Schlussbericht zu 50WB2135

Einfluss von Isolation auf Genexpression In Immunzellen von Gesunden Individuen

I. Kurze Darstellung zu

1. Aufgabenstellung

Das Ziel dieses Projekts ist die Veränderungen der Genexpression von Immunzellen bei Individuen zu untersuchen, die sich 45 Tage in Isolation befanden und einer hohen Arbeitsbelastung ausgesetzt waren. Gene, die an adrenergen Signalwege, DNA-Reparaturmechanismen und Immunantwort beteiligt sind, wurden untersucht und in Zusammenhang gebracht. Darüber hinaus wurden integrative Analysen unter Einbeziehung vorhandener Daten zu endogenen und *ex vivo* strahleninduzierten DNA-Schäden durchgeführt, die an denselben Individuen gemessen wurden (Feiveson, *et al*. 2022).

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

Voraussetzung für die Durchführung dieses Vorhabens war zunächst die positive Begutachtung des Vorhabens und die Förderung und Finanzierung durch das Deutsche Zentrum für Luft- und Raumfahrt. Das DLR stellte die notwendigen Personal-, und Sachmittel für dieses Vorhaben zur Verfügung.
Die Blutproben wurden in Vorfeld im Rahmen des DLR-geförderten Projekts „Neuroplastizität in HERA – Strukturelle und funktionelle Veränderungen der Hippocampus-Plastizität nach Isolierung und ihre verhaltensbedingte Bedeutung für Langzeit-Weltraumforschungsmissionen“ unter der Leitung von Prof. Alexander Stahn entnommen und zur Universität Konstanz für Genexpression-Analyse versendet.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Genexpression wurde mittels Real Time PCR bestimmt. Als erstes wurden Reagenzen bestellt. Danach wurden die Genexpression Analysen durchgeführt. Hierfür wird in einem ersten Schritt die Gesamt-RNA aus isolierten peripheren mononukleären Zellen extrahiert, die von Individuen vor, während und nach der Isolierung gewonnen wurden. RNA wird in cDNA konvertiert und Schlüssel-Gene, die an adrenergen Signalwegen, DNA-Reparaturmechanismen und der Immunantwort beteiligt sind, wurden in spezifisch gefertigt 96-Well-Platten untersucht. Materialkosten: Das notwendige Material wurde wie geplant in 2021 bestellt und ist auch angekommen. Es handelt sich dabei grundsätzlich um Kits für RNA-Extraktion und gelabelte PRC-Platten für Genexpression. In 2022 konnte kein Personal eingestellt werden und deshalb

wurde eine Verlängerung des Projektes beantragt und diese wurde auch vom DLR genehmigt. Nach der zweiten Ausschreibung wurde Herr Jonas Thimm ab dem 1. April 2023 angestellt. Insgesamt wurden 160 Proben analysiert.

4. Wissenschaftlichem und technischem Stand, an den angeknüpft wurde, insbesondere

- Angabe bekannter Konstruktionen, Verfahren und Schutzrechte, die für die Durchführung des Vorhabens benutzt wurden,
- Angabe der verwendeten Fachliteratur sowie der benutzten Informations- und Dokumentationsdienste

Der Weltraum ist eine komplexe Umgebung, in der verschiedene Arten von Stressfaktoren negative gesundheitliche Folgen haben können (5, 6). Kosmische Strahlung und Schwerelosigkeit gelten als die wichtigsten exogenen Faktoren, die bei Raumfahrtmissionen zu genetischer Instabilität führen können. Astronauten erleben jedoch auch physiologischen und psychologischen Stress, der die Freisetzung von Stresshormonen, Katecholaminen und Glukokortikoiden hervorruft. Diese endogenen Faktoren können ebenfalls DNA-Schäden verursachen.

Chronischer Stress, der durch langfristige Sperrung und Isolation verursacht wird, wirkt sich auf den menschlichen Körper und das Gehirn aus. Tiermodelle haben einen wesentlichen Beitrag zu unserem Verständnis der Auswirkungen verschiedener Stressarten auf den menschlichen Körper und das menschliche Verhalten geleistet (7). So führt beispielsweise kurzfristige soziale Isolation zu depressiv-ähnlichem Verhalten, erhöhte Corticosteron Konzentration (8) und verursachte Gedächtnisdefizite und oxidativen Stress bei Mäusen (9). Bei Ratten führte 11 Tage Isolationsstress zu einer stark hochregulierten Plasmakonzentration von Interleukin-1β (IL-1β) und des Stresshormons adrenocorticotropes Hormon (ACTH), während die Korticosteronwerte abnahmen (10). Oxidative Stressmarker im Hypothalamus waren bei Ratten bereits zwei Wochen nach sozialer Isolation erhöht (11). Ähnliche Effekte wurden auch nach längerer Isolation berichtet. Beispielsweise verursachte eine Isolationsperiode von 42 Tagen eine Erhöhung des Glukokortikoidspiegel, des oxidativen Schadens und Telomerverkürzungen bei Präriewühlmäusen (12), während einzeln gehaltene Ratten für 28 Tage höhere Konzentrationen des adrenokortikotropen Hormons (ACTH) sowie Tumornekrosefaktor alpha (TNF-α), Inteleukin-4 (IL-4) und Interleukin-10 (IL-10) aufwiesen (13).

