die Entstehung von ROS im Versuchssetting kann durch andere Mechanismen beeinflusst werden als nur durch den mentalen Stress. Im Folgenden werden verschiedene Einflussfaktoren auf die Ergebnisse des Comet Assay diskutiert.

Spontane DNA-Strangbrüche kommen in den Zellen kontinuierlich zustande durch physiologische Prozesse wie der Replikation von DNA oder während der Meiose (Whitaker, S.J., 1992). Auch Umwelteinflüsse können DNA-Strangbrüche evozieren, darunter bspw. radioaktive Strahlung, Schwermetalle oder UV-Strahlung (Powell & McMillan, 1990; Cadet & Douki, 2018). Der Einfluss von UV-Strahlung wurde im Versuchsablauf so gering wie möglich gehalten durch regelmäßiges Abdecken der Versuchssubstanz gegen Tageslicht, doch während der Bearbeitung ließ sich ein gewisses Maß an Lichteinfall nicht verhindern.

Auch *in vitro* funktionieren die Reparaturmechanismen für DNA-Schäden (Hansson et al., 1991). Hier wurde im Protokoll für den Comet Assay festgelegt, dass die Bearbeitung der Blutproben bis zum Einbringen in die gekühlte Lyselösung, nicht mehr als 20 Minuten dauern durfte, um die Zeit für die Reparaturmechanismen zu minimieren bzw. für alle Proben vergleichbar zu halten. Die Bearbeitungszeiten variierten um wenige Minuten, da im Rahmen des TSST-G drei bis sechs Probanden gleichzeitig teilnahmen. Die Blutproben wurden nacheinander abgenommen sowie bearbeitet. Hier besteht somit ein Unterschied einiger Minuten für die Dauer der Bearbeitung je nach Probandennummer und Probandenzahl des Versuchstages. In diesem Zusammenhang wäre es interessant, weiterführend Zeitunterschiede zu untersuchen.

Ebenso der Konsum von Alkohol und Zigaretten sowie der Gebrauch von Medikamenten kann ein höheres Maß an ROS hervorrufen (Pisoschi & Pop, 2015). Das Probandenkollektiv weist einen Raucheranteil von 31% auf und von 70% der Probanden wird angegeben, gelegentlich Alkohol zu konsumieren. Die Studienkohorte enthält damit

einen für die Gesamtbevölkerung repräsentativen Raucheranteil (Piontek et al., 2016). Um den Einfluss dieser Faktoren möglichst zu minimieren, wurden die Probanden gebeten, direkt vor dem Versuchsbeginn nicht zu rauchen, 24 Stunden vor dem Versuch keinen Kaffee zu trinken, keinen Alkohol zu konsumieren und keine Medikamente einzunehmen.

Desweiteren erzeugen körperliche Anstrengungen wie Sport vermehrt oxidativen Stress (Slattery et al., 2015). Daher wurden die Probanden gebeten, zur Anreise möglichst keine übermäßige körperliche Anstrengung auszuüben. Die Anreisewege zu Fuß am Studientag waren für alle Probanden identisch und durch eine Ruhepause vor der Blutabnahme zum Zeitpunkt VT eher von untergeordneter Bedeutung für die Messwerte.

4.5.2 Eignung und Limitationen des TSST

Der durchgeführte TSST ist eine standardisierte und zuverlässige Methode bezüglich Ablauf, Fragebögen und Methoden. Der TSST konnte sich bereits in vielen Studien als reproduzierbare Methode zur Erzeugung von mentalem Stress und als Goldstandard erweisen (Allen et al., 2016). Auch die Punktwerte in den Fragebögen STAI-S und MDBF nach der Stressexposition im Vergleich zu vorher bestätigen die Annahme, dass der TSST erfolgreich mentalen Stress bei den Probanden hervorrufen konnte. Im Folgenden werden biologische und mentale Faktoren diskutiert, die auf die Stresserzeugung im TSST Einfluss nehmen können.

Die Erhöhung des Kortisolspiegels durch den TSST ist bei 70-80% der Versuchspersonen zu beobachten (Dickerson & Kemeny, 2004). Einige Probanden sind somit Non-Responder in Bezug auf einen Kortisol-Anstieg im TSST und damit möglicherweise auch in Bezug auf die Entstehung von DNA-Schäden. Jeder Mensch variiert außerdem in der Wahrnehmung und Verarbeitung von mentalem Stress. So unterliegt auch der durch den TSST-G induzierte Stress einigen Variablen, die von dem Probanden individuell abhängen.

