



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Ermittlung des DNA-schützenden Potentials erhöhter  
Blut-Bilirubinspiegel mittels  
Micronucleus Assay“

Verfasserin

Maria Theresia Gräfin zu Pappenheim

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

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

**DANKSAGUNG**

Ich möchte mich herzlich bei Dr. Ao. Univ.-Prof. Karl-Heinz Wagner und Mag. Marlies Wallner für die geduldige und intensive Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit bedanken.

Für die Unterstützung in technischen Fragen und Fragen der statistischen Auswertung auch ein herzliches Dankeschön an Mag. Elisabeth Müllner und Dr. Andrew Bulmer, die sich Zeit für meine Fragen nahmen.

Des Weiteren vielen Dank auch an meine Kolleginnen Katharina Marisch, Sonja Adrigan, Roswitha Stieglmayer und Marie Bulla für die gemeinschaftliche lange und intensive Laborzeit, die dank ihnen kurzweilig war.

Insbesondere danke ich meiner Familie und Ernst Schönfeldt, die mich während des gesamten Studiums unterstützten und auch in schwierigen Zeiten viel Geduld und Verständnis für mich aufbrachten. Speziell möchte ich meinen Eltern für den unerschütterlichen Glauben an mich danken, der scheinbar Unmögliches möglich gemacht hat.



## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 1. EINLEITUNG .....                                                | 1  |
| 2. LITERATURÜBERSICHT .....                                        | 2  |
| 2. 1.    Bilirubin.....                                            | 2  |
| 2. 1. 1.    Stoffwechsel des Bilirubin .....                       | 2  |
| 2. 1. 2.    Hyperbilirubinämien .....                              | 4  |
| 2. 1. 3.    Auswirkungen einer Hyperbilirubinämie .....            | 8  |
| 2. 2.    Micronucleus Assay (CBMN cytome Assay).....               | 14 |
| 2. 2. 1.    Allgemeine Aspekte zu DNA-Schäden.....                 | 14 |
| 2. 2. 2.    Verschiedene Endpunkte der Chromosomenschädigung ..... | 19 |
| 2. 2. 3.    Einflussfaktoren auf die Mikrokernbildung.....         | 20 |
| 2. 2. 4.    Der CBMN cytome Assay als Biomarker für Krebs .....    | 24 |
| 2. 3.    Micronucleus Assay und Bilirubin .....                    | 26 |
| 3. MATERIALIEN UND METHODEN.....                                   | 28 |
| 3. 1.    Studiendesign .....                                       | 28 |
| 3. 2.    Probandenrekrutierung.....                                | 29 |
| 3. 3.    Der CBMN cytome Assay .....                               | 31 |
| 3. 3. 1.    Verwendete Chemikalien .....                           | 31 |
| 3. 3. 2.    Testprinzip .....                                      | 31 |
| 3. 3. 3.    Probenaufbereitung .....                               | 32 |
| 3. 3. 4.    Probenauswertung.....                                  | 36 |
| 3. 3. 5.    Datenberechnung .....                                  | 40 |
| 3. 4.    Bilirubin im Serum .....                                  | 41 |
| 3. 5.    Datenauswertung .....                                     | 41 |
| 4. ERGEBNISSE.....                                                 | 42 |
| 4. 1.    Deskriptive Statistik .....                               | 42 |
| 4. 2.    Der Einfluss von unkonjugiertem Serum-Bilirubin.....      | 43 |
| 4. 3.    Geschlechtsspezifische Unterschiede .....                 | 49 |

|          |                                                               |    |
|----------|---------------------------------------------------------------|----|
| 4. 4.    | Altersbedingte Einflüsse .....                                | 52 |
| 4. 5.    | Lebensalter, Geschlecht und Bilirubin .....                   | 54 |
| 4. 5. 1. | Einflussfaktor Alter bei Männern und Frauen .....             | 54 |
| 4. 5. 2. | Einflussfaktor Bilirubin bei Männern und Frauen .....         | 54 |
| 4. 5. 3. | Einflussfaktor Bilirubin in verschiedenen Altersgruppen ..... | 55 |
| 4. 6.    | Der Einfluss weiterer Parameter .....                         | 59 |
| 5.       | DISKUSSION .....                                              | 60 |
| 6.       | SCHLUSSBETRACHTUNG .....                                      | 64 |
| 7.       | ZUSAMMENFASSUNG .....                                         | 65 |
| 8.       | SUMMARY .....                                                 | 67 |
| 9.       | REFERENZEN .....                                              | 68 |

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Strukturformel von Bilirubin .....                                | 2  |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung: Entstehung von MNi und NPBs .....       | 18 |
| Abbildung 3: Isolierung der Lymphozyten aus Heparinblut .....                  | 33 |
| Abbildung 4: Zeitliche Abfolge des CBMN cyt Assay .....                        | 34 |
| Abbildung 5: Fotografien von Zweikernzellen .....                              | 37 |
| Abbildung 6: Fotografien von Monokernzellen .....                              | 37 |
| Abbildung 7: Fotografie einer Multikernzellen .....                            | 37 |
| Abbildung 8: Fotografien von apoptotischen Zellen .....                        | 37 |
| Abbildung 9: Fotografien von nekrotischen Zellen .....                         | 38 |
| Abbildung 10: Fotografien von Zweikernzellen mit MNi .....                     | 38 |
| Abbildung 11: Fotografien von Zellen mit NPBs.....                             | 39 |
| Abbildung 12: Fotografien von Zellen mit NBUDs.....                            | 39 |
| Abbildung 13: Alter und Geschlecht der Studienpopulation .....                 | 42 |
| Abbildung 14: MN-Häufigkeit in Gilbert Syndrom und Kontrolle.....              | 44 |
| Abbildung 15: NPB-Häufigkeit in Gilbert Syndrom und Kontrolle .....            | 44 |
| Abbildung 16: NBUD-Häufigkeit in Gilbert Syndrom und Kontrolle .....           | 45 |
| Abbildung 17: Häufigkeit von Apoptosen in Gilbert Syndrom und Kontrolle.....   | 45 |
| Abbildung 18: Häufigkeit von Nekrosen in Gilbert Syndrom und Kontrolle .....   | 46 |
| Abbildung 19: NDI in Gilbert Syndrom und Kontrolle .....                       | 46 |
| Abbildung 20: NDCI in Gilbert Syndrom und Kontrolle.....                       | 47 |
| Abbildung 21: Korrelation Serumkonzentration UCB und NBUD-Häufigkeit .....     | 48 |
| Abbildung 22: Korrelation Serumkonzentration UCB und Nekrosen-Häufigkeit ..... | 48 |
| Abbildung 23: MN-Häufigkeit bei Männern und Frauen .....                       | 50 |
| Abbildung 24: Häufigkeit von Nekrosen bei Männern und Frauen .....             | 50 |
| Abbildung 25: NDI bei Männern und Frauen.....                                  | 51 |
| Abbildung 26: NDCI bei Männern und Frauen .....                                | 51 |
| Abbildung 27: Korrelation Lebensalter und Häufigkeit von MNi .....             | 52 |
| Abbildung 28: Korrelation von Lebensalter und NDI .....                        | 52 |
| Abbildung 29: Korrelation von Lebensalter und NDCI.....                        | 53 |
| Abbildung 30: Das Alter der Studienpopulation .....                            | 55 |
| Abbildung 31: Vergleich NBUD-Häufigkeit innerhalb zweier Altersgruppen.....    | 56 |

|                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 32: Vergleich MN-Häufigkeit innerhalb vierer Altersgruppen .....   | 58 |
| Abbildung 33: Vergleich NBUD-Häufigkeit innerhalb vierer Altersgruppen ..... | 58 |

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AIDS: Aquired Immuno Defiency Syndrome

2-AF: 2-Aminofluoron

ALT: Alanin Aminotransferase

AST: Aspartat Aminotransferase

AAPH: 2,2'-azobis(2-amidinopropan) hydrochlorid

BN: Binucleated cell

BVR: Biliverdin Reduktase

B( $\alpha$ )p: Benzo( $\alpha$ )pyren

Cyt-B: Cytochalasin-B

CA: Chromosome Aberrations

CBMN: Cytokinesis-block micronucleus assay

cGMP: cyclic Guanosin Monophosphate

DMSO: Dimethylsulfoxid

DNA: Desoxyribonucleic acid

FBS: Fetal Bovine Serum

GGT:  $\gamma$ -Glutamytranspeptidase

GS: Gilbert Syndrom

HDL: High Density Lipoprotein

HPLC: High Pressure Liquid Chromatography

HO: Hämoxygenase

LDH: Laktatdehydrogenase

LDL: Low Density Lipoprotein

MN: Micronucleus

MONO: Mononucleated cell

MRP: Multidrug Resistant Protein

MULT: Multinucleated cell

NBUD: Nuclear Bud

NDCl: Nuclear Division Cytotoxicity Index

NDI: Nuclear Division Index

NNK: Nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3pyridyl)-1-butanone

NPB: Nucleoplasmic Bridge

PAK: Polycyclic Aromatic Kohlenwasserstoffe

PBLs: Periphere Blutlymphozyten

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PHA: Phytohaemagglutinin

ROS: Reactive Oxygen Species

RPMI: Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)

TNFone: Trinitrofluoron

UDP: Uridinphosphat

UGT: UDP-Glucuronosyl-Transferase

## 1. EINLEITUNG

Diese Arbeit entstand im Zuge des FWF geförderten Forschungsprojekts „Antioxidative and Antigenotoxic Potential of Bile Pigments“ am Department für Ernährungswissenschaften der Universität Wien. Sie wurde in enger Zusammenarbeit mit Katharina Marisch erstellt. Recherchearbeit, Datenerhebung und Auswertung sind teilweise gemeinsam erfolgt, daher finden sich einige Inhalte ebenfalls in der Diplomarbeit meiner Kollegin.

Das Gilbert Syndrom ist eine häufige vorkommende Form von moderat erhöhtem Serumbilirubin. Bilirubin ist ein Abbauprodukt von Erythrozyten. Es zirkuliert im Blut, wird über die Galle ausgeschieden und ist ein wichtiges körpereigenes Antioxidans. Da oxidativer Stress im Körper die DNA schädigen kann, und Antioxidantien dieser Entwicklung entgegenwirken können, liegt die Vermutung nahe, dass Bilirubin ein möglicher Schutzfaktor des Erbgutes sein kann.