Studien, die sich mit den Auswirkungen Isolation-induziertem Stress bei gesunden Menschen befassen, sind jedoch begrenzt. Mit der Implementierung von terrestrischen Raumfahrtanaloga wurden auch beim Menschen negative Auswirkungen der Isolation identifiziert; z.B. Müdigkeit, ein beeinträchtigter zirkadianer Rhythmus, Schlafstörungen, veränderte Stresshormonspiegel und immunmodulatorische Veränderungen (14). Je eingeschränkter und isolierter Menschen sind, desto wahrscheinlicher entwickeln sie Verhaltens- oder kognitive Zustände wie Stimmungsverlust, Schlafstörungen, Depression, Müdigkeit und/oder physiologische Probleme, die mit Stress verbunden sind. Tatsächlich wurden bei Personen, die sich einer Langzeitisolation unterzogen, erhöhte Cortisolspiegel und Immunveränderungen festgestellt

(15). Eine kürzlich durchgeführte systematische Metaanalyse zeigt einen Zusammenhang zwischen Einsamkeit, sozialer Isolation und C-reaktivem Protein (CRP), Fibrinogen und Interleukin-6 (IL-6). Dies deutet auf einen möglichen Zusammenhang zwischen sozialer Isolation und Einsamkeit mit systemischen Entzündungen hin (16). Bei sechs Männern, die 105 Tage in einem simulierten Raummodul von ~500 m^3 eingesperrt waren, war die Granulozyten-vermittelte H_2O_2-Produktion und die Freisetzung des Zelladhäsionsmoleküls CD62L erhöht (17). Gesunde Menschen, die 520 Tage in einer Kammer eingesperrt waren, zeigten Anzeichen von Verhaltensstörungen und psychischen Belastungen (18), verminderte kortikale Aktivität, erhöhtes Speichel Kortisol (15, 19, 20), erhöhte Anzahl an Lymphozyten und verstärkte Immunantworten (15). In einer Studie an Männern, die während des antarktischen Winters isoliert waren, nahmen die entzündungshemmenden Zytokine (IL-10 und IL-1RA) ab, während das proinflammatorische IFN-γ anstieg, was darauf hindeutet, dass eine langfristige Isolierung von Menschen das Plasmazytokingleichgewicht in Richtung eines proinflammatorischen Profils verschieben könnte (21).

Die übergreifende Botschaft ist, dass der durch Isolation induzierte physische und psychische Stress sich in der Freisetzung von Stresshormonen, Entzündungsmolekülen und der Produktion reaktiver oxidativer Spezies (ROS) äußern kann, die allesamt anerkannte Mediatoren von DNA-Schäden sind (22-31). Daher ist es plausibel zu postulieren, dass Isolationsstress DNA-Schäden induzieren kann. Tatsächlich wurde 8-Hydroxy-2-desoxyguanosin (8OhdG), ein DNA-Schadensmarker, im Hypothalamus von Ratten nachgewiesen, die 2 Wochen lang isoliert wurden (11). In den letzten Jahren hat sich das Verständnis dafür entwickelt, wie die DNA-Reparatur zur Entwicklung der angeborenen und erworbenen Immunität beiträgt. In adaptiven Immunzellen werden programmierte DNA-Doppelstrangbrüche (DNA-DSBs) während des Zusammenbaus und der Diversifizierung von Lymphozyten-Antigenrezeptorgenen erzeugt. In Zellen des angeborenen Immunsystems kann die Produktion von genotoxischen Wirkstoffen wie reaktiven Stickstoffmolekülen als Reaktion auf Krankheitserreger auch DNA-DSBs verursachen und die DNA Reparaturmaschinerie aktivieren (3, 32). Außerdem, wird die Aktivierung der Immunsignalwege durch verschiedene Komponenten der DNA-Schadensantwort ausgelöst (33) und zelluläre Prozesse der Reparatur von DNA-Schäden sind für eine effektive humorale adaptive Immunität erforderlich, die genetische Vielfalt in sich entwickelnden T- und B-Zellen erzeugen (2)

Alles in allem gibt es reichlich Hinweise, dass HPA-Aktivierung durch Stress zu einer Immunantwort und zur Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen führt. Es gibt auch reichlich Hinweise über ein cross-talk zwischen DNA-Reparaturmechanismen und der Immunantwort. Allerdings ist es nicht bekannt wie diese zelluläre Regulationsmechanismen sich gegenseitig beeinflussen.