Weitere Variablen in der Versuchsdurchführung beinhalten die verschiedenen Akteure als Gremium und als Studienleitung. So könnten die wechselnden Gremien- und Studienleitungen die Probanden unterschiedlich beeinflusst haben. Duchesne und Kollegen (2012) konnten zeigen, dass bei jungen Erwachsenen höhere Kortisolwerte während des TSST erreicht wurden, wenn die Gremienmitglieder vom anderen Geschlecht waren als die Probanden selbst (Duchesne et al., 2012). In der BEST-Studie

waren die Mitglieder des Gremiums ausschließlich weiblich. Daraus würde sich nach Duchesne und Kollegen schließen lassen, dass die männlichen Probanden durch das weibliche Gremium stärker auf den Stress reagieren. Im Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Probanden zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Menge der DNA-Schäden. Als weitere Variable im TSST-G beeinflusst die Gruppendynamik unter den Probanden die Reaktion auf den TSST-G. Soziale Gefüge und soziale Interaktion sind dabei nicht automatisch ein Stressor, sondern können auch als Puffer gegen Stress fungieren (Frisch et al., 2015). Sympathie und Zugehörigkeitsgefühl gegenüber den anderen Probanden sowie das Stimmungsklima in der Gruppe können das subjektive Stressgefühl beeinflussen. Die Studie führte den TSST-G immer in Gruppengrößen von drei bis sechs Probanden durch. Bekannte Mitprobanden könnten somit ebenfalls zu veränderten Stressreaktionen im Versuch geführt haben. Von den Probanden dieser Arbeit gaben 83% an, mindestens eines der Gruppenmitglieder vor der Studie bereits zu kennen sowie ein Anteil von 39%, die gesamte Gruppe zu kennen. Aufgrund der standortbezogenen Rekrutierung, kannten sich somit des Öfteren Probanden bereits vor dem TSST-G. In der Bewertung des Gruppengefühls konnten die Probanden in Fragebögen Werte von 1 "sehr schlecht" bis hin zu 7 "sehr gut" angeben. Im Durchschnitt vergaben diejenigen Probanden mit bekannten Mitprobanden 4,6 Punkte für das Gruppengefühl, während die anderen, die niemanden kannten, 4,1 Punkte durchschnittlich vergaben. Das Gruppengefühl schien somit in beiden Gruppen weder als sehr schlecht noch auffällig gut empfunden worden zu sein, bei bekannten Mitprobanden jedoch ein wenig besser.

4.5.3 Die Stichprobe

Als Limitationen im Probandenkollektiv könnten die Strukturen der Bundeswehr gelten. Der Frauenanteil ist eher gering unter Soldaten - in dieser Stichprobe sind es 15%. Für die Bundeswehr entspricht dieser Wert allerdings etwa dem üblichen Durchschnitt an Frauen (nach: Deutscher Bundestag, 2016). Daher ergeben sich kleine Teilnehmerzahlen für den Gruppenvergleich geschlechterspezifischer Unterschiede.

Desweiteren erscheint das Probandenkollektiv altersentsprechend gesund hinsichtlich des kardiovaskulären Systems und zeigt einen eher jungen Altersdurchschnitt von 30 Jahren auf. Nur 6% der Probanden gaben eine kardiovaskuläre Erkrankung (Hypertonie) an und nur wenige (3%) nahmen regelmäßig kardiovaskuläre Medikamente ein. In dieser

Selbstauskunft fällt auf, dass beide Geschlechter eine hohe Anzahl an Probanden aufweisen, die angaben, täglich Obst und Gemüse zu essen. Die Probanden dieses Kollektivs sind klinisch größtenteils kardiovaskulär ohne Befund und ernähren sich auffällig gesund.

Personen mit einer Depression weisen veränderte biologische Stressreaktionen auf (Caroll et al., 1976). Der Anteil depressiv erkrankter Probanden lag in unserer Stichprobe bei 1%. Diese Probanden gaben an, Antidepressiva einzunehmen (Sertralin). Im Vergleich zur Prävalenz der Depression in Deutschland von ca. 5% (Smith, K., 2014) liegt das Probandenkollektiv etwas unter dem Durchschnitt. Eine Beeinflussung der Ergebnisse im Zusammenhang mit psychischen Erkrankungen oder psychiatrischen Medikamenten scheint hier somit nicht von relevanter Bedeutung zu sein.

Etwa die Hälfte der Probanden wurde vor der Studie bereits mindestens einmal in einem Auslandseinsatz eingesetzt. Gerade in Hinblick auf die zukünftigen Untersuchungen der Studie BEST zu den Studienzeitpunkten t1 drei Monate und t2 ein Jahr nach Auslandseinsatz, wird dieser Anteil von großer Relevanz sein. Die Soldaten und Soldatinnen dienen der Bundeswehr seit durchschnittlich 9 Jahren und haben sich im Mittel für 15 Jahre verpflichtet. Die Probanden sind der Bundeswehr somit sowohl bereits länger zugehörig als auch langfristig verpflichtet.

Insgesamt lässt sich zu den Faktoren mit Einfluss auf die Stressreaktion in der Stichprobe feststellen, dass die Probanden keine auffälligen Prävalenzen hinsichtlich kardiovaskulärer und psychiatrischer Erkrankungen aufweisen, jedoch die langjährige Zugehörigkeit zu der Bundeswehr sowie Auslandseinsätze für die Stressreaktion relevante und häufig im Probandenkollektiv vertretene Faktoren darstellen.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mentaler Stress zu einem kurzzeitigen Anstieg an DNA-Strangbrüchen führt, die sich während einer anschließenden Ruhephase wieder normalisieren. Außerdem wurden Hinweise auf einen Zusammenhang von DNA-Strangbrüchen und dem kardiovaskulären Risikoprofil gefunden.