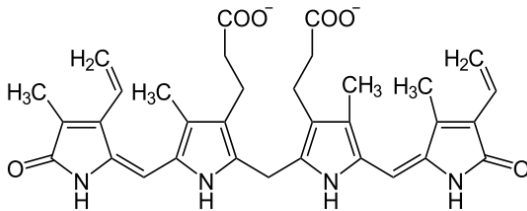
Erkrankungen deren Ursachen in erhöhtem oxidativem Stress sowie einer Schädigung des Erbgutes liegen, insbesondere Herz-, Kreislauf- und Krebserkrankungen, zeigen bei Personen mit Gilbert Syndrom laut aktuellen Forschungsergebnissen eine niedrigere Inzidenz.

Um den genauen Schutzmechanismus, der möglicherweise in der Zukunft medizinisch ausgenutzt werden kann, aufzuklären ist es unter anderem erforderlich die Wirkung erhöhten Bilirubins auf der DNA-Ebene zu betrachten. Hierzu wird in dieser Arbeit der Micronucleus Assay genutzt. Diese Methode wurde schon häufig in anderen Zusammenhängen, jedoch noch nie zur Erforschung einer möglichen DNA-schützenden Wirkung erhöhter Blutbilirubinspiegel eingesetzt. Der Micronucleus Assay ist eine zuverlässige und gut evaluierte Methode um fortgeschrittene DNA-Schäden und Mutationen zu messen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher zu erforschen, ob moderat erhöhtes Blutbilirubin zu einer Reduktion von Schäden auf DNA-Ebene führt.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2. 1. Bilirubin



**Abbildung 1:** Strukturformel von Bilirubin

Nach: [<http://de.wikipedia.org/wiki/Bilirubin>].

Bilirubin zählt zu den Gallenfarbstoffen. Sie entstehen beim Abbau der Porphyrine, wozu neben anderen Verbindungen auch das Häm-Molekül aus den roten Blutkörperchen zählt. In mehreren Schritten wird das Molekül gespalten und verstoffwechselt, wobei verschiedene Verbindungen mit unterschiedlicher Färbung entstehen.

Zunächst wird das grüne Biliverdin gebildet, das anschließend in das goldene Bilirubin reduziert wird. Dieses gelangt mit dem Blut in die Leber und wird als wasserlösliches Diglukuronid in der Galle gespeichert. Im Anschluss wird es als Stercobilin (orange / gelb) über die Zwischenstufe Stercobilinogen (farblos) über den Darm ausgeschieden.

Der tägliche Hämoglobinumsatz entspricht annähernd der täglichen Ausscheidung an Gallenfarbstoffen und beträgt etwa 90 mg/kg Körpergewicht. Somit werden täglich etwa 220–250 mg Bilirubin gebildet und größtenteils als Stercobilin mit dem Faeces ausgeschieden. Die Gallenfarbstoffe unterliegen dem enterohepatischen Kreislauf und können bei starkem Häm-Abbau auch durch das Blut zur Niere gelangen und dort als Urobilinogen ausgeschieden werden, wo es durch Oxidation in das dunklere Urobilin umgewandelt wird [LÖFFLER, 2004; KOOLMAN und RÖHM, 2002].

#### 2. 1. 1. Stoffwechsel des Bilirubin

Bilirubin ist ein Abbauprodukt des Häm-Moleküls, das unter anderem beim Abbau von Erythrozyten aus dem Hämoglobin frei wird. Auch bestimmte

Enzyme, sogenannte Hämproteine, zu denen die Cytochrome zählen, enthalten Häm. Es kann nicht wiederverwertet werden und wird in mehreren Schritten abgebaut.

Katalysiert durch die Hämoxxygenase (HO) wird es zunächst an der Methinbrücke zwischen den Pyrrolringen A und B oxidativ gespalten. Von diesem Enzym sind 2 Isotypen bekannt, die Produkte unterschiedlicher Gene sind. Die Hämoxxygenase 1 wird durch verschiedene Stimulatoren, die zu oxidativem Stress führen induziert. Dazu gehören freie Sauerstoffradikale, Schwermetalle, bakterielle Lipopolysaccharide, Wasserstoffperoxid und ultraviolettes Licht. Nicht-induzierbar ist hingegen die Hämoxxygenase 2. Sie wird in verschiedenen Organen und Geweben gebildet. Dadurch entsteht Kohlenmonoxid, Eisen und Biliverdin, das durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert wird [VITEK und SCHWERTNER, 2007; LÖFFLER, 2004].

Diese ersten Abbauschritte finden in retikulo-endothelialen Zellen von Milz, Leber und Knochenmark statt, wobei sich das Molekül von blaurot (Häm) über grün (Biliverdin) schließlich zu gelb (Bilirubin) ändert, was an den Veränderungen des konjugierten Doppelbindungssystems im Molekül liegt.

An Albumin gebunden wird Bilirubin nun im Blut transportiert und gelangt in die Leber. Hier wird Bilirubin im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Hepatozyten durch das Enzym UDP-Glucuronosyl-Transferase mit UDP-Glukuronsäure konjugiert. Die gebildeten wasserlöslichen Bilirubinmono- und -diglukuronide können über die Galle ausgeschieden werden. Im Darm wird es durch Darmbakterien unter Abspaltung der Glukuronsäuren ( $\beta$ -Glukuronidasen) zu Stercobilinogen abgebaut und größtenteils mit dem Stuhl ausgeschieden. Ein Teil gelangt über den enterohepatischen Kreislauf zurück zur Leber und wird erneut über die Galle in den Darm abgegeben. Im Urin wird Stercobilinogen als Urobilinogen bei starkem Häm-Abbau ausgeschieden [KOOLMAN und RÖHM, 2002].

Bilirubin weist für die Glukuronierung 2 Angriffsstellen auf, daher entstehen sowohl Diglukuronate als auch Monoglukuronate. UDP-Glucuronosyl-

Transferase (UGT) katalysiert diese Reaktion, wobei UGT1, eine Isoform des Enzyms dem BR-Molekül eine hydrophile Seitenkette einfügt. UGT 2 hingegen dient eher der Steroidmetabolisierung und hat wahrscheinlich eine geringe Bedeutung bei der Bilirubin-Glukuronierung. Die Konjugation erfolgt mit Glukuronsäure, aber auch Xylose und Glucose, durch Abspaltung von UDP (Uridinphosphat) von der UDP-Glukuronsäure.

Aus dem ER gelangt das konjugierte Bilirubin durch die Membran in das Zytosol und wird durch einen Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen Transporter an die Gallenflüssigkeit abgegeben [RYTER und TYRRELL, 2000; IYANAGI et al., 1998].

Die tägliche Syntheserate des Gesamtbilirubin beträgt etwa 0,25 g und physiologische Plasmakonzentrationen liegen zwischen 0,1–1,2 mg/dl (bzw. 1,7–20,5  $\mu\text{mol/l}$ ). 80 bis 90 % des Bilirubin liegen im Plasma unkonjugiert an Albumin gebunden vor (10–20 % sind konjugiert), wobei ein Albuminmolekül zwei Moleküle Bilirubin binden kann. Die Affinität zum zweiten Molekül ist aber wesentlich geringer, wodurch meist nur 1 Molekül gebunden wird [VITEK und OSTROW, 2009; LÖFFLER et al., 2007; STOCKER, 2004; MCDONAGH, 2001].

### **2. 1. 2. Hyperbilirubinämien**

Bei genauer Betrachtung gilt ein Wert von über 1,2 mg/dl (20,52  $\mu\text{mol/l}$ ) Gesamtbilirubin beziehungsweise von über 1 mg/dl (17,1  $\mu\text{mol/l}$ ) unkonjugiertes Bilirubin als erhöht. Von starker Hyperbilirubinämie spricht man ab einer Konzentration von etwa 2–3 mg/dl (34–51  $\mu\text{mol/l}$ ) Gesamtbilirubin. In diesem Fall kommt es zu einem Ikterus, was in leichter Ausprägung an den Skleren der Augen sichtbar wird und bei stark erhöhten Werten auch zu einer Gelbfärbung der Haut führt [LÖFFLER et al., 2007; KOOLMAN und RÖHM, 2002].

## **2. 1. 2. 1.      Erworbene Hyperbilirubinämien**

### **a) Hämolytischer Ikterus (prähepatischer Ikterus)**

Durch verstärkte Hämolyse (Abbau der Erythrozyten) fällt zu viel Bilirubin an. Die Leber kommt mit der Ausscheidung nicht nach. In diesem Fall erhöht sich besonders die unkonjugierte Form [SILBERNAGL und DESPOPOULOS, 2003]. Das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) sowie Kalium weisen bereits bei schwacher Hämolyse ebenfalls eine erhöhte Konzentration im Blut auf [LÖFFLER et al., 2007].

### **b) Hepatozellulärer Ikterus (intrahepatischer Ikterus)**

In diesem Fall kann die Leber das Bilirubin aufgrund einer Schädigung der Leberzellen nicht abbauen. Leberzirrhose, Entzündungen (Hepatitis), Medikamente, Sepsis, Alkohol oder Gifte (Knollenblätterpilz) greifen die Zellen an, wodurch sowohl der Transport als auch die Konjugation beeinträchtigt werden. Somit kommt es ebenfalls zu einem Anstieg des unkonjugierten Bilirubin im Plasma [SILBERNAGL und DESPOPOULOS, 2003; KOOLMAN und RÖHM, 2002].

Bei Lebererkrankungen treten die überwiegend leberspezifischen Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST),  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (GGT) sowie Glutamatdehydrogenase in das Serum über. Ihre Serumaktivität sowie deren Quotient (de-Ritis-Quotient) werden zu diagnostischen Zwecken bestimmt [LÖFFLER et al., 2007].

### **c) Physiologischer und Pathologischer Neugeborenenikterus**

Etwa 50 % der Neugeborenen leiden in den ersten Lebenstagen an Gelbsucht. Der Plasmabilirubinspiegel steigt durch Hämolyse auf bis zu 6 mg/dl bzw. 85,5–102,6  $\mu\text{mol/l}$  (unkonjugierte Form). Diese moderate Erhöhung ist physiologisch und bedarf in der Regel keiner Therapie, weil sich der Wert nach 1 Woche wieder normalisiert.

Verstärkte Hämolyse aufgrund von Rhesusinkompatibilität, niedrigem Geburtsgewicht, durch Frühgeburt, zystische Fibrose oder anderen genetischen Erkrankungen führen hingegen zur pathologischen Form. Im Blut des

Neugeborenen ist zu wenig Albumin, um das unkonjugierte Bilirubin zu binden. In hoher Konzentration kann es nun die Blut-Hirn-Schranke überwinden und einen Kernikterus auslösen. Unbehandelt kann dies zu geistiger Retardierung und Hörschäden führen. Behandlungsmöglichkeiten sind Phototherapie (das erhöht die Wasserlöslichkeit des Bilirubins und ermöglicht die Ausscheidung), Austausch-Transfusionen und die Gabe von Hämoxygenase-Hemmern [BESTE, 2003; SILBERNAGL und DESPOPOULOS, 2003].