Das Human Exploration Research Analog (HERA) der NASA zielt darauf ab, die Reaktion auf Stress, Anzeichen einer frühen Depression, Angst und Wut und deren Auswirkungen auf die menschliche Leistungsfähigkeit und Gesundheit zu untersuchen. HERA dient auch als analoges Umfeld für Studien zur biopsychosozialen Anpassung an Isolation. Somit bietet HERA eine einzigartige kontrollierte Umgebung, um die Auswirkungen längerer Isolation sowie die

Anpassung des Körpers und die Widerstandsfähigkeit gegenüber Isolation und sozialem Stress zu untersuchen.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

N/A

II. Eingehende Darstellung

1. Verwendung der Zuwendung und des erzielten Ergebnisses im Einzelnen, mit Gegenüberstellung der vorgegebenen Ziele

Stresssituationen lösen Überlebensmechanismen aus, die die zelluläre Immunantwort beeinflussen können. Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass DNA-Reparaturmechanismen zur Entwicklung der angeborenen und erworbenen Immunität beitragen (1-3). In einer vergangenen Studie stellten wir einen Zusammenhang zwischen Expression von DNA-Reparaturgenen und Zytokine-Konzentration in Plasma fest (4). Außerdem gab es synergistische Effekte zwischen der Aktivierung des Immunsystems, dem adrenergen Signalweg und der zellulären Antwort auf DNA-Schäden, die durch die Umweltbedingungen, wie die fehlende Schwerkraft, beeinflusst werden (4). In gleicher Weise stelle ich die Frage, ob Individuen, die eingesperrt, isoliert und einer hohen Arbeitsbelastung ausgesetzt sind, fehlregulierte Gene aufweisen, die an den obengenannten zellulären Prozessen beteiligt sind. Die Aktivierung sowohl des adrenergen Signalweges kann sowohl das DNA-Reparatursystem als auch die Immunantwort beeinflussen und somit den croos-talk zwischen DNA-Reparatur und Immunantwort beeinträchtigen. Daher reichen Forschungsstrategien, die auf einen einzelnen betroffenen zellulären Prozess abzielen, möglicherweise nicht aus, um komplexe Zusammenhänge zu verstehen. Daher zielt dieses Projekt darauf ab, die Beziehung zwischen den drei wichtigsten zellulären Reaktionen zu untersuchen.

Folgende Gene wurden mittels RT-PCR aus dem Blut von 16 Teilnehmer*innen je 10 Zeitmesspunkte (10 Tange bevor Isolation, 7 Messpunkte während Isolation und 2 Punkte nach der Isolation) untersucht.

- Adrenerges System: NR3C1, ADCY3, ADRB2, ARRB2, CREB1, SRC
- Zelluläre Antwort auf DNA-Schäden: APEX1, ATM, ATR, BRCA1, BRACA2, CDK1, CDKN1A, CDKN2A ERCC1, FEN1, LIG1, MLH1, MRE11A, MSH3, NBN, OGG1, PARP1, PCNA, PRKACA, RAD50, TP53, TP53BP1, XRCC1, XRCC6, END1 (DNA-Reparatur); BAX, BCL2, CASP1, CASP2, NOL3 (Apoptose); CAT, SOD1, SIRT1, CYGB, GPX3, NOS2 (oxidativer Stress)
- Immunsystem: CCR1, CCR2, CCR8, CD27, CD86, CXCL10, CXCR3, ICAM, IFNG, MYD88, NFKB1, RELA, RIPK2, SLC11A1, STAT2, STAT4, TLR4, TLR6, TNF, CCL2, CCL5, CCL8, CCL17, EGF, IL1A, IL1B, IL1R1, IL4, IL5, IL6, IL6R, IL8, IL9, IL10, IL13, IL18, VGF

Die 16 Teilnehmer*innen wurden in Gruppen (je 4 Personen) aufgeteilt und jede Gruppe nahm in einer „Mission“ (Missionen 1, 3, 4 und 5) teil. In Mission 5 wurden bei 8 Zeitpunkten Blut abgenommen. Von einer Probe konnte nicht genug RNA isoliert werden, deshalb sind es insgesamt 15 Individuen und davon fehlen bei 4 Individuen (Mission 5) die Daten der Blutabnahme am Tag 45 und +1.