Die Stichprobe dieser Arbeit umfasst sowohl Probanden vor einem Auslandseinsatz als auch nach bereits erfolgten Auslandseinsätzen. In weiterführenden Arbeiten im Rahmen der Studie BEST wird prospektiv der Einfluss von Auslandseinsätzen auf die DNA-Strangbrüche in einem erneuten TSST-G-Experiment untersucht (Follow-up Messung zu t1 und t2). Hier wird sich zeigen, ob die Stressreaktion und die Mengen an DNA-Strangbrüchen durch akuten mentalen Stress Veränderungen aufzeigen nach einem längeren und starken stressreichen Ereignis wie einem Auslandseinsatz. Außerdem untersucht die Studie BEST einige weitere biologische Parameter auf Zusammenhänge mit mentalem Stress. Zur Untersuchung der physiologischen Stressreaktion werden einerseits Stresshormone wie Kortisol und α -Amylase im Speichel und Entzündungsmarker wie Zytokine im Serum gemessen, andererseits vegetative Messwerte wie die Herzratenvariabilität erhoben. Ebenfalls im Zusammenhang mit oxidativem Stress werden auch zur direkten Messung von Radikalen mittels Elektronenspinresonanz (ESR) zu denselben Zeitpunkten wie für den Comet Assay Blutproben entnommen. Zur Messung des Radikals NO werden außerdem Messwerte zu Nitrat im Serum erhoben. Desweiteren isoliert die Studie mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC). Aus den PBMC werden weitere Parameter bestimmt, darunter Nitrotyrosin als Marker für nitrosativen Stress sowie die Genexpression der induzierbaren Stickstoffmonooxidsynthase mit oxidativer Wirkung und der Hämoxygenase 1 mit antioxidativer Wirkung. Außerdem sollen aus den PBMC Telomerlängen als Maß der Zellalterung bestimmt werden.

Zu erwarten wäre in Bezug auf die Ergebnisse dieser Arbeit, dass analog zu dem Anstieg an DNA-Schäden auch die Menge an Radikalen in den ESR-Messungen während des TSST-G ansteigt sowie die NO-Werte.

Als Fazit aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich die Überlegung, wie Soldaten mit bestehendem kardiovaskulärem Risiko erkannt werden und besondere Schutzmaßnahmen erhalten könnten in ihrem beruflichen Umfeld. Gerade für diese

Personengruppe zeigt sich eine besondere Relevanz für Maßnahmen der Stressreduktion im Alltag sowie der Förderung von Verhaltensmaßnahmen im Umgang mit Stress. Aber nicht nur für Soldaten und Soldatinnen mit bereits bestehendem Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen sondern für alle Bevölkerungsgruppen zeigt sich der Stellenwert präventiver Maßnahmen hinsichtlich psychosomatischer Belastungsfaktoren wie mentalem Stress in der Gesundheitsförderung.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der Studie BundeswehrEinsatz und STress (BEST) wurde die Entstehung von Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Strangbrüchen durch mentalen Stress in Vollblutproben von Soldaten (Stichprobengröße $n = 72$) mithilfe des Comet Assay untersucht. Mentalen Stress erfuhren die Probanden im Trierer Social Stress Test for Groups (TSST-G), bei dem die Vollblutproben zu Beginn, direkt nach Stressexposition und nach anschließender Ruhephase entnommen wurden. Das kardiovaskuläre Risiko der Probanden wurde durch den Risikoscore der Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) Studie berechnet und während des Stresstests wurde von den Probanden der Multidimensionale Befindlichkeitsfragebogen (MDBF), der Fragebogen für Zustandsangst des State-Trait-Angstinventars (STAI-S) und der Fragebogen für Primary Appraisal Secondary Appraisal (PASA) zur Erhebung des subjektiven Stress ausgefüllt.

Es konnte ein Anstieg der DNA-Strangbrüche unter mentalem Stress sowie ein Abfall der Schäden während der Ruhephase festgestellt werden. Geschlechterspezifische Unterschiede fanden sich nicht. Die Probandengruppe mit kardiovaskulärem Risiko zeigte eine signifikant höhere Menge an DNA-Strangbrüchen unter mentalem Stress gegenüber den Probanden ohne positivem Risikoscore. Dabei hatten die Parameter positive Familienanamnese sowie die Blutfettwerte (High density Lipoprotein (HDL)-Cholesterin, Low density Lipoprotein (LDL)-Cholesterin und Triglyceride) den größten Einfluss auf die Anzahl an DNA-Strangbrüchen. Diese Parameter scheinen zum Gesamtergebnis stärker beigetragen zu haben als die übrigen Parameter, für die sich kein eigener Zusammenhang zu den DNA-Schäden zeigte (Rauchen, systolischer Blutdruck, Alter und Diabetes). Der stärkste Zusammenhang zeigt sich jedoch für das Gesamtergebnis des PROCAM-Scores, was für die Aussagekraft des Scores spricht. MDBF, STAI-S und der Stressindex des PASA-Fragebogens korrelierten nicht mit der Menge an DNA-Strangbrüchen, aber die Fragebögen MDBF und STAI-S zeigten an, dass die Probanden sich nach dem Stresstest schlechter gestimmt, müder, unruhiger und ängstlicher fühlten als davor. Sie bestätigen somit, dass der gewünschte Stresseffekt durch den TSST-G erfolgreich hervorgerufen werden konnte.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass mentaler Stress kurzzeitig zu Strangbrüchen in der DNA durch oxidativen Stress führt und dass für kardiovaskulär gefährdete Personen mehr DNA-Schäden zu beobachten sind. Daraus ergibt sich die gesundheitliche Relevanz für

Maßnahmen der Stressreduktion im Alltag und für die Förderung von Verhaltensmaßnahmen im Umgang mit Stress und dadurch zur Reduktion von DNA-Schäden.