#### **d) Verschlussikterus (posthepatischer Ikterus)**

Durch Gallensteine oder Tumore kann es zu einem Gallenstau (Cholestase) kommen, weil diese die Gallenwege verlegen können. Das bereits in den Leberzellen konjugierte Bilirubin kann demnach auf diesem Weg nicht ausgeschieden werden und die Plasmakonzentration steigt an [SILBERNAGL und DESPOPOULOS, 2003].

### **2. 1. 2. 2. Angeborene Hyperbilirubinämien**

#### **a) Dubin-Johnson-Syndrom**

Es handelt sich um eine Mutation des Gens, das für das MRP-2 (Multidrug Resistent Protein = ATP-abhängiger Transporter zur Abgabe des konjugierten Bilirubins an die Gallenflüssigkeit) codiert. Dieser Defekt wird autosomal-rezessiv vererbt und führt dazu, dass das konjugierte Bilirubin nicht an die Gallenflüssigkeit abgegeben werden kann und sich somit in den Hepatozyten ansammelt. Durch ein weiteres Transportprotein (MRP-3) kann dies nur teilweise kompensiert werden. In der Folge färbt sich die Leber schwarz und es kommt zu einer leichten chronischen Hyperbilirubinämie mit Gelbsucht. Die Krankheit tritt meist nach der Pubertät auf. Da sich der Bilirubinspiegel nicht dramatisch erhöht, bedarf es keiner Therapie [BESTE, 2003].

#### **b) Rotor-Syndrom**

Dieses Syndrom wird ebenfalls autosomal-rezessiv vererbt. Hierbei handelt es sich um eine Störung der Aufnahme des Bilirubin in die Leberzellen und eine defekte Ausscheidung. Konjugiertes und Gesamtbilirubin steigen im Plasma an

und es kommt zu einem milden Ikterus. Auch hier bedarf es keiner Therapie [BESTE, 2003].

### **c) Hyperbilirubinämien aufgrund einer Mutation des UGT1-Genlocus**

Dieser Genlocus codiert für das Enzym UGT, das, wie bereits erwähnt, bei der Bilirubinkonjugierung in der Leber beteiligt ist. Eine verminderte Enzymaktivität stört diese Reaktion und es kommt zu einem Anstieg des hydrophoben unkonjugierten Bilirubin, das nicht ausgeschieden werden kann. Je nachdem, welcher Art die Mutation ist, werden 2 Syndrome unterschieden:

#### **Crigler-Najjar-Syndrom**

Hierbei handelt es sich um einen sehr selten auftretenden Gendefekt, der eine annähernde oder vollständige Inaktivität der UGT zur Folge hat. Die Mutation ist in einem der 5 Exons des Gens lokalisiert, wobei eine Aminosäure ausgetauscht werden kann, der Ableserahmen verändert sein kann (frame shift), oder ein stop codon gebildet wird. Je nach Vererbungsart werden 2 Typen unterschieden:

Typ I ist sehr selten und führt zu einem kompletten Fehlen des Enzyms. In der Folge steigt das Bilirubin sehr stark an (15–50 mg/dl bzw. 256,5–855  $\mu\text{mol/l}$  oder mehr), was zu einem Kernikterus und rasch zum Tod führt (in den ersten Lebensmonaten). Behandelt werden kann dies nur durch Phototherapie oder Austauschtransfusion und letztendlich mit einer Lebertransplantation.

Typ II (Arias-Syndrom) ist weniger schwerwiegend, weil das Enzym in geringer Menge bzw. mit verminderter Aktivität (10 %) vorhanden ist. Die Plasmabilirubinkonzentration beträgt 10–20 mg/dl (bzw. 171–342  $\mu\text{mol/l}$ ). Typ II ist im Gegensatz zu Typ I mit Phenobarbital behandelbar, das das Enzym induziert [KRAEMER und SCHEURLIN, 2002].

#### **Gilbert-Syndrom (Morbus Meulengracht)**

Dies ist die häufigste Form der Hyperbilirubinämie und tritt bei 3–10 % der Bevölkerung auf, wobei Männer (12,4 %) häufiger betroffen sind als Frauen (4,8 %).

Die Enzymaktivität der UGT ist im Durchschnitt bei Personen mit dem Gilbert-Syndrom 30 % niedriger als normal. Die genaue Ursache und der genetische Mechanismus dafür sind noch nicht zur Gänze geklärt. Zusätzliche Basen (TA) in der Promotorregion (Polymorphismus) des UGT1A1-Gens wurden häufig in homozygoter Ausprägung bei betroffenen Personen beobachtet, was zu einer verminderten Expression des Gens führt.

Charakteristisch für das Gilbert-Syndrom ist ein leichter Anstieg des unkonjugierten Bilirubin (1–3 mg/dl bzw. 17,1–51,3 µmol/l), was von einer leichten Gelbsucht begleitet sein kann (ab ca. 2 mg/dl bzw. 34,2 µmol/l).

Unter Stress (Fasten, körperliche Betätigung, Krankheit oder Menstruation) kann dieser Wert stark ansteigen.

Dieser stressinduzierter Anstieg ist in leichtem Ausmaß normal; in stark ausgeprägter Form (bis zu 100 %) ist er aber typisch für das Gilbert-Syndrom und kann auch als Diagnosekriterium dienen.

Klinische Symptome des Gilbert-Syndroms sind sehr unspezifisch, denn meist zeigt sich im Alter zwischen 15 und 30 Jahren nur ein leichter Ikterus. Es kommt zur Gelbfärbung der Skleren und zusätzlich können Oberbauchschmerzen, Fettintoleranz und Müdigkeit auftreten. Als zentrales Diagnosekriterium gilt die erhöhte Plasmakonzentration des unkonjugierten Bilirubins ohne gleichzeitige Hämolyse [STRASSBURG, 2010; KRAEMER und SCHEURLEN, 2002; RADU und ATSMON, 2001; OWENS und SHERLOCK, 1973].

### **2. 1. 3.      Auswirkungen einer Hyperbilirubinämie**

Neben den für die Gesundheit und Entwicklung eher negativen Auswirkungen bei unphysiologisch hohen Bilirubinkonzentrationen, insbesondere dem Kernikterus, werden zahlreiche schützende und positive Eigenschaften des Bilirubin diskutiert. Diese können sich besonders bei moderater Erhöhung positiv auf die Gesundheit auswirken.

### **2. 1. 3. 1. Das Redox-System von Bilirubin und Biliverdin**

Die antioxidative Wirkung von Bilirubin kann heute als erwiesen angesehen werden (siehe 2.1.3.2.). Jedoch ist es derzeit noch unklar welcher Mechanismus dieser Eigenschaft zugrunde liegt. Nach einer Theorie handelt es sich um einen Redox-Zyklus zwischen Bilirubin und Biliverdin, wobei Bilirubin zu Biliverdin oxidiert und anschließend durch das Enzym Biliverdin-Reduktase (BVR) wieder zu Bilirubin reduziert wird. Um eine Aussage zu den tatsächlichen Eigenschaften der Gallenfarbstoffe in vivo treffen zu können, ist es erforderlich, diesen Mechanismus aufzuklären. Die Bildung von Biliverdin als Folge einer Oxidation von Bilirubin durch 2,2'-azobis(2-amidinopropan) hydrochlorid (AAPH) konnte gezeigt werden. Dass dies in tatsächlichem kausalem Zusammenhang steht oder in stöchiometrischem Ausmaß geschieht, konnte jedoch nicht nachhaltig bewiesen werden. Neueste Untersuchungen bezweifeln, dass ein Redox-Zyklus Ursache der antioxidativen Effekte von Bilirubin in Säugetierzellen ist [MCDONAGH, 2010; MAGHZAL et al., 2009].

### **2. 1. 3. 2. Antioxidative Eigenschaften:**

Das antioxidative Potential von Bilirubin wurde in vielen Studien untersucht. Im Vergleich zu anderen antioxidativen Substanzen weist Bilirubin eine starke antioxidative Kapazität auf und ist ein wichtiger Bestandteil der Körperabwehr gegen Sauerstoffradikale. Besonders mit  $\alpha$ -Tocopherol, aber auch mit anderen Antioxidantien, scheint Bilirubin zu interagieren [NEUZIL und STOCKER, 1994]. In der Folge wurden auch schützende Eigenschaften vor der Oxidation durch Kupfer, Eisen [HULEA et al., 1995] und Peroxynitrit [MINETTI et al., 1998] beschrieben.

Bedingt durch den Einsatz von prooxidativem Tertiär-Butylhydroperoxid wurden oxidative Mutationen durch die Anwesenheit von Bilirubin und Biliverdin im Rahmen des Ames Tests (siehe 2. 1. 3. 3.) gehemmt [RIED, 2006].

Rauchen erhöht oxidativen Stress im Körper. Bei belgischen männlichen Rauchern konnte ein erniedrigter Serumbilirubinspiegel gegenüber den Nichtrauchern nachgewiesen werden, was vermuten lässt, dass der Bilirubin-

Verbrauch durch Rauchen steigt. Bei Frauen waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant. Jedoch wurden, im Gegensatz zu den Männern, höhere Serumbilirubinkonzentrationen bei ehemaligen Raucherinnen als bei den Frauen, die nie geraucht hatten, gefunden [VAN HOYDONCK et al, 2001].

Im Zusammenhang mit Parkinson und Multipler Sklerose werden mögliche therapeutische Nutzen von Bilirubin diskutiert [RIED, 2006]. Auch bei anderen Erkrankungen (Arteriosklerose, Gehirnerkrankungen, AIDS) werden mögliche positive Wirkungen des Bilirubin aufgrund seiner antioxidativen Eigenschaften vermutet [BESTE, 2003].