RPLPO und RPL13A wurden als Referenzgene eingesetzt. Beide Gene verändern ihre Expression über die Teilnehmer und Zeitpunkte nicht (Abb.1)

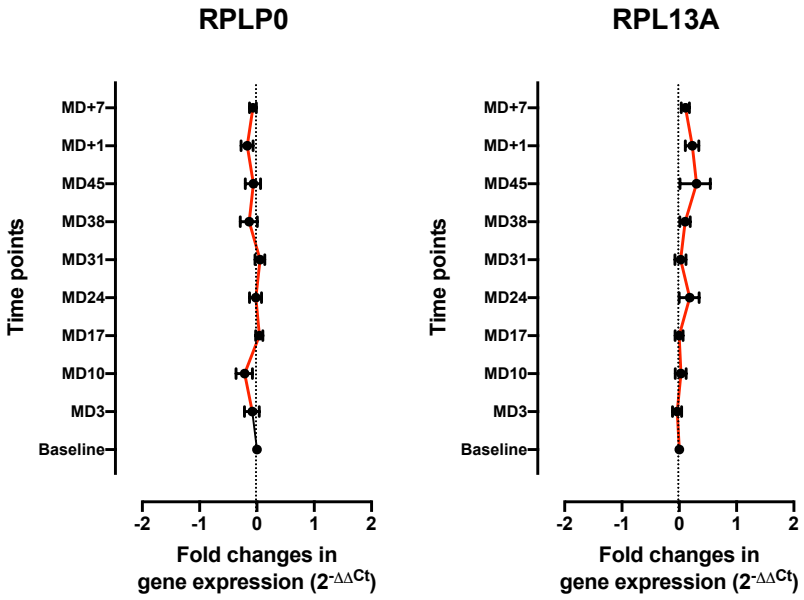

Abb. 1: Expression von Refenrenzgenen über die Zeit. Baseline =10 Tage bevor Isolation, M3-M45 = Tage in Isolation, MD+1 = ein Tag nach Isolation und MD+7 = sieben Tage nach Isolation. Fehlerbalken representieren SEM von 15 Individuen

Folgende Gene weisen keinen Unterschied auf:

- Adrenerges System:
- Zelluläre Antwort auf DNA-Schäden: CDK1, CDKN1A, CDKN2A, BRCA1, BRCA2, END1 NOL3 CYGB, GPX3, NOS2, CAT
- Immunsystem: CCR8, CD27, CXCL10, CCL2, CCL5, CCL8, CCL17, EGF, IL1A, IL1B, IL1R1, IL4, IL5, IL6, IL6R, IL8, IL9, IL10, IL13, IL18, NFKB1, VGF

Folgende Gene sind hochreguliert:

- Adrenerges System: NR3C1, ADCY3, ADRB2, ARRB2, CREB1, SRC
- Zelluläre Antwort auf DNA-Schäden: APEX1, ATM, ATR, CDKN1A, ERCC1, FEN1, LIG1, MLH1, MRE11A, MSH3, NBN, OGG1, PARP1, PCNA, PRKACA, RAD50, TP53,

TP53BP1, XRCC1, XRCC6, (DNA-Reparatur); BAX, BCL2, CASP1, CASP2, (Apoptose); CAT, SOD1, SIRT1(oxidativer Stress)

- Immunsystem: CCR1, CCR2, CD86, CXCR3, ICAM, IFNG, MYD88, NFKB1, RELA, RIPK2, SLC11A1, STAT2, STAT4, TLR4, TLR6, TNF

Obwohl nicht alle Gene gleichmäßig hochreguliert sind, sind die meisten in den ersten 2 Wochen Isolation hochreguliert. Um die Tage 24-31 unterscheiden sie sich nicht vom basalen Wert und werden wieder hochreguliert bis zu den Tagen nach der Isolation, bei dem sie den basalen Wert wieder erreichen (Beispiele Abb.2).