6 Literaturverzeichnis

1. Allen, A.P., Kennedy, P.J., Dockray, S., Cryan, J.F., Dinan, T.G. & Clarke, G.: The Trier Social Stress Test: Principles and practice. *Neurobiology of stress* 6: 113-126 (2016)
2. Assmann, G., Cullen, P. & Schulte, H.: Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* 105: 310-315 (2002)
3. Banerjee, B., Vadiraj, H.S., Ram, A., Rao, R., Jayapal, M., Gopinath, K.S., Ramesh, B.S., Rao, N., Kumar, A., Raghuram, N., Hegde, S., Nagendra, H.R. & Prakash Hande, M.: Effects of an Integrated Yoga Program in Modulating Psychological Stress and Radiation-Induced Genotoxic Stress in Breast Cancer Patients Undergoing Radiotherapy. *Integrative Cancer Therapies* 6: 242-250 (2007)
4. Brownley, K.A., Hurwitz, B.E. & Schneiderman, N.: Cardiovascular psychophysiology. *Handbook of psychophysiology*: 224-2640 (2000)
5. Bruhn, J.G., Paredes, A., Adsett, C.A. & Wolf, S.: Psychological predictors of sudden death in myocardial infarction. *Journal of psychosomatic research* 18: 187-191 (1974)
6. Cadet, J. & Douki, T.: Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 17: 1816-1841 (2018)
7. Cao, C., Lai, T., Li, M., Zhou, H., Lv, D., Deng, Z., Ying, S., Chen, Z., Li, W. & Shen, H.: Smoking-promoted oxidative DNA damage response is highly correlated to lung carcinogenesis. *Oncotarget* 7: 18919-18926 (2016)
8. Cannon, W.B.: Organization for Physiological Homeostasis. *Physiological Reviews* 9: 399-431 (1929)
9. Carroll, B.J., Curtis, G.C., Davies, B.M., Mendels, J. & Sugerman, A.A.: Urinary free cortisol excretion in depression. *Psychological medicine* 6: 43-50 (1976)

10. Chatterjee, N. & Walker, G.C.: Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and molecular mutagenesis* 58: 235-263 (2017)
11. Čolak, E., Ignjatović, S., Radosavljević, A., Žorić, L.: The association of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense parameters with inflammatory markers in patients with exudative form of age-related macular degeneration. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 60: 100-107 (2017)
12. Collins, A.R.: The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology* 26: 249-261 (2004)
13. Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C. & Stetina, R.: The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23: 143-151 (2008)
14. Czarny, P., Kwiatkowski, D., Kacperska, D., Kawczynska, D., Talarowska, M., Orzechowska, A., Bielecka-Kowalska, A., Szemraj, J., Galecki, P. & Sliwinski, T.: Elevated level of DNA damage and impaired repair of oxidative DNA damage in patients with recurrent depressive disorder. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* 21: 412-418 (2015)
15. de Sousa, J.A., Pereira, P., Allgayer, M.D.C., Marroni, N.P., de Barros Falcao Ferraz, A. & Picada, J.N.: Evaluation of DNA damage in Wistar rat tissues with hyperlipidemia induced by tyloxapol. *Experimental and molecular pathology* 103: 51-55 (2017)
16. Demirbag, R., Yilmaz, R. & Kocyigit, A.: Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 570: 197-203 (2005)
17. Descamps-Latscha, B., Drueke, T. & Witko-Sarsat, V.: Dialysis-induced oxidative stress: biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Seminars in dialysis* 14: 193-199 (2001)

18. Deutscher Bundestag 25.07.2016, Antwort der Bundesregierung auf die Kleine Anfrage der Abgeordneten Doris Wagner, Agnieszka Brugger, Dr. Tobias Lindner, weiterer Abgeordneter und der Fraktion BÜNDNIS 90/DIE GRÜNEN – Drucksache 18/8983 – Frauenkarrieren in der Bundeswehr. <http://dip21.bundestag.de/dip21/btd/18/092/1809263.pdf> (2019, 08/30)
19. Dickerson, S.S. & Kemeny, M.E.: Acute stressors and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychological bulletin* 130: 355-391 (2004)
20. Dröge, W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82: 47-95 (2002)
21. Duchesne, A., Tessera, E., Dedovic, K., Engert, V. & Pruessner, J.C.: Effects of panel sex composition on the physiological stress responses to psychosocial stress in healthy young men and women. *Biological psychology* 89: 99-106 (2012)
22. Egede, L.E., Bishu, K.G., Walker, R.J., Dismuke, C.E: Impact of diagnosed depression on healthcare costs in adults with and without diabetes: United States, 2004-2011. *Journal of affective disorders* 195: 119-126 (2016)
23. Ellegaard, P.K. & Poulsen, H.E.: Tobacco smoking and oxidative stress to DNA: a meta-analysis of studies using chromatographic and immunological methods. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 76: 151-158 (2016)
24. Fang, L., Neutzner, A., Turtshi, S., Flammer, J. & Mozaffarieh, M.: Comet assay as an indirect measure of systemic oxidative stress. *Journal of visualized experiments*. 99: 52763 (2015)
25. Ferrari, A.J., Charlson, F.J., Norman, R.E., Patten, S.B., Freedman, G., Murray, C.J., Vos, T. & Whiteford, H.A.: Burden of depressive disorders by country, sex, age, and year: findings from the global burden of disease study 2010. *PLoS medicine* 10: 1001547 (2013)