### **2. 1. 3. 3. Antimutagene Eigenschaften:**

Mit dem Ames Test wird die Mutagenität von Substanzen getestet. Diese Substanzen werden mit einem mutierten Salmonellenstamm (*Salmonella typhimurium*) inkubiert. Ist die Substanz mutagen so kommt es zu einer Rückmutation, was durch das Wachstum auf bestimmten Nährmedien nachgewiesen wird. Manche Substanzen benötigen dazu eine metabolische Aktivierung. Sie werden also erst durch Stoffwechselenzyme mutagen. Dieser Test diente dem Nachweis, ob Bilirubin der Mutagenität von bekannten mutagenen Substanzen entgegenwirkt. Im Test konnte gezeigt werden, dass Gallenfarbstoffe (Bilirubin, Biliverdin, Bilirubin-Ditaurat) den mutagenen Effekt von Trinitrofluoron (TNFone) und 2-Aminofluoron (2-AF) in allen verwendeten *Salmonella-typhimurium*-Stämmen reduziert. Im Stamm TA 98 hemmen Bilirubin und Biliverdin die Mutagenität von Benzo(α)pyren (B(α)p). Für das Mutagen Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) konnte kein protektiver Effekt gezeigt werden [RIED, 2006].

### **2. 1. 3. 4. Kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs**

Aufgrund der erwähnten Eigenschaften von Bilirubin besteht die Vermutung, dass sich ein moderat erhöhter Plasmabilirubinspiegel schützend vor Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen auswirken kann, weil oxidativer Stress maßgeblich an deren Entstehung beteiligt ist.

### **a) Krebs:**

In Belgien zeigte eine Beobachtungsstudie, die das 10-Jahre-Mortalitätsrisiko (sowohl kardiovaskulär als auch durch Krebs bedingt) an 5460 Männern und 4843 Frauen untersuchte, dass das Risiko der Krebs-Mortalität (außer bei Lungenkrebs) mit steigendem Serumbilirubinspiegel bei Männern signifikant sinkt (bis zu 58 %). Bei Frauen war der gleiche Trend erkennbar, jedoch unterhalb eines signifikanten Niveaus. Der Serumbilirubinspiegel korrelierte bei den männlichen Studienteilnehmern invers mit der Gesamtmortalität [TEMME et al., 2001].

In den U.S.A. wurde eine ähnliche Studie durchgeführt. Serumbilirubinkonzentrationen waren bei Männern signifikant höher als bei Frauen, niedriger bei Rauchern als bei Nichtrauchern, und zeigten keine Assoziation zum Körpergewicht. Sofern eine Krankengeschichte mit nichtdermatologischen Tumoren bestand, waren die Bilirubinkonzentrationen signifikant niedriger als bei Personen, die keine derartige Krankengeschichte aufwiesen. Der Anstieg des Plasmabilirubinspiegels mit jedem mg/dl bedingte eine deutliche Senkung des Auftretens von kolorektalem Krebs [ZUCKER et al., 2004].

In einer weiteren Studie aus den U.S.A. konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen Serumbilirubinkonzentrationen und dem Risiko für kolorektalen Krebs gezeigt werden [IOANNOU et al., 2006].

Auch der direkte Einfluss von Bilirubin auf menschliche Krebszellen wurde untersucht. Die Zellkulturen wurden mit einer Bilirubinlösung inkubiert, deren Konzentration 10 µg/ml betrug. Hierbei konnte überraschenderweise ein prooxidativer Effekt des Bilirubin auf die TMK-1-Zelllinie entdeckt werden. Die mit Bilirubin behandelten Proben im Comet Assay zeigten einen typischen Schweif und apoptotische Vorgänge wurden begünstigt. Als Antioxidans scheint Bilirubin vor Krebs zu schützen. Jedoch zeigte sich in dieser Untersuchung, dass es auch prooxidative Eigenschaften hat, durch welche es antikanzerogen wirkt, weil die entarteten Zellen geschädigt werden [RAO et al., 2006].

### **b) Kardiovaskuläre Erkrankungen:**

Im Rahmen der Framingham Heart Study wurden unter anderem der Zusammenhang von Homozygotie für das UGT1A1\*28 Allel, das mit einer verminderten Aktivität des Enzyms UGT einher geht, und Bilirubinkonzentrationen sowie koronaren Herzerkrankungen untersucht. Es wurden deutlich höhere Serumkonzentrationen und ein stark vermindertes kardiovaskuläres Risiko bei Personen mit homozygotem Allel (7/7 TA) gefunden [LIN et al., 2006].

Zahlreiche epidemiologische Studien zeigen eine inverse Korrelation von kardiovaskulären Erkrankungen und erhöhtem Serumbilirubin bei Personen mit dem Gilbert-Syndrom. Um einen möglichen Mechanismus zu erforschen, wurden Marker für Antioxidantien-Status und den oxidativen Stress erhoben und die Empfindlichkeit für Serumoxidation ermittelt. Zusammenfassend wurde bei der Gruppe mit Gilbert-Syndrom (9 Personen) ein höherer Status an zirkulierenden Antioxidantien und eine geringere Anfälligkeit für eine Serumoxidation gefunden als bei den Personen der Kontrollgruppe (12 Personen) [BULMER et al., 2008].

Betrachtet man die Studien, die in dieser Richtung durchgeführt wurden kann geschlossen werden, dass bei Männern ein inverser Zusammenhang zwischen der Serumbilirubinkonzentration und atherosklerotischen Veränderungen besteht. Bei Frauen wurden noch zu wenige Studien, die signifikante Ergebnisse lieferten, durchgeführt, um hier eine klare Aussage treffen zu können [NOVOTNY und VITEK, 2003].

Ob erhöhtes Bilirubin alleine für das verminderte Erkrankungsrisiko verantwortlich ist erfordert die Abklärung genauer Mechanismen.

In Personen mit Gilbert Syndrom zeigten sich in einer aktuellen Studie signifikant niedrigere Werte von sd-LDL-C (small dense LDL cholesterol) und oxidiertem LDL, beides Biomarker, die mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen assoziiert sind. Unkonjugiertes Bilirubin

korrelierte darüber hinaus negativ mit diesen Parametern, was jedoch in einer multivariaten linearen Regressionsanalyse nicht bestätigt wurde [TAPAN et al., 2011].

Nicht nur erhöhtes Bilirubin bei Gilbert Syndrom scheint Ursache des verminderten Risikos für kardiovaskuläre Erkrankungen zu sein.

In Tier- und Zellversuchen konnte gezeigt werden, dass Kohlenmonoxid, das ebenfalls durch die Hämoxxygenase 1 gebildet wird, atherosklerotische Veränderungen der Gefäße nach kurzzeitigem Abschnitt von der Blutzufuhr verhindert. Eine antiproliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen, eine Unterdrückung der Apoptose von Endothelzellen sowie hemmende Wirkung auf immunologische Prozesse liegen diesem Effekt vermutlich zugrunde [OTTERBEIN et al., 2003; BROUARD et al., 2000].

Die antioxidative und antiarteriogene Wirkung von Bilirubin scheint darauf zu beruhen, dass eine Oxidation von LDL-Cholesterol und anderer Fette reduziert wird und Sauerstoffradikale abgefangen werden. Wirkungen dieser Art zeigten sich auch bei der Induktion der Hämoxxygenase 1. Neben der Erhöhung des Biliverdin und Bilirubin entsteht bei dieser Reaktion auch Kohlenmonoxid, das antiproliferativ und vasodilatorisch wirkt. Dazu wird Häm entfernt, das ansonsten LDL-Lipoproteine oxidieren würde. Diese Faktoren sind an dem schützenden Effekt beteiligt.

Inwieweit auch ein mäßig erhöhter Bilirubinspiegel, wie beim Gilbert-Syndrom, eine schützende Wirkung ausübt ist von größtem Interesse, weil weite Bevölkerungsschichten betroffen sind und hier mögliche Angriffsstellen für medikamentöse Therapien bestehen. Bisher zeigt sich eine inverse Korrelation zwischen dem mäßig erhöhten Bilirubin und dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen.

Durch routinemäßige Laboranalysen des Serumbilirubin, neben Cholesterol, HDL-Cholesterol, systolischem Blutdruck, Zigarettenkonsum und Alter, verbessert sich zudem die Abschätzung des kardiovaskulären Risikos, wobei Bilirubin direkt mit HDL-Cholesterol und der totalen antioxidativen Kapazität im

Serum und invers mit Risikofaktoren korreliert [SCHWERTNER und VITEK, 2008].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Bilirubin ein Antioxidans ist und in Interaktion mit anderen Antioxidantien im Körper als Radikalfänger fungiert. Inwieweit sich eine erhöhte Konzentration tatsächlich als Schutz vor kardiovaskulären Erkrankungen oder Krebserkrankungen auswirkt, ist jedoch noch nicht zur Gänze geklärt. Vor allem sind die Mechanismen für diese Reduktionen des Erkrankungsrisikos noch nicht erforscht. Klinische Studien mit hoher Probandenzahl und aussagekräftigen Biomarkern bezüglich oxidativem Stress und langfristiger DNA-Schädigung, die zur Krebsentstehung führen können, sind nötig um die möglichen Mechanismen der protektiven Wirkung von Bilirubin zu zeigen.

Ein Marker um Chromosomenschäden zu messen ist der Cytokinesis-block micronucleus cytome Assay (CBMN), der Daten zur fortgeschrittenen DNA-Schädigung von Zellen liefern kann. Dieser ist bisher erst einmal in ähnlichem Zusammenhang eingesetzt worden, jedoch mit unterschiedlicher Zielsetzung (siehe 2. 3.).

## **2. 2. Micronucleus Assay (CBMN cytome Assay)**

### **2. 2. 1. Allgemeine Aspekte zu DNA-Schäden**

Mutagene können Veränderungen des Genoms auslösen, indem sie entweder direkt mit der DNA reagieren oder indirekt mit Proteinen, die für die Integrität des Genoms von Bedeutung sind, Bindungen eingehen. Zu physikalischen Mutagenen zählen ionisierende Strahlung oder ultraviolettes Licht. Salpetrige Säure, Hydroxylamin und alkylierende Verbindungen sind Beispiele für chemische Mutagene. Je nachdem welches Mutagen auf die Zelle wirkt entstehen Schäden unterschiedlicher Art: DNA-Addukte, Einzel- und Doppelstrangbrüche, Fehlabsonderung der Chromosomen aufgrund von Fehlfunktionen des Spindelapparates und andere Schäden.

Die Mutationen reichen von Veränderungen einzelner Nukleotide (Genmutation) bis hin zu strukturellen Veränderungen (Chromosomenmutation, Genommutation). Die weitere Entwicklung der Zelle hängt nun von den Reparaturmechanismen oder der Eliminierung durch Apoptose ab.

Zur Messung des Ausmaßes der DNA-Schädigung gibt es zwei Hauptendpunkte, die für Studien zu Gentoxizität und Beobachtungszwecke erfasst werden: Chromosomenanomalien (chromosome aberrations) und Mikrokerne (micronuclei) [MATEUCA et al., 2006; KOOLMAN und RÖHM, 2002].