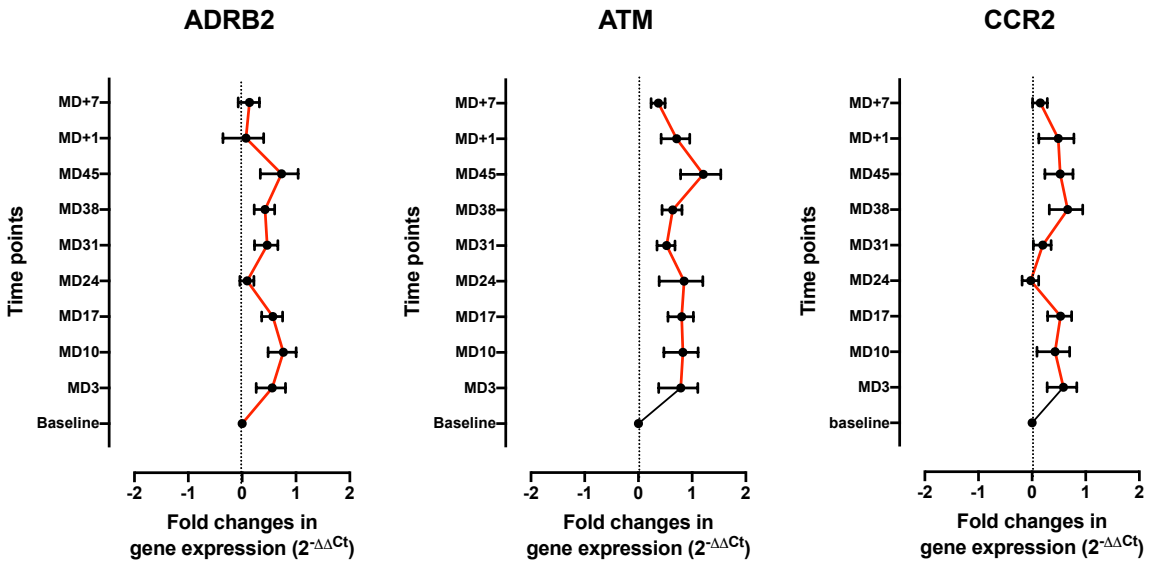

Abb.2: Expression von ADRB2 (adrenerges System), ATM (DNA-Reparatur System) und CCR2 (Immunsystem) über die Zeit. Baseline =10 Tage bevor Isolation, M3-M45 = Tage in Isolation, MD+1 = ein Tag nach Isolation und MD+7 = sieben Tage nach Isolation. Fehlerbalken repräsentieren SEM von 15 Individuen

Folgende Gene sind herunterreguliert:

- Adrenerges System:
- Zelluläre Antwort auf DNA-Schäden:
- Immunsystem: RIPK2

ADRB2 ist der am häufigsten exprimierte adrenerge Rezeptor in Immunzellen. Abhängig vom Zelltyp reguliert die adrenerge Signalübertragung eine Vielzahl von Funktionen in Immunzellen, wie z.B. Zellmigration und Produktion von Zytokinen. Seine Aktivierung in DCs und CD4+ T-Zellen führt zu erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegeln mit daraus resultierender Proteinkinase A (PKA)-abhängiger CREB-Phosphorylierung. Deshalb ist es nicht verwunderlich, dass CREB und ARRB2 stark assoziiert sind. Interessant ist der Zusammenhang zwischen ADRB2 und Immune (CCR2, CXCR3) und DNA-Reparatur (APEX1, NBN, PARP1 RAD51, SIRT) Gene (Tabelle 1). Dieser Zusammenhang wird deutlicher während der Isolation obwohl keine signifikanten Unterschiede gegenüber nach der Isolation gefunden wurde.

	ADCY3	CREB1	ARRB2	CCR2	CXCR3	SIRT1	APEX1	NBN	PARP1	RAD50
1/slope	0,8313	1,658	1,542	1,428	3,672	1,787	1,055	1,238	1,382	1,624
R squared	0,819	0,6421	0,7803	0,6318	0,5856	0,4929	0,8013	0,7922	0,7309	0,6252
Sy.x	0,1318	0,105	0,08022	0,1246	0,05341	0,1323	0,1101	0,09648	0,1024	0,1112
F	22,62	8,969	17,76	8,578	7,064	4,859	20,17	19,06	13,58	8,341
DFn, DFd	1, 5	1, 5	1, 5	1, 5	1, 5	1, 5	1, 5	1, 5	1, 5	1, 5
P value	**0,005**	**0,030**	**0,008**	**0,03**	**0,045**	**0,07**	**0,00**	**0,007**	**0,014**	**0,034**
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

Tabelle 1: Regression Analysis von ADRB2 Gen. Änderung in ADRB2 Expression kann die Expression von ADCY3, CREB, ARRB2, CCR2, CXCR3, SIRT1, APEX1, NBN, PARP1 und RAD50 mit statistischer Signifikanz vorhersagen.

Außerdem verändert sich der Zusammenhang zwischen einigen Genen während der Isolation. Deutlich wird es aber, dass der Isolationstag 24 (MD24) vergleichbar ist mit dem basalen Wert (MD+7) und das Individuen unterschiedlich auf die Isolation reagieren (Beispiel ADRB2 vs. APEX1 Abbildung 3)