26. Frisch, J.U., Häusser, J.A., Mojzisch, A.: The Trierer Social Stress Test as a paradigm to study how to people respond in social interactions. *Frontiers in Psychology* 2: 14 (2015)
27. Gaab, J.: PASA - Primary Appraisal Secondary Appraisal. Ein Fragebogen zur Erfassung von situationsbezogenen kognitiven Bewertungen. *Verhaltenstherapie* 19: 114-115 (2009)
28. Gaab, J., Blattler, N., Menzi, T., Pabst, B., Stoyer, S. & Ehlert, U.: Randomized controlled evaluation of the effects of cognitive-behavioral stress management on cortisol responses to acute stress in healthy subjects. *Psychoneuroendocrinology* 28: 767-779 (2003)
29. Gala, R.R. & Westphal, U.: Corticosteroid-binding globulin in the rat: studies on the sex difference. *Endocrinology* 77: 841-851 (1965)
30. Gandhi, S. & Abramov, A.Y.: Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012: 428010 (2012)
31. Ghezzi, P., Floridi, L., Boraschi, D., Cuadrado, A., Manda, G., Levic, S., D'Acquisto, F., Hamilton, A., Athersuch, T.J. & Selley, L.: Oxidative Stress and Inflammation Induced by Environmental and Psychological Stressors: A Biomarker Perspective. *Antioxidants & redox signaling* 28: 852-872 (2018)
32. Halliwell, B., Gutteridge, J.M. & Cross, C.E.: Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *The Journal of laboratory and clinical medicine* 119: 598-620 (1992)
33. Hansson, J., Keyse, S.M., Lindahl, T. & Wood, R.D.: DNA excision repair in cell extracts from human cell lines exhibiting hypersensitivity to DNA-damaging agents. *Cancer research* 51: 3384-3390 (1991)
34. Hartmann, A., Plappert, U., Raddatz, K., Grünert-Fuchs, M. & Speit, G.: Vitamin E prevents exercise-induced DNA damage. *Mutation Research* 346: 195-202 (1995)

35. Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R. & 4th International Comet Assay Workshop: Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 18: 45-51 (2003)
36. Headlam, H.A. & Davies, M.J.: Markers of protein oxidation: different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products. *Free radical biology & medicine* 36: 1175-1184 (2004)
37. Herbison, C.E., Allen, K., Robinson, M., Newnham, J. & Pennell, C.: The impact of life stress on adult depression and anxiety is dependent on gender and timing of exposure. *Development and psychopathology* 29: 1443-1454 (2017)
38. Herbison, C.E., Henley, D., Marsh, J., Atkinson, H., Newnham, J.P., Matthews, S.G., Lye, S.J. & Pennell, C.E.: Characterization and novel analyses of acute stress response patterns in a population-based cohort of young adults: influence of gender, smoking, and BMI. *Stress* 19: 139-150 (2016)
39. Herd, J.A.: Cardiovascular response to stress. *Physiological Review* 71: 305-330 (1991)
40. Het, S., Rohleder, N., Schoofs, D., Kirschbaum, C. & Wolf, O.T.: Neuroendocrine and psychometric evaluation of a placebo version of the 'Trier Social Stress Test'. *Psychoneuroendocrinology* 34: 1075-1086 (2009)
41. Heuser, V.D., De Andrade, V.M., Peres, A., de Braga, Luisa Maria, Gomes Macedo & Chies, J.A.B.: Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. *Cell biology international* 32: 1223-1229 (2008)
42. Hidalgo, V., Pulopulos, M.M., Puig-Perez, S., Espin, L., Gomez-Amor, J. & Salvador, A.: Acute stress affects free recall and recognition of pictures differently depending on age and sex. *Behavioural brain research* 292: 393-402 (2015)