#### **a) Chromosomenanomalien (CAs):**

Das sind Änderungen in der normalen Struktur oder der Anzahl der Chromosomen. Strukturelle Änderungen werden durch verschiedene Mechanismen auf DNA-Ebene (insbesondere Doppelstrangbrüche) ausgelöst und können in zwei Typen unterschieden werden: CSAs, wo beide Chromatiden eines oder mehrerer Chromosomen betroffen sind, und CTAs, wo jeweils nur ein Chromatid betroffen ist. Numerische Veränderungen (Aneuploidie, Polyploidie) entstehen aufgrund fehlerhafter Absonderung der Chromosomen und treten spontan oder in Folge einer aneugenen Behandlung auf.

Im **CA-Assay** werden strukturelle Veränderungen in peripheren Blutlymphocyten (PBLs) erfasst. Numerische Veränderungen können nicht ermittelt werden. Diese Methode diente in den letzten dreißig Jahren als Biomarker für frühe Effekte gentoxischer Karzinogene. Der CA-Assay benötigt in-vitro Zellkultivierung, hochqualifiziertes und erfahrenes Personal und ist Labor-intensiv. Daher wurde er weitestgehend durch den Micronucleus Assay abgelöst [MATEUCA et al., 2006].

#### **b) Mikrokerne (MNi):**

Es handelt sich hierbei um kleine Chromatinkörperchen, die sich außerhalb des Zellkerns befinden. Sie entstehen in sich teilenden Zellen aus azentrischen Chromosomen- / Chromatiden-Fragmenten oder aus ganzen Chromosomen,

die sich im Zuge der Mitose nicht gut an den Spindelapparat angehängt haben und daher nicht in den Tochterzellkern inkludiert wurden.

MNI aus azentrischen Fragmenten entstehen meist aufgrund von DNA-Doppelstrangbrüchen. Diese wiederum können neben anderen Mechanismen, dadurch entstehen, dass simultan beschädigte oder fehlerhaft eingesetzte Basen an komplementären DNA-Strängen entfernt werden. Insbesondere wenn die entstandenen Lücken nicht aufgefüllt werden kommt es zum Doppelstrangbruch. Sofern die Zelle nun Gen- oder Enzymdefekte aufweist, die für die Reparatur entscheidend sind, oder das Ausmaß der Schäden die Reparaturkapazität übersteigt, so bleiben diese DNA-Schäden unrepariert oder werden fehlerhaft repariert (z.B. symmetrischer und asymmetrischer Chromatiden- und Chromosomenaustausch). Aus den entstandenen Fragmenten bilden sich Mikrokern. Des Weiteren kann auch während der Bildung von Nukleoplasmatischen Brücken (siehe c)) fragmentiertes chromosomales Material entstehen, aus dem ebenfalls Mikrokern entstehen können.

MNI aus ganzen Chromosomen entstehen dadurch, dass Chromosomen während der Anaphase den Kontakt zum Spindelapparat verlieren oder erst gar nicht herstellen können. Auf diese Weise werden die Chromosomen nicht zu den Zellpolen gezogen und demnach nicht in die neuen Zellkerne der Tochterzellen inkludiert. Sie verbleiben als Mikrokern im Plasma. Ursachen für eine fehlerhafte Verbindung der Zentromere mit dem Spindelapparat sind meist eine fehlerhafte Anordnung der Kinetochor-Proteine, was durch Hypomethylierung von Cytosin in centromeren Wiederholungssequenzen ausgelöst werden kann. Des Weiteren können auch Defekte der Interaktion der Kinetochor-Proteine mit den Microtubuli, fehlerhafte Bildung des mitotischen Spindelapparats, Defekte mitotischer Kontrollpunkte und abnorme Zentrosomenvermehrung zur Bildung von MNI aufgrund von Chromosomenverlust führen. Auch Chromosomen deren Telomerenenden verbunden sind (dizentrisch) können in der Anaphase so stark an gegenüberliegende Seiten gezogen werden, dass der Kontakt zum Spindelapparat abbricht, was wiederum zu Chromosomenverlust und

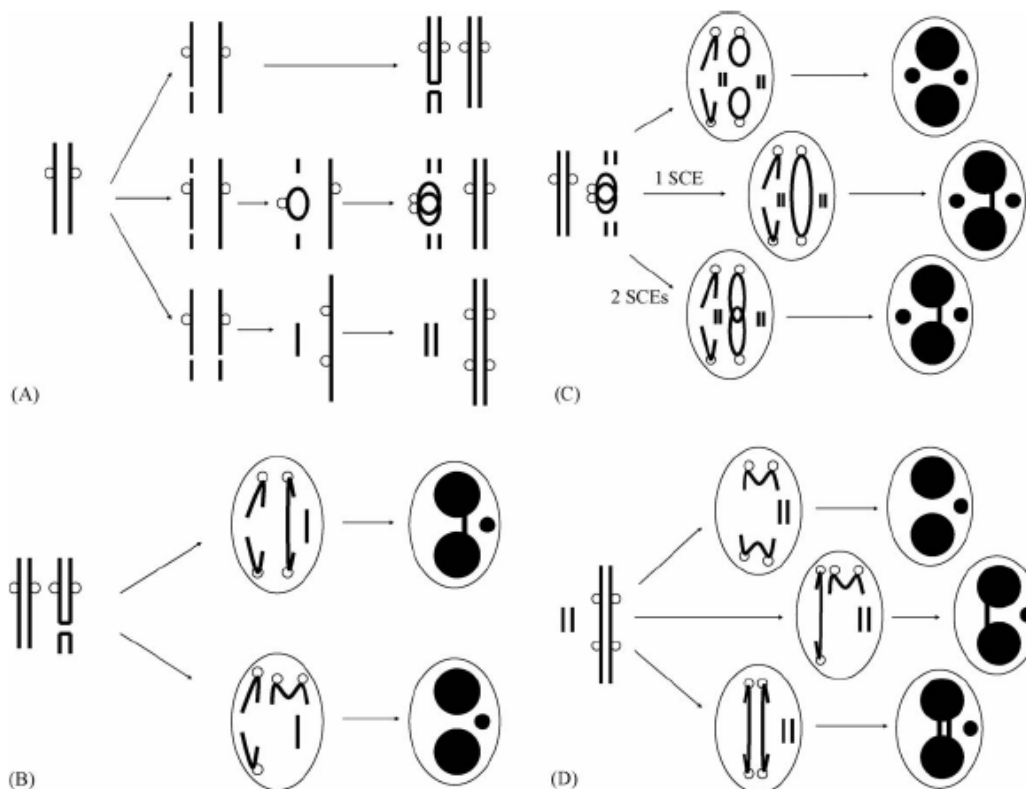
anschließender Mikrokernbildung führen kann (siehe Abbildung 2) [FENECH et al., 2011].

**c) Nukleoplasmatische Brücken (NPBs):**

Dizentrische Chromosomen entstehen durch fehlerhafte Reparatur von Chromosomenbrüchen oder durch die bereits erwähnte Verbindung von Telomerenenden, die wiederum durch eine fehlerhafte Telosom-Proteinstruktur ausgelöst wird. Wenn diese Chromosomen in der Anaphase auseinandergezogen werden, so kann es dazu führen, dass eine Brücke zwischen den neuen Kernen entsteht, die von der Kernmembran umgeben ist. Im normalen Zellzyklus bricht sie. Im Micronucleus Assay, bei dem der Zellzyklus durch das Zellgift Cytochalasin B gestoppt wird, verbleibt sie zwischen den Kernen und kann durch Färben sichtbar gemacht werden (siehe Abbildung 2) [FENECH et al., 2011].

**d) Nukleare Buds (NBUDs):**

MNi können auch durch DNA-Vervielfältigung entstehen, wobei diese DNA am Rand des Zellkerns lokalisiert wird und durch nukleares budding während der S-Phase des Zellzyklus abgesondert wird. Ein NBUD ist am Rand des Zellkerns erkennbar bevor dieser als MN in das Plasma abgesondert wird. Sie sind abgesehen von ihrer Verbindung zum Zellkern morphologisch den MNi gleich. Budding kann durch besondere Wachstumsbedingungen, die Gene induzieren, durch leichten Folsäuremangel und Bestrahlung mit  $\gamma$ -Strahlen ausgelöst werden. Darüber hinaus führt auch der Bruch einer NPB, dazu, dass die verbleibenden Enden zu den Kernen schrumpfen und als NBUDs sichtbar sind [FENECH et al., 2011; MATEUCA et al., 2006].



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung: Entstehung von MNi und NPBs

Nach: [FENECH, 2006]

(A) Auslösende Vorgänge der NPB-Bildung: Doppelstrangbrüche in einem oder zwei Chromosomen und anschließende fehlerhafte bzw. fehlende Reparatur und Zusammensetzung der Enden vor oder nach der Replikation führt zur Bildung dizentrischer, azentrischer und Ringfragmente.

(B) *Oben:* Die Zentromeren eines dizentrischen Chromatids werden zu entgegengesetzten Polen gezogen und bilden eine NPB. Ein azentrisches Fragment, das im Zellteilungszyklus zurückliegt, bildet einen Mikrokern. *Unten:* Die Zentromeren eines Chromatids werden zum gleichen Pol gezogen und es kommt zu keiner Bildung einer NPB. Das zurückliegende azentrische Fragment bildet wieder einen Mikrokern.

(C) *Oben:* Die Ringchromatiden werden normal abgesondert, aber die azentrischen Fragmente in der Anaphase bilden zwei Mikrokerne. *Mitte:* Die zwei Ringchromatiden werden in einen großen dizentrischen Ringchromatiden umgewandelt. Wenn die Zentromeren zu entgegengesetzten Polen in der Anaphase gezogen werden, bildet sich eine NPB. *Unten:* Hier verbinden sich die zwei Ringchromatiden, was ebenfalls zur Bildung einer NPB nach dem Auseinanderziehen der Zentromeren führt.

(D) Aus dem azentrischen Fragment bildet sich jeweils ein Mikrokern, der bei dem dizentrischen Fragment verbleibt. *Oben:* Die Zentromeren dizentrischer Chromatiden wandern zum gleichen Zellpol, ohne dass eine NPB gebildet wird. *Mitte:* Die Zentromeren eines der dizentrischen Chromatiden werden zu entgegengesetzten Polen der Zelle gezogen und es bildet sich eine NPB. *Unten:* Die Zentromeren beider dizentrischer Chromatiden werden zu entgegengesetzten Polen gezogen, woraus sich zwei NPBs bilden.