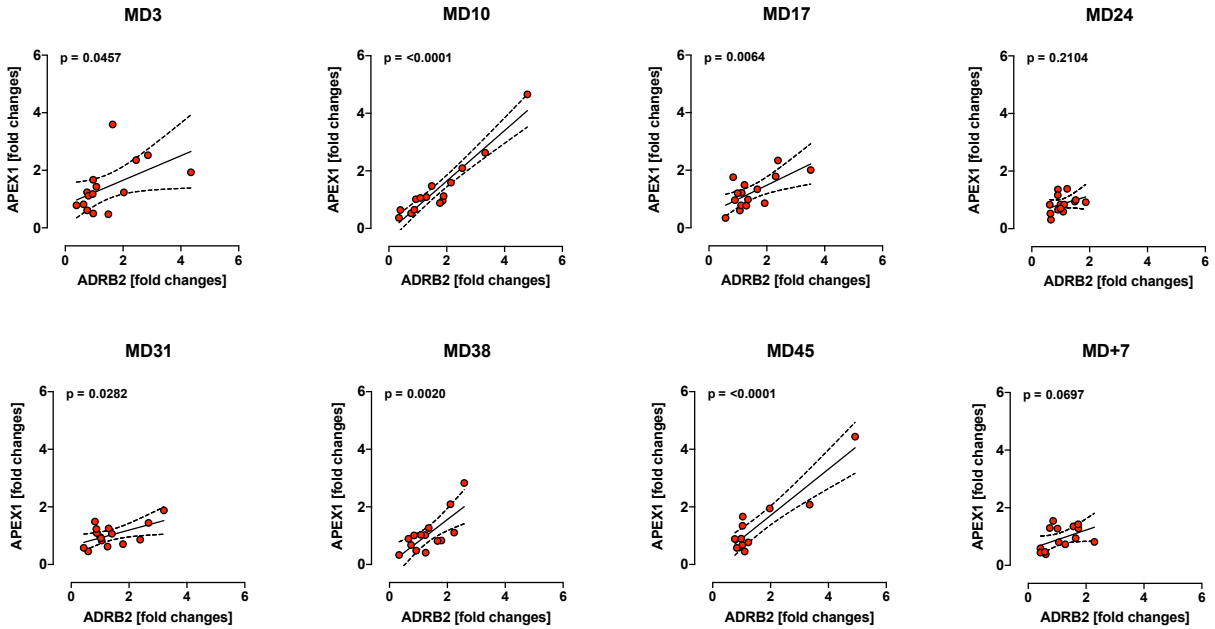

Tabelle 1: Regression Analysis zwischen ADRB2 und APEX1 Genen in jedem Tag der Isolation (MD3-MD45) und eine Woche danach (MD+7). Rote Punkte repräsentieren die Individuen die in der Studie teilgenommen haben.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass es einen Zusammenhang zwischen Genen der verschiedenen Signalwege (Adrenerger, DNA-Reparatur und Immunsystem) gibt, welche sich zum Teil während der Isolation verändert. Diese Veränderung ist womöglich Individuum und/oder Stresslevel abhängig. Daten über den Stresslevel der Teilnehmer*innen wurden von anderen Wissenschaftlern*innen erhoben und können bei der NASA gefragt werden. Es ist

geplant andere interessante und relevante Daten anzufragen um diese Ergebnisse zu erweitern und zu interpretieren.

2. Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Zuwendung wurde entsprechend dem Gesamtfinanzierungsplan verwendet. Die wichtigsten Positionen waren Personalausgaben und Sachmittel. Die Personalmittel waren notwendig, um das wissenschaftlich geschulte Fachpersonal zur Untersuchung der Genexpression zu entlohnen. Die Zuwendung wurde entsprechend dem Gesamtfinanzierungsplan verwendet. Aufgrund der obengenannten zeitlichen Verschiebung (siehe Zwischenbericht) wurden die Personalmittel verspätet abgerufen, jedoch entsprechend ihrer Position. Die zeitliche Umwidmung der Finanzmittel erfolgte mit dem Einverständnis der Projektleitung nach schriftlichem Antrag.
Alle genannten Zuwendungen waren notwendig, um die Studien ordnungsgemäß und entsprechend den wissenschaftlichen Gütekriterien durchzuführen. Die kostenneutralen Verlängerungen waren notwendig um die Studie abschließen zu können und den wissenschaftlichen Nutzen des Gesamtvorhabens zu sichern.

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die Notwendigkeit der Förderung ergibt sich daraus, dass die Fachgruppe Sportwissenschaft der Universität Konstanz weder freie Personalkapazitäten noch Finanzmittel hatte, um die im Projekt angefallenen Arbeitszeiten und notwendigen Sachausgaben zu decken. Selbstverständlich wurden alle vorhandenen Gerätschaften sowie die spezifische Fachexpertise und die Arbeitszeiten für die Aufgaben der Projektleitung in das Projekt einbezogen. Zudem wurde der Antrag für den nicht-wirtschaftlichen Bereich der Universität gestellt. Die Mangel an Bewerbungen, um die Stelle zu besetzen, konnte zum Zeitpunkt der Antragstellung noch nicht abgesehen werden und deshalb auch die Verlängerung des Vorhabens.
Die Notwendigkeit der geleiteten Arbeit ergibt sich aus den Zielen des Vorhabens: um die Beziehung zwischen verschiedenen zellulären Überlebensmechanismen zu untersuchen waren die im Antrag genannten Messungen notwendig.