43. Hoge, C.W., Castro, C.A., Messer, S.C., McGurk, D., Cotting, D.I. & Koffman, R.L.: Combat duty in Iraq and Afghanistan, mental health problems, and barriers to care. *The New England journal of medicine* 351: 13-22 (2004)
44. Huang, D., Ou, B. & Prior, R.L.: The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 1841-1856 (2005)
45. Hummel, E.M., Hesas, E., Muller, S., Beiter, T., Fisch, M., Eibl, A., Wolf, O.T., Giebel, B., Platen, P., Kumsta, R. & Moser, D.A.: Cell-free DNA release under psychosocial and physical stress conditions. *Translational psychiatry* 8: 236-264 (2018)
46. Iwata, M., Ota, K.T. & Duman, R.S.: The inflammasome: pathways linking psychological stress, depression, and systemic illnesses. *Brain, behavior, and immunity* 31: 105-114 (2013)
47. Kales, S.N., Soteriades, E.S., Christoudias, S.G. & Christiani, D.C.: Firefighters and on-duty deaths from coronary heart disease: a case control study. *Environmental health: a global access science source* 2: 14 (2003)
48. Kaplan, J.R., Manuck, S.B., Clarkson, T.B., Lusso, F.M. & Taub, D.M.: Social status, environment, and atherosclerosis in cynomolgus monkeys. *Arteriosclerosis* 2: 359-368 (1982)
49. Kendler, K.S., Karkowski, L.M. & Prescott, C.A.: Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *The American Journal of Psychiatry* 156: 837-841 (1999)
50. Kirschbaum, C., Pirke, K.M. & Hellhammer, D.H.: The 'Trier Social Stress Test'-a tool for investigating psychobiological stress responses in a laboratory setting. *Neuropsychobiology* 28: 76-81 (1993)
51. Kohn, K.W.: Principles and practice of DNA filter elution. *Pharmacology & therapeutics* 49: 55-77 (1991)

52. Korsager, L.M., Matchkov, V.V.: Hypertension and physical exercise: The role of oxidative stress. *Medicina* 52: 19-27 (2016)
53. Lambeth, J.D.: Nox enzymes, ROS, and chronic disease: an example of antagonistic pleiotropy. *Free radical biology & medicine* 43: 332-347 (2007)
54. Laux, L., Glanzmann, P., Schaffner, P. & Spielberger, C.D.: Das State-Trade Angstinventar (STAI), Theoretische Grundlagen und Handanweisungen. 1.Auflage, Beltz Testgesellschaft, Weinheim (1981)
55. Lazarus, R.S. & Folkman, S.: Stress, Appraisal, and Coping. 1. Auflage, Springer Publishing Company, New York (1984)
56. Leor, J., Poole, W.K. & Kloner, R.A.: Sudden cardiac death triggered by an earthquake. *The New England journal of medicine* 334: 413-419 (1996)
57. Levine, A.B., Levine, L.M. & Levine, T.B.: Posttraumatic stress disorder and cardiometabolic disease. *Cardiology* 127: 1-19 (2014)
58. Lown, B., Verrier, R.L. & Rabinowitz, S.H. 1977, "Neural and psychologic mechanisms and the problem of sudden cardiac death", *The American Journal of Cardiology*, vol. 39, no. 6, pp. 890-902
59. Lund, T.D., Munson, D.J., Haldy, M.E. & Handa, R.J.: Androgen inhibits, while oestrogen enhances, restraint-induced activation of neuropeptide neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Journal of neuroendocrinology* 16: 272-278 (2004)
60. Mastaloudis, A., Yu, T., O'Donnell, R.P., Frei, B., Dashwood, R.H. & Traber, M.G.: Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radical Biology and Medicine* 36: 966-975 (2004)
61. McCarthy, P.J., Sweetman, S.F., McKenna, P.G. & McKelvey-Martin, V.J.: Evaluation of manual and image analysis quantification of DNA damage in the alkaline comet assay. *Mutagenesis* 12: 209-214 (1997)

62. McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Meo, M.P. & Collins, A.: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutation research* 288: 47-63 (1993)
63. Meisel, S.R., Kutz, I., Dayan, K.I., Pauzner, H., Chetboun, I., Arbel, Y. & David, D.: Effect of Iraqi missile war on incidence of acute myocardial infarction and sudden death in Israeli civilians. *Lancet* 338: 660-661 (1991)
64. Mental Health Foundation 2018: Stress: Are we coping? <https://www.mentalhealth.org.uk/publications/stress-are-we-coping> (2019, 11/26)
65. Milne, G.L., Musiek, E.S. & Morrow, J.D.: F2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. *Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 10: 10-23 (2005)
66. Muldoon, M.F., Bachen, E.A., Manuck, S.B., Waldstein, S.R., Bricker, P.L. & Bennett, J.A.: "Acute cholesterol responses to mental stress and change in posture", *Archives of Internal Medicine*, vol. 152, no. 4, pp. 775-780 (1992)
67. Musselman, D.L., Tomer, A., Manatunga, A.K., Knight, B.T., Porter, M.R., Kasey, S., Marzec, U., Harker, L.A. & Nemeroff, C.B.: Exaggerated platelet reactivity in major depression. *The American Journal of Psychiatry* 153: 1313-1317 (1996)
68. Olive, P.L., Banath, J.P. & Durand, R.E.: Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay". *Radiation research* 122: 86-94 (1990)
69. Olive, P.L., Banath, J.P. & Fjell, C.D.: DNA strand breakage and DNA structure influence staining with propidium iodide using the alkaline comet assay. *Cytometry* 16: 305-312 (1994)
70. Ostling, O. & Johanson, K.J.: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* 123: 291-298 (1984)