Der **Micronucleus Assay** ist heutzutage die am meisten eingesetzte Methode, um MNi in menschlichen Lymphozyten zu erfassen. Die Durchführung ist an verschiedenen Zellarten (Lymphozyten, Fibroblasten, abgeblätterten Epithelzellen), die relevant für „Human Biomonitoring“ sind, möglich. Er beinhaltet die Messung der Zellproliferation und des Zelltods. Der Hauptvorteil dieses Assay liegt in der Erfassung und Unterscheidung verschiedenartiger Chromosomenveränderungen (clastogen / aneugen, Chromosomenverlust / non-disjunction). NPBs, NBUDs sowie die zwei Formen des Zelltodes (Apoptose und Nekrose) werden gleichzeitig erfasst. Aufgrund der Einfachheit und Schnelligkeit in der Durchführung, einer hohen statistischen Power und Sensitivität, und des geringen finanziellen Aufwands ist der Micronucleus Assay die Methode der Wahl, um das Ausmaß einer DNA-Schädigung zu ermitteln und möglicherweise auch das Krebsrisiko abzuschätzen [MATEUCA et al., 2006].

### **2. 2. 2. Verschiedene Endpunkte der Chromosomenschädigung**

Ursprünglich wurde der Cytokinesis-block micronucleus cytome Assay (CBMN cyt Assay) entwickelt, um MNi zu messen. Darüber hinaus besteht jedoch auch die Möglichkeit, NPBs und NBUDs, als andere wichtige Formen der Chromosomenschädigung, sowie Zelltod (Apoptose, Nekrose) und Kernteilungsrate zu ermitteln. NPBs entstehen, wie bereits erwähnt, aus dizentrischen Chromosomen, die zu entgegengesetzten Polen der Zelle gezogen werden. Sie sind ein Indikator für fehlerhafte DNA-Reparatur, Neuordnung der Chromosomen oder Fusion der Telomerenenden. Durch „nuclear budding“ entfernt die Zelle überschüssige DNA. NBUDs zeigen daher Genvermehrung oder -umbau an. Durch die Berücksichtigung aller Parameter („Cytome Assay“) ist der CBMN cyt Assay eine verlässliche und umfangreiche Methode, um die Zytotoxizität und Mitoseaktivität zu beurteilen. Chromosomenstabilität und Lebensfähigkeit der Zelle werden umfassend gemessen [FENECH, 2006].

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) stehen im Verdacht, bei regelmäßigem Kontakt Lungenkrebs zu verursachen. Mit Hilfe des CBMN cyt Assay wurde nun nachgewiesen, dass NPBs- und NBUDs-Häufigkeiten mit steigendem Ausmaß der Exposition mit PAKs zunehmen. MNi waren häufiger bei Personen, die PAKs ausgesetzt waren, jedoch ohne einen ansteigenden Trend bei steigender Exposition. Somit kann man annehmen, dass NPBs und NBUDs sensiblere Marker für die Exposition mit PAKs sind. Sie kamen zudem in geringerer Häufigkeit bei Frauen vor [DUAN et al., 2009].

Gen- und Zytotoxizität von zäkalem Wasser aus Ratten, die mit unterschiedlichen Diäten (hohes und niedriges colorektales Krebsrisiko) gefüttert wurden, sowie von fäkalem Wasser von 6 freiwilligen Probanden konnte anhand des CBMN cytome Assay beurteilt werden. WIL2-NS-Zellen wurden mit dem Wasser in unterschiedlichen Konzentrationen und unterschiedlich lang inkubiert. Anhand der Ergebnisse konnten interindividuelle Unterschiede in Gen- und Zytotoxizität von zäkalem und fäkalem Wasser sowie ernährungsbedingte Einflüsse ermittelt werden. Die MNi-Anzahl war hier ein sensitiverer und verlässlicherer Biomarker für die Gentoxizität von zäkalem Wasser [BENASSI et al., 2007].

## **2. 2. 3. Einflussfaktoren auf die Mikrokernbildung**

### **a) Alter und Geschlecht:**

Viele Studien untersuchten den Zusammenhang zwischen Alter, Geschlecht und der Bildung von MNi. Die genaue Betrachtung von einigen Studien mit großer Teilnehmerzahl aus unterschiedlichen Ländern, zeigt, dass zumeist eine altersabhängige Zunahme der MNi festgestellt wurde. Einige Studien zeigten zudem, dass MNi bei Frauen in größerer Häufigkeit als bei Männern entstehen. Anhand der Daten konnte ein linearer Anstieg der MNi mit dem Alter beschrieben werden, anhand dessen sich erwartete Normalwerte für Altersgruppen abschätzen lassen [PEACE und SUCCOP, 1999].

Auch im Zuge des HUMN-Projekts in dem weltweit in 25 Labors bei 7000 Personen Daten erhoben wurde, konnte eine Erhöhung der MNi-Häufigkeit mit

dem Alter, sowie ein 19%ig höhere Häufigkeit bei Frauen nachgewiesen werden [BONASSI et al., 2001].

Dieser Zusammenhang wird durch kürzlich erhobene Daten bestätigt. Hier zeigte sich eine Steigerung der MNi-Häufigkeit bis zum 70. Lebensjahr, sowie ein höherer Wert bei Frauen. Der geschlechtsspezifische Unterschied war jedoch stärker in den jüngeren Altersgruppen, innerhalb derer der Unterschied fast das Doppelte betrug. Des Weiteren wurde durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung der chromosomale Ursprung der MNi untersucht. Es zeigte sich, dass MNi mit Material des X-Chromosoms bei Frauen häufiger waren als jene mit autosomalem Material, und die Häufigkeit stieg noch bis ins hohe Alter an [WOJDA et al., 2007].

## **b) Rauchen**

In vielen Studien wurde der Einfluss von Zigarettenkonsum auf die MN-Bildung untersucht. Anzunehmen war, dass die MN-Häufigkeit bei Rauchern höher ist, weil Zigarettenrauch mutagene Substanzen enthält. Überraschenderweise zeigten die meisten Untersuchungen einen negativen Zusammenhang. Nichtraucher wiesen demnach höhere MN-Häufigkeiten als Raucher auf. In einer großen Reanalyse, die die Daten von 5710 Studienteilnehmern untersuchte, konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Raucher und ehemalige Raucher wiesen eine leicht geringere MN-Häufigkeit auf als Nichtraucher. Die Anzahl der Zigaretten pro Tag zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die MN-Häufigkeit, außer bei starken Rauchern (>30 Zigaretten pro Tag) [BONASSI et al., 2003].

Bei einer Untersuchung von unbehandelten Krebspatienten konnte gezeigt werden, dass die MN-Häufigkeit in Krebspatienten höher ist, aber sowohl bei Krebspatienten als auch in der Kontrollgruppe vollkommen unbeeinflusst war von Geschlecht, Krebsart oder von der Tatsache, ob jemand Raucher oder Nichtraucher ist [MILOSEVIC-DJORDJEVIC et al., 2010].

Aktuellere Forschungsergebnisse konnten wiederum eine positive Korrelation von Alter und Rauchen zu MN-Häufigkeit zeigen, jedoch nicht auf signifikantem Niveau [MILIC et al., 2010].

### **c) Alkohol, Folsäure und Vitamin B<sub>12</sub>**

Folsäure ist essentiell für die DNA-Synthese und -Reparatur und somit ein wichtiger Faktor der Genomstabilität. Exzessiver Alkoholkonsum kann zu verschiedenen Erkrankungen (u.a. Colonkrebs) führen. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass bei häufigem Alkoholkonsum auch eine höhere Anzahl von MNi auftreten, was zeigt, dass sich Ethanol negativ auf die Genomstabilität auswirkt. Möglicherweise ist dies unter anderem dadurch bedingt, dass Alkohol den Folsäurestatus verändert, indem es Folat spaltet. Dieser Zusammenhang konnte in dieser Studie zwar nicht direkt gezeigt werden, jedoch zeigte sich mit Hilfe des CBMN cytome Assay (in WIL2-NS-Zellen), dass sowohl Alkoholexposition als auch Folsäuremangel (bereits in physiologischem Ausmaß) zu einer Erhöhung der MNi, NPBs und NBUDs führen. Dieser Effekt war bei Kombination der beiden Faktoren stärker ausgeprägt [TEO und FENECH, 2008].

Eine nicht signifikante Korrelation zwischen MN-Frequenz und Alkoholkonsum, Folsäure- und Vitamin B<sub>12</sub> konnte durch Milic et al. beschrieben werden. Hier zeigte sich die höchste Konzentration an MNi in der Gruppe mit der niedrigsten Konzentration an Vitamin B<sub>12</sub> im Plasma [MILIC et al., 2010].

In Brasilien konnte bei Arbeitern, die durch Blei belastet waren, eine hohe MN-Häufigkeit, bei vergleichbaren Folsäure- und Vitamin B<sub>12</sub>-Konzentrationen, gegenüber der nicht belasteten Kontrollgruppe gezeigt werden. Innerhalb der belasteten Gruppe wiesen jedoch Personen, mit einem, dem Gruppendurchschnitt entsprechendem oder höherem Folatspiegel, eine geringere MN-Häufigkeit auf. Das zeigt, dass eine gute Versorgung mit Folsäure zwar schützend wirken kann aber als alleinige Maßnahme nicht ausreichend ist [MINOZZO et al., 2010].

#### d) Genetischer Polymorphismus

Ursächlich für die Bildung von MNi sind immer Veränderungen an Chromosomen, die einerseits durch Gendefekte und andererseits durch die Anwesenheit von gentoxischen Substanzen entstehen können. Genetischer Polymorphismus hat einen sehr komplexen Einfluss auf die Bildung von MNi. Genetische Unterschiede variieren zudem wiederum mit Effekten anderer Faktoren der MN-Bildung (gentoxische Substanzen, Geschlecht, Alter, Lebensstil, Krankheiten).

Der Weg zur Bildung von MNi aufgrund bestehender genetischer Polymorphismen wird von zahlreichen Proteinpolyorphismen beeinflusst. Einige begünstigen die MN-Bildung durch Chromosomenschäden aufgrund gentoxischer Substanzen, andere stehen im Zusammenhang mit MN-Bildung aufgrund von Alkoholkonsum. Auch Proteine des DNA-Reparaturapparates und des Folsäurestoffwechsels zeigen Einflüsse auf die MN-Bildung.