4. Voraussichtlicher Nutzen, insbesondere Verwertbarkeit des Ergebnisses im Sinne des fortgeschriebenen Verwertungsplans

Bei dem Forschungsvorhaben handelt es sich um Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Molekularbiologie. Ein direkter Nutzen ist zunächst nicht ableitbar. Die Ergebnisse erweitern das Verständnis über die Auswirkungen von Stress auf die genomische Stabilität und DNA-Reparatur und deren Auswirkungen auf das Immunsystem während der Isolation und sind neben

dem Nutzen für bemannte Welt-Raumfahrt Missionen auch in klinischen Kontexten vor allem in Bereich stressbedingte Immunsuppression relevant.

5. Während der Durchführung des Vorhabens dem ZE bekannt gewordenen Fortschritts auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Uns sind während der Durchführung des Vorhabens keine Fortschritte bei anderen Stellen auf dem Gebiet des Vorhabens bekannt.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Bisher wurden keine Publikationen in internationalen wissenschaftlichen Zeitschriften mit peer-review Verfahren veröffentlicht. Eine Publikation ist bis Ende des Jahres geplant, so wie die Präsentation der Ergebnisse at NASA Investigators Workshop in Galveston in Februar 2025 vorgesehen.

LITERATUR

1. Neves-Costa A, Moita LF. Modulation of inflammation and disease tolerance by DNA damage response pathways. FEBS J. 2017;284(5):680-98.
2. Fontes FL, Pinheiro DM, Oliveira AH, Oliveira RK, Lajus TB, Agnez-Lima LF. Role of DNA repair in host immune response and inflammation. Mutat Res Rev Mutat Res. 2015;763:246-57.
3. Bednarski JJ, Sleckman BP. At the intersection of DNA damage and immune responses. Nat Rev Immunol. 2019;19(4):231-42.
4. Moreno-Villanueva M, Feiveson AH, Krieger S, Kay Brinda A, von Scheven G, Burkle A, et al. Synergistic Effects of Weightlessness, Isoproterenol, and Radiation on DNA Damage Response and Cytokine Production in Immune Cells. Int J Mol Sci. 2018;19(11).
5. Patel ZS, Brunstetter TJ, Tarver WJ, Whitmire AM, Zwart SR, Smith SM, et al. Red risks for a journey to the red planet: The highest priority human health risks for a mission to Mars. NPJ Microgravity. 2020;6(1):33.
6. Afshinnekoo E, Scott RT, MacKay MJ, Pariset E, Cekanaviciute E, Barker R, et al. Fundamental Biological Features of Spaceflight: Advancing the Field to Enable Deep-Space Exploration. Cell. 2020;183(5):1162-84.
7. Campos AC, Fogaca MV, Aguiar DC, Guimaraes FS. Animal models of anxiety disorders and stress. Braz J Psychiatry. 2013;35 Suppl 2:S101-11.
8. Takatsu-Coleman AL, Patti CL, Zanin KA, Zager A, Carvalho RC, Borcoi AR, et al. Short-term social isolation induces depressive-like behaviour and reinstates the retrieval of an aversive task: mood-congruent memory in male mice? J Psychiatry Neurosci. 2013;38(4):259-68.
9. Famitafreshi H, Karimian M. Assessment of Improvement in Oxidative Stress Indices with Resocialization in Memory Retrieval in Y-Maze in Male Rats. J Exp Neurosci. 2018;12:1179069518820323.
10. Gadek-Michalska A, Tadeusz J, Bugajski A, Bugajski J. Chronic Isolation Stress Affects Subsequent Crowding Stress-Induced Brain Nitric Oxide Synthase (NOS) Isoforms and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis Responses. Neurotox Res. 2019;36(3):523-39.