71. Oyola, M.G. & Handa, R.J.: Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress* 20: 476-494 (2017)
72. Persson, T., Popescu, B.O. & Cedazo-Minguez, A.: Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? *Oxidative medicine and cellular longevity* 2014: 427318 (2014)
73. Piontek, D., Atzendorf, J., Gomes de Matos, E. & Kraus, L.: Kurzbericht Epidemiologischer Suchtsurvey 2015: Tabellenband: Tabakkonsum und Hinweise auf klinisch relevanten Tabakkonsum nach Geschlecht und Alter im Jahr 2015. IFT Institut für Therapieforschung, München (2016)
74. Pisoschi, A.M., Pop, A.: The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry* 97: 55-74 (2015)
75. Poljsak, B., Šuput, D. & Milisav, I.: Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 956792: 1-11 (2013)
76. Pool-Zobel, B.L., Dornacher, I., Lambertz, R., Knoll, M., Seitz, H.K.: Genetic damage and repair in human rectal cells for biomonitoring: sex differences, effects of alcohol exposure, and susceptibilities in comparison to peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research* 551: 127-134 (2004)
77. Powell, S., McMillan, T.J.: DNA damage and repair following treatment with ionizing radiation. *Radiotherapy and oncology: journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 19: 95-108 (1990)
78. Reul, J.M., de Kloet, E.R.: Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117: 2505-2511 (1985)
79. Riley, P.A.: Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International journal of radiation biology* 65: 27-33 (1994)

80. Rivier, C., Vale, W.: Effects of corticotropin-releasing factor, neurohypophyseal peptides, and catecholamines on pituitary function. *Federation proceedings* 44: 189-195 (1985)
81. Rozanski, A., Blumenthal, J.A., Kaplan, J.: Impact of psychological factors on the pathogenesis of cardiovascular disease and implications for therapy. *Circulation* 99: 2192-2217 (1999)
82. Sapolsky, R.M., Alberts, S.C., Altmann, J.: Hypercortisolism associated with social subordination or social isolation among wild baboons. *Archives of General Psychiatry* 54: 1137-1143 (1997)
83. Seeman, T.E., Berkman, L.F., Blazer, D., Rowe, J.W.: Social ties and support and neuroendocrine functions: the Macarthur studies of successful aging. *Annals of Behavioral Medicine* 16: 95-106 (1994)
84. Selye, H.: The stress of life. 1. Auflage, McGraw-Hill, New York (1956)
85. Shimano, C., Hara, M., Nishida, Y., Nanri, H., Horita, M., Yamada, Y., Li, Y.S., Kasai, H., Kawai, K., Higaki, Y., Tanaka, K.: Perceived Stress, Depressive Symptoms, and Oxidative DNA Damage. *Psychosomatic medicine* 80: 28-33 (2018)
86. Shin, C.S., Moon, B.S., Park, K.S., Kim, S.Y., Park, S.J., Chung, M.H., Lee, H.K.: Serum 8-hydroxy-guanine levels are increased in diabetic patients. *Diabetes care* 24: 733-737 (2001)
87. Silver, A.E., Beske, S.D., Christou, D.D., Donato, A.J., Moreau, K.L., Eskurza, I., Gates, P.E., Seals, D.R.: Overweight and obese humans demonstrate increased vascular endothelial NAD(P)H oxidase-p47(phox) expression and evidence of endothelial oxidative stress. *Circulation* 115: 627-637 (2007)
88. Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research* 175: 184-191 (1988)

89. Sivonova, M., Zitnanova, I., Hlincikova, L., Skodacek, I., Trebaticka, J., Durackova, Z.: Oxidative stress in university students during examinations. *Stress* 7: 183-188 (2004)
90. Slattery, K., Bentley, D., Coutts, A.J.: The role of oxidative, inflammatory and neuroendocrinological systems during exercise stress in athletes: implications of antioxidant supplementation on physiological adaptation during intensified physical training. *Sports medicine* 45: 453-471 (2015)
91. Smith, K.: Mental health: a world of depression. *Nature* 515: 181 (2014)
92. Soares, J.P., Silva, A.M., Fonseca, S., Oliveira, M.M., Peixoto, F., Gaivao, I., Mota, M.P.: How can age and lifestyle variables affect DNA damage, repair capacity and endogenous biomarkers of oxidative stress? *Experimental gerontology* 62: 45-52 (2015)
93. Speert, D.B., McClennen, S.J., Seasholtz, A.F.: Sexually dimorphic expression of corticotropin-releasing hormone-binding protein in the mouse pituitary. *Endocrinology* 143: 4730-4741 (2002)
94. Steptoe, A., Hamer, M., Chida, Y.: The effects of acute psychological stress on circulating inflammatory factors in humans: a review and meta-analysis. *Brain, behavior, and immunity* 21: 901-912 (2007)
95. Steyer, R., Schwenkmezger, P., Notz, P., Eid, M.: Der multidimensionale Befindlichkeitsfragebogen (MDBF): Handanweisung. 1. Auflage, Hogrefe, Göttingen (1997)
96. Theorell, T., Perski, A., Akerstedt, T., Sigala, F., Ahlberg-Hulten, G., Svensson, J., Eneroth, P.: Changes in job strain in relation to changes in physiological state. A longitudinal study. *Scandinavian journal of work, environment & health* 14: 189-196 (1988)

97. Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F.: Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis* 35: 206-221 (2000)
98. Togliatto, G., Lombardo, G., Brizzi, M.F.: The Future Challenge of Reactive Oxygen Species (ROS) in Hypertension: From Bench to Bed Side. *International journal of molecular sciences* 18: 1988 (2017)
99. von Dawans, B., Kirschbaum, C., Heinrichs, M.: The Trier Social Stress Test for Groups (TSST-G): A new research tool for controlled simultaneous social stress exposure in a group format. *Psychoneuroendocrinology* 36: 514-522 (2011)
100. Waller, C., Bauersachs, J., Hoppmann, U., Hoch, J., Krause, S., Szabo, F., Engler, H., Rottler, E., Herrmann-Lingen, C., Gündel, H.: Blunted Cortisol Stress Response and Depression-Induced Hypocortisolism Is Related to Inflammation in Patients With CAD. *Journal of the American College of Cardiology* 67: 1124-1126 (2016)
101. Wang, C., Li, P., Xuan, J., Zhu, C., Liu, J., Shan, L., Du, Q., Ren, Y., Ye, J.: Cholesterol Enhances Colorectal Cancer Progression via ROS Elevation and MAPK Signaling Pathway Activation. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 42: 729-742 (2017)
102. Watson, S.L., Shively, C.A., Kaplan, J.R., Line, S.W.: Effects of chronic social separation on cardiovascular disease risk factors in female cynomolgus monkeys. *Atherosclerosis* 137: 259-266 (1998)
103. Weiser, M.J., Handa, R.J.: Estrogen impairs glucocorticoid dependent negative feedback on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via estrogen receptor alpha within the hypothalamus. *Neuroscience* 159: 883-895 (2009)
104. Whitaker, S.J.: DNA damage by drugs and radiation: what is important and how is it measured? *European journal of cancer* 28: 273-276 (1992)

105. Wilson, D.R., Folkes, F.: Cardiovascular disease in military populations: introduction and overview. *Journal of the Royal Army Medical Corps* 161: 167-168 (2015)
106. Wirtz, P.H., von Kanel, R., Emini, L., Suter, T., Fontana, A., Ehler, U.: Variations in anticipatory cognitive stress appraisal and differential proinflammatory cytokine expression in response to acute stress. *Brain, behavior, and immunity* 21: 851-859 (2007)
107. Witte, J., Kahler, W., Wunderlich, T., Radermacher, P., Wohlrab, C., Koch, A.: Dose-time dependency of hyperbaric hyperoxia-induced DNA strand breaks in human immune cells visualized with the comet assay. *Undersea & hyperbaric medicine: journal of the Undersea and Hyperbaric Medical Society* 41: 171-181 (2014)
108. Xu, W., Chen, B., Guo, L., Li, Z., Zhao, Y., Zeng, H.: High-sensitivity CRP: possible link between job stress and atherosclerosis. *American Journal of Industrial Medicine* 58: 773-779 (2015)
109. Yusuf, S., Hawken, S., Ounpuu, S., Dans, T., Avezum, A., Lanas, F., McQueen, M., Budaj, A., Pais, P., Varigos, J., Lisheng, L., INTERHEART Study Investigators: Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet* 364: 937-952 (2004)
110. Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., Tschopp, J.: A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469: 7329: 221-225 (2011)
111. Ziegelstein, R.C., Bush, D.E., Fauerbach, J.A.: Depression, adherence behavior, and coronary disease outcomes. *Archives of Internal Medicine* 158: 808-809 (1998)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Insbesondere möchte ich mich bedanken bei meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. med. Christiane Waller, die diese Arbeit für mich ermöglicht hat, nicht nur für die Themenstellung und das regelmäßige Korrekturlesen, sondern auch für die gute Betreuung und die hilfreichen Anregungen.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Peter Radermacher für die wissenschaftliche Betreuung als Zweitgutachter sowie allen Mitarbeitern des Instituts für Anästhesiologische Pathophysiologie und Verfahrensentwicklung für die Unterstützung und die Mitbenutzung der wissenschaftlichen Geräte und Räumlichkeiten. Hier danke ich im Besonderen Herrn Dr. hum. biol. Michael Gröger für die Einführung in die Methodik.

Außerdem danke ich Dae-Sup Rhee für die Betreuung und Unterstützung bei der Durchführung der Versuchsabende und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten. Mein Dank gilt allen Mitgliedern des BEST-Teams für die gegenseitige Unterstützung und Ermutigung. Besonderer Dank gilt dabei Edit Rottler für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und Bearbeitung der Daten.

Darüber hinaus danke ich meiner Mutter, Christel Kässens, für ihre vielseitige Unterstützung während des Verfassens dieser Arbeit und über das gesamte Studium hinweg. Meinem Freund, Tobias Burkard, danke ich nicht nur für die wissenschaftlichen Tipps und das Korrekturlesen, sondern ebenso für die uneingeschränkte Ermutigung und Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit.

Lebenslauf

- Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt. -

- Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt. -