Um klare Aussagen treffen zu können, bedarf es hier jedoch noch weiterer größer angelegter Untersuchungen als bisher, die auch NPBs und NBUDs erfassen [IARMARCOVAI et al., 2008].

#### e) Gentoxische Substanzen:

Gentoxische Substanzen wurden häufig auf ihr DNA-schädigendes Potential untersucht, unter anderem auch mit Hilfe des Micronucleus Assay. Wie bereits erwähnt, zeigten **Blei**-belastete Personen sowie **PAK**-ausgesetzte Personen eine signifikant höhere MN-Häufigkeit als Unbelastete. Bei den PAKs zeigte sich auch eine Steigerung der NPBs und NBUDs gemeinsam mit dem Ausmaß der Exposition [MINOZZO et al., 2010, DUAN et al., 2009].

Auch Arbeiter einer **Vanadium Pentoxid ( $V_2O_5$ )**-Fabrik zeigten verglichen mit unbelasteten Personen signifikant mehr MNi, NPBs und NBUDs [EHRlich et al., 2008].

#### f) Selen:

Neben Folsäure spielt auch Selen eine wichtige Rolle für die Stabilität des Genoms. Eine ausreichende Aufnahme scheint wichtig für die Krebsprävention,

jedoch wirken hohe Dosen toxisch. Um zu ermitteln, welchen exakten Effekt in welcher Konzentration Selen zeigt, wurde wiederum der CBMN cytome Assay herangezogen. Periphere Blutlymphozyten (PBLs) wurden von Menschen isoliert, auf einem Nährmedium mit Selenomethionin kultiviert und mit radioaktiver Strahlung behandelt. Das Ausmaß der Genomschädigung wurde anschließend ermittelt. Es zeigte sich, dass Selenkonzentrationen bis 430 µg/l die Genomstabilität verbessern könnten (weniger NPBs, NBUDs), während höhere Konzentrationen toxisch wirken (Hemmung der Zellteilung, vermehrter Zelltod) [WU et al., 2009].

In einer weiteren Untersuchung wurde der Effekt von mit Selen angereichertem Weizen untersucht. Einer Interventionsgruppe wurden gepuffte Weizenkekse über mehrere Wochen gegeben; anschließend wurden verschiedene Parameter degenerativer Erkrankungen erhoben. Unter anderem kam auch hier wieder der CBMN cytome Assay zum Einsatz. Die Verbesserung des Selenstatus in der Interventionsgruppe zeigte keinen Einfluss auf die erhobenen Parameter [WU et al., 2009].

Viele verschiedene Faktoren beeinflussen die DNA-Stabilität und können somit auch auf die Bildung von MNi aber auch NPBs und NBUDs Einfluss nehmen. Um etwaige Confounder-Effekte auszuschließen sollten einige Daten wie Alter, Geschlecht und Rauchen in jeder Untersuchung mit dem Micronucleus Assay erhoben und berücksichtigt werden.

#### **2. 2. 4. Der CBMN cytome Assay als Biomarker für Krebs**

Bei 6718 Personen wurde in verschiedenen Laboren von 1980 bis 2002 die MN-Häufigkeit in PBLs ermittelt. In der Folge wurden Krebsentstehung und Mortalität für diese Personen erhoben. Die Gruppen mit hoher oder mittlerer MN-Häufigkeit zeigten eine signifikant höhere Krebsrate und ein vermindertes krebsfreies Überleben als jene Gruppe mit niedriger MN-Häufigkeit. Dieser Zusammenhang bestand unabhängig von der Nationalität und galt für alle

wichtigen Krebsarten, wobei er besonders ausgeprägt bei urogenitalen und gastrointestinalen Krebserkrankungen war [BONASSI et al., 2007].

Eine ähnliche Studie von 1991 bis 2005 aus Italien kam zu vergleichbaren Ergebnissen. Personen, die später an Krebs starben, wiesen in ihren Proben eine signifikant höhere Anzahl an MNi auf [MURGIA et al., 2008].

In einer Fall-Kontroll Studie konnte gezeigt werden, dass eine starke Assoziation zwischen einer hohen MN-, NPB- und NBUD-Häufigkeit und Lungenkrebsrisiko besteht. Unter Rauchern konnten mit Hilfe des CBMN cyt Assay jene mit hohem Erkrankungsrisiko ermittelt werden. Es ist also möglich, mit Hilfe der ermittelten Werte Prognosen für die Entwicklung von Lungenkrebs zu erstellen [EL-ZEIN et al., 2006].

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass der Einsatz des CBMN-Assay geeignet ist, um das Krebsrisiko einer Personengruppe abzuschätzen

Im Falle einer bereits bestehenden Krebserkrankung konnte, wie bereits erwähnt, eine höhere MN-Häufigkeit im Vergleich zu gesunden Individuen unabhängig von der Krebsart und anderen Faktoren festgestellt werden [MILOSEVIC-DJORDJEVIC et al., 2010].

Bei Lungenkrebspatienten wurden signifikant höhere MN-Häufigkeiten in Zweikernzellen (spontane und NNK-induziert) gefunden. Auch spontan gebildete MNi in Monokernzellen waren signifikant häufiger bei Erkrankten. Des Weiteren zeigten sich signifikant höhere Werte für die Anzahl der Einkernzellen, wogegen die Kontrollgruppe mehr Zwei- und Multikernzellen aufwies. Der NDI und NDCI waren signifikant geringer, Apoptosen und Nekrosen signifikant höher bei den Personen mit Lungenkrebs [EL-ZEIN et al., 2008].

Betrachtet man zusammenfassend die Literatur für die Anzahl der Mikrokerne bei Krebspatienten, zeigt sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung bei unbehandelten Personen und Radioiod-therapierten Personen mit Schilddrüsenkrebs [IARMARCOVAI et al., 2008].

Der derzeitige Stand der Forschung legt nahe, dass MNi verschiedene Rollen in der Karzinogenese einnehmen und nicht nur als Biomarker für das Erkrankungsrisiko stehen. Die Daten sind aber noch nicht ausreichend.

### **2. 3. Micronucleus Assay und Bilirubin**

Wie bereits erwähnt ist Bilirubin ein Antioxidans. Zirkuliert es mit leicht erhöhter Konzentration im Blut so schützt es vermutlich vor zahlreichen Erkrankungen, an deren Entstehung neben anderen Faktoren oxidativer Stress ursächlich beteiligt ist. Um die Rolle von Bilirubin insbesondere in der Krebsentstehung zu erforschen muss sein Einfluss auf die Stabilität der DNA ermittelt werden. Der Micronucleus Assay ist in diesem Zusammenhang ein interessanter Biomarker, da er ein umfassendes Bild zur Zellgesundheit und DNA-Stabilität liefert und geeignet ist das Risiko einer Krebserkrankung abzuschätzen.

Bisher wurde dieser Assay erst einmal im Zusammenhang mit erhöhtem Serumbilirubin eingesetzt. Das Ziel in dieser Studie war es, oxidative Schäden auf somatischer Ebene im Zusammenhang mit unterschiedlichen Genotypen des UGT1A1-Genlocus, die zu unterschiedlich hohen Bilirubinspiegeln im Blut führen, zu erforschen. Je nachdem, wie oft sich die Basen TA in der Promotorregion des UGT1A1-Gens wiederholen, unterscheidet man die Formen 5-, 6-, 7- und 8-TA, jeweils homo- oder heterozygot. 7-TA homozygot liegt erhöhtem Bilirubin zugrunde. In dieser Studie wurden 101 Probanden im Alter von 19–53 Jahren, afroamerikanischer sowie kaukasischer Herkunft bezüglich dieses Polymorphismus für beide Allele untersucht. Untersucht wurde anschließend auf Mutationen des Hypoxanthin-guanin Phosphoribosyltransferase (HPRT)-Gens und des Glycophorin A-Gens (NØ und NN Mutationen) und die Häufigkeit von MNi, wobei bei Letzterem zwischen Kinetochor-positiven und Kinetochor-negativen MN-Häufigkeiten unterschieden wurde.

NN-Mutationen des Glycophorin A-Gens waren leicht erniedrigt in Personen des Genotyps mit weniger stark exprimiertem Gen (7- und 8-TA).

Überraschenderweise waren jedoch HPRT-Mutationen in diesen Personen leicht erhöht im Vergleich zu Personen mit dem Genotyp für starke Exprimierung (5- und 6-TA). 7- und 8-TA Genotypen zeigten einen schwachen Beweis für eine erhöhte Häufigkeit an NØ-Mutationen des Glycophorin A-Gens. Ein Zusammenhang zwischen Genotyp und Mikrokernhäufigkeit konnte auf keinem signifikanten Niveau beschrieben werden [GRANT et al., 2004].

Zusammenhänge zwischen Genotyp und somatischen Mutationen konnten in der Studie aufgezeigt werden. Es besteht die Vermutung, dass die antioxidative Kapazität des Bilirubin möglicherweise auf die entdeckten Effekte keinen Einfluss hat.

Obwohl bei der letzten Studie der Genotyp erhoben wurde, gab es keine Daten zu den Bilirubinwerten der Probanden, was die Vergleichbarkeit mit der vorliegenden Studie erschwert.

### 3. MATERIALIEN UND METHODEN

#### 3. 1. Studiendesign

Das Ziel dieser Studie ist zu untersuchen, ob sich moderat erhöhte Serum-bilirubinspiegel in Personen mit Gilbert Syndrom (GS) erniedrigend auf die Mikrokernbildung auswirken.

Bisher ist nur wenig über oxidative DNA-Schäden bei Personen mit Gilbert Syndrom bekannt. Daher soll in dieser Studie das Ausmaß der DNA-Stabilität in Personen mit GS im Vergleich zu Kontrollpersonen ermittelt werden. Darüber hinaus werden auch Parameter für oxidativen Stress, Entzündung und kardiovaskuläre Erkrankungen sowie der Ernährungsstatus erhoben.

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine Fall-Kontroll-Studie im Querschnittsdesign. Um die Ein- und Ausschlusskriterien der Teilnehmer zu prüfen und sie den entsprechenden Gruppen („Gilbert Syndrom“ und „Kontrolle“) zuzuteilen, wird vor der Hauptblutabnahme bereits Blut abgenommen und ein Fragebogen ausgefüllt. Das Verhältnis „Gilbert Syndrom“: „Kontrolle“ soll 1:1 betragen. Die Einteilung erfolgt nach ermittelten Werten des Gesamtbilirubin und des unkonjugierten Bilirubin (siehe Ein- und Ausschlusskriterien 3.2.).