11. Colaianna M, Schiavone S, Zotti M, Tucci P, Morgese MG, Backdahl L, et al. Neuroendocrine profile in a rat model of psychosocial stress: relation to oxidative stress. Antioxid Redox Signal. 2013;18(12):1385-99.
12. Stevenson JR, McMahon EK, Boner W, Haussmann MF. Oxytocin administration prevents cellular aging caused by social isolation. Psychoneuroendocrinology. 2019;103:52-60.
13. Krugel U, Fischer J, Bauer K, Sack U, Himmerich H. The impact of social isolation on immunological parameters in rats. Arch Toxicol. 2014;88(3):853-5.
14. Pagel JI, Chouker A. Effects of isolation and confinement on humans-implications for manned space explorations. J Appl Physiol (1985). 2016;120(12):1449-57.
15. Yi B, Rykova M, Feuerecker M, Jager B, Ladinig C, Basner M, et al. 520-d Isolation and confinement simulating a flight to Mars reveals heightened immune responses and alterations of leukocyte phenotype. Brain Behav Immun. 2014;40:203-10.
16. Smith KJ, Gavey S, NE RI, Kontari P, Victor C. The association between loneliness, social isolation and inflammation: A systematic review and meta-analysis. Neurosci Biobehav Rev. 2020;112:519-41.
17. Strewe C, Muckenthaler F, Feuerecker M, Yi B, Rykova M, Kaufmann I, et al. Functional changes in neutrophils and psychoneuroendocrine responses during 105 days of confinement. J Appl Physiol (1985). 2015;118(9):1122-7.
18. Basner M, Dinges DF, Mollicone DJ, Savelev I, Ecker AJ, Di Antonio A, et al. Psychological and behavioral changes during confinement in a 520-day simulated interplanetary mission to mars. PLoS One. 2014;9(3):e93298.
19. Jacubowski A, Abeln V, Vogt T, Yi B, Chouker A, Fomina E, et al. The impact of long-term confinement and exercise on central and peripheral stress markers. Physiol Behav. 2015;152(Pt A):106-11.
20. Yi B, Matzel S, Feuerecker M, Horl M, Ladinig C, Abeln V, et al. The impact of chronic stress burden of 520-d isolation and confinement on the physiological response to subsequent acute stress challenge. Behav Brain Res. 2015;281:111-5.
21. Shearer WT, Lee BN, Cron SG, Rosenblatt HM, Smith EO, Lugg DJ, et al. Suppression of human anti-inflammatory plasma cytokines IL-10 and IL-1RA with elevation of proinflammatory cytokine IFN-gamma during the isolation of the Antarctic winter. J Allergy Clin Immunol. 2002;109(5):854-7.
22. Aivaliotis IL, Pateras IS, Papaioannou M, Glytsou C, Kontzoglou K, Johnson EO, et al. How do cytokines trigger genomic instability? J Biomed Biotechnol. 2012;2012:536761.
23. Akhtar S, Najafzadeh M, Isreb M, Newton L, Gopalan RC, Anderson D. ROS-induced oxidative damage in lymphocytes ex vivo/in vitro from healthy individuals and MGUS patients: protection by myricetin bulk and nanoforms. Arch Toxicol. 2020;94(4):1229-39.
24. Cemeli E, Anderson D. Mechanistic investigation of ROS-induced DNA damage by oestrogenic compounds in lymphocytes and sperm using the comet assay. Int J Mol Sci. 2011;12(5):2783-96.
25. Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. FASEB J. 2003;17(10):1195-214.
26. Flint MS, Baum A, Chambers WH, Jenkins FJ. Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. Psychoneuroendocrinology. 2007;32(5):470-9.
27. Jaiswal M, LaRusso NF, Burgart LJ, Gores GJ. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. Cancer Res. 2000;60(1):184-90.
28. Moreno-Villanueva M, Burkle A. Stress Hormone-Mediated DNA Damage Response--Implications for Cellular Senescence and Tumour Progression. Curr Drug Targets. 2016;17(4):398-404.
29. Rosales AL, Cunningham JM, Bone AJ, Green IC, Green MH. Repair of cytokine-induced DNA damage in cultured rat islets of Langerhans. Free Radic Res. 2004;38(7):665-74.
30. Thomas M, Palombo P, Schuhmacher T, von Scheven G, Bazylianska V, Salzwedel J, et al. Impaired PARP activity in response to the beta-adrenergic receptor agonist isoproterenol. Toxicol In Vitro. 2018;50:29-39.

31. Topalovic D, Dekanski D, Spremo-Potparevic B, Djelic N, Bajic V, Zivkovic L. Assessment of adrenaline-induced DNA damage in whole blood cells with the comet assay. Arh Hig Rada Toksikol. 2018;69(4):304-8.
32. Rivera-Munoz P, Malivert L, Derdouch S, Azerrad C, Abramowski V, Revy P, et al. DNA repair and the immune system: From V(D)J recombination to aging lymphocytes. Eur J Immunol. 2007;37 Suppl 1:S71-82.
33. Nakad R, Schumacher B. DNA Damage Response and Immune Defense: Links and Mechanisms. Front Genet. 2016;7:147.
34. Morath J, Moreno-Villanueva M, Hamuni G, Kolassa S, Ruf-Leuschner M, Schauer M, et al. Effects of psychotherapy on DNA strand break accumulation originating from traumatic stress. Psychother Psychosom. 2014;83(5):289-97.
35. Moreno-Villanueva M, von Scheven G, Feiveson A, Burkle A, Wu H, Goel N. The degree of radiation-induced DNA strand breaks is altered by acute sleep deprivation and psychological stress and is associated with cognitive performance in humans. Sleep. 2018;41(7).
36. Moreno-Villanueva M, Kramer A, Hammes T, Venegas-Carro M, Thumm P, Burkle A, et al. Influence of Acute Exercise on DNA Repair and PARP Activity before and after Irradiation in Lymphocytes from Trained and Untrained Individuals. Int J Mol Sci. 2019;20(12).