Am ersten Blutabnahmetermine wird den Teilnehmern die Probandeninformation gegeben und ihr Einverständnis eingeholt. Anschließend werden die Ein- und Ausschlusskriterien (siehe 3.2.) mittels Fragebogen und Bluttests überprüft. Zusätzlich wird ein Food Frequency Questionnaire (FFQ) ausgefüllt.

Vor dem anschließenden Hauptblutabnahmetermine muss der Proband zuvor einen Fastentag halten, an dem über 24 h maximal 400 kcal verzehrt werden dürfen. Diese Stressinduktion führt zu einer Erhöhung des Bilirubinspiegels, die bei Personen mit Gilbert Syndrom sehr stark (bis zu 100 %) ausgeprägt ist [OWENS und SHERLOCK, 1973].

Mittels Befragung werden mehrere Ein- und Ausschlusskriterien erneut geprüft. Danach erfolgt die Blutabnahme, sowie eine Mundschleimhautentnahme durch geschultes Personal und eine Harnprobe werden genommen.

Der Hauptzielparameter ist das Ausmaß der DNA-Schädigung an Lymphozyten aus dem Plasma. Dieser wird mit Hilfe des Micronucleus Assay (bzw. CBMN cytome Assay) und des Comet Assay (single cell gel electrophoresis) ermittelt. Die vorliegende Diplomarbeit wird jedoch nur auf Micronucleus Assay eingehen. Diese Studie wurde von der Ethikkommission des Allgemeinen Krankenhauses (AKH) Wien (Nr.: 274/2010) geprüft und genehmigt.

### **3. 2. Probandenrekrutierung**

Insgesamt wurden 101 Personen über die Kartei des Allgemeinen Krankenhauses Wien, und über Aushänge universitärer Einrichtungen und verschiedener Krankenhäuser in Wien sowie über Internetplattformen und Zeitungsannoncen für diese Studie rekrutiert.

#### **a) Einschlusskriterien „Gilbert Syndrom“:**

- ❖ 20-80 Jahre
- ❖ Gesamtbilirubin im Blut höher als 20,52 µmol/l
- ❖ Unkonjugiertes Bilirubin höher als 17,1 µmol/l
- ❖ γ-Glutamyltranspeptidase (GGT) im Blut < 100 IU
- ❖ Alanin Aminotransferase (ALT) im Blut < 100 IU
- ❖ Aspartat Aminotransferase (AST) im Blut < 100 IU
- ❖ Moderates Bewegungsverhalten

#### **b) Ausschlusskriterien „Gilbert Syndrom“:**

- ❖ Jünger als 20 Jahre oder älter als 80 Jahre
- ❖ Gesamtbilirubin niedriger als 1,2 mg/dl
- ❖ Unkonjugiertes Bilirubin niedriger als 1 mg/dl
- ❖ Eine oder mehrere der folgenden Erkrankungen:  
Kardiovaskuläre Erkrankungen, Herzerkrankung, Hepatitis B, Hepatitis C, jede andere Form einer Lebererkrankung, Cholethiasis, Hämolyse, chronische Nierenerkrankungen, akute Tumorerkrankungen, Diabetes Mellitus

- ❖ Supplementierung mit Antioxidantien innerhalb der letzten 4 Wochen vor der ersten Blutabnahme
- ❖ Einnahme von Medikamenten, die die Leberwerte beeinflussen können (z. B. Probenecid, Rifampicin)
- ❖ Raucher (> 5 Zigaretten pro Tag)
- ❖ Alkoholkonsum (> 7 alkoholische Getränke pro Woche)
- ❖ Personen mit Organtransplantaten
- ❖ Sehr hohe sportliche Aktivität (>10 h Training pro Woche)

**c) Einschlusskriterien „Kontrolle“:**

- ❖ 20-80 Jahre
- ❖ Gesamtbilirubin im Blut niedriger als 20,52  $\mu\text{mol/l}$
- ❖ Unkonjugiertes Bilirubin niedriger als 17,1  $\mu\text{mol/l}$
- ❖  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (GGT) im Blut < 100 IU
- ❖ Alanin Aminotransferase (ALT) im Blut < 100 IU
- ❖ Aspartat Aminotransferase (AST) im Blut < 100 IU
- ❖ Moderates Bewegungsverhalten

**d) Ausschlusskriterien „Kontrolle“:**

- ❖ Jünger als 20 Jahre oder älter als 80 Jahre
- ❖ Gesamtbilirubin höher als 1,2 mg/dl
- ❖ Unkonjugiertes Bilirubin höher als 1 mg/dl
- ❖ Eine oder mehrere der folgenden Erkrankungen:  
Kardiovaskuläre Erkrankungen, Herzerkrankung, Hepatitis B, Hepatitis C, jede andere Form einer Lebererkrankung, Cholethiasis, Hämolyse, chronische Nierenerkrankungen, akute Tumorerkrankungen, Diabetes Mellitus
- ❖ Supplementierung mit Antioxidantien innerhalb der letzten 4 Wochen vor der ersten Blutabnahme
- ❖ Einnahme von Medikamenten, die die Leberwerte beeinflussen können (z. B. Probenecid, Rifampicin)
- ❖ Raucher (> 5 Zigaretten pro Tag)

- ❖ Alkoholkonsum (> 7 alkoholische Getränke pro Woche)
- ❖ Personen mit Organtransplantaten
- ❖ Sehr hohe sportliche Aktivität (>10 h Training pro Woche)

### 3. 3. Der CBMN cytome Assay

#### 3. 3. 1. Verwendete Chemikalien

| Name                      | Produzent          | Produktnummer |
|---------------------------|--------------------|---------------|
| Cytochalasin-B            | Sigma Aldrich      | C 6762        |
| Diff-Quick Staining Set   | Medion Diagnostics | 460.058       |
| DMSO                      | Sigma Aldrich      | D 4540        |
| Entellan                  | Merck              | 1.07961.0100  |
| Fetal Bovine Serum "Gold" | PAA                | A 15-152      |
| L-Glutamin                | Sigma Aldrich      | P 7513        |
| PBS                       | Sigma Aldrich      | D 8537        |
| PHA                       | PAA                | J01-006       |
| RPMI                      | PAA                | E15-039       |
| Sodium-L-Pyruvate         | Sigma Aldrich      | P 2256        |
| Trypanblau                | Sigma Aldrich      | T 8154        |

**Tabelle 1:** Übersicht über die verwendeten Chemikalien

#### 3. 3. 2. Testprinzip

Der CBMN cytome Assay ist eine Methode, um DNA-Schäden, Zellteilung und Zelltod zu messen. Diese werden ausschließlich in einmal geteilten Zellen gemessen, weil Mikrokerne nur nach vollständig beendeter Kernteilung sichtbar werden. Um diese Zellen eindeutig zu identifizieren, werden in diesem Verfahren Zellen zur Teilung stimuliert und im Zweikernstadium gestoppt. Hierzu werden aus dem Blut zunächst die peripheren Blutlymphozyten (PBLs) isoliert. Anschließend werden sie in einem Medium angezüchtet und durch Phytohämagglutinin (PHA) zur Teilung angeregt. Nach einem bestimmten Zeitraum wird der Zellzyklus durch die Zugabe des Zellgifts Cytochalasin-B

(Cyt-B) gestoppt. Die Zellen haben somit lediglich eine Kernteilung durchgeführt, ohne dass sich die entstehende Tochterzelle abgeschnürt hat und die Zelle beinhaltet nun zwei Zellkerne. Die Zellsuspension wird weiters auf einem Objektträger fixiert und gefärbt. Unter dem Mikroskop werden Zellen in verschiedenen Stadien des Zellzyklus sowie verschiedene Arten toter Zellen pro 1000 Zweikernzellen bestimmt. In den Zweikernzellen werden die verschiedenen Formen der DNA-Schäden pro 1000 Zweikernzellen gezählt. Der Vergleich der unterschiedlichen Werte gibt Aufschluss über das Ausmaß der DNA-Schäden und der Gesundheit der Zellen [FENECH, 2000; FENECH, 2007].

### **3. 3. 3. Probenaufbereitung**

Für die vorliegende Arbeit wurde Heparinblut verwendet. Alle Schritte ab der Herstellung bis zum Auftragen der Zellen auf die Objektträger (Schritte c), d), e), f)) müssen zur Vermeidung einer Kontamination im Laminar flow (Sterilwerkbank) durchgeführt werden.

#### **a) Blutabnahme:**

Die Blutabnahme erfolgt mittels Venenpunktion in Vacuette® Blutentnahmeröhrchen von Greiner Bio-one.

#### **b) Herstellung eines Mediums:**

30 ml RPMI + 3,3 ml FBS + 330 µl Sodium-L-pyruvate + 330 µl L-Glutamin

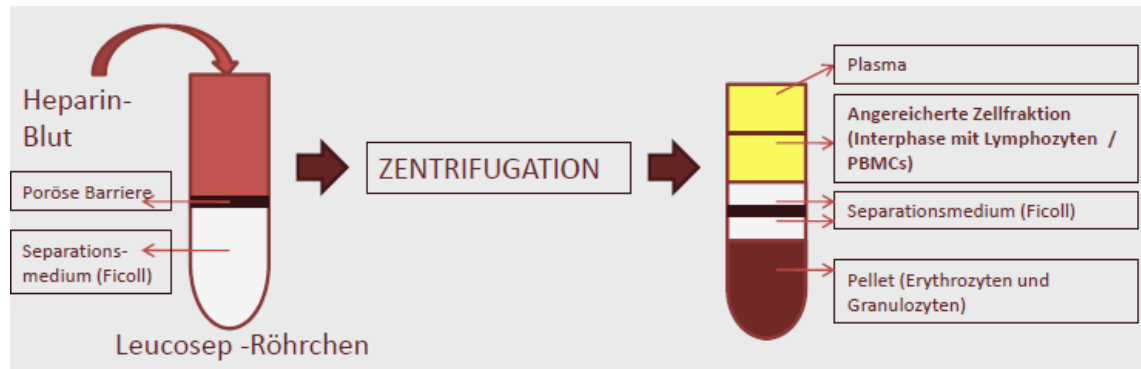
In diesem Nährmedium können sich die Lymphozyten später optimal teilen.

Die folgenden Schritte werden im Laminar flow durchgeführt.

#### **c) Lymphozytenisolierung:**

Die abgenommenen 9 ml Heparin-Blut werden vorsichtig in das Leucosep-Röhrchen gegossen (max. 5 ml) um die PBMCs, zu denen die Lymphozyten zählen, mittels Ficoll zu isolieren.

Das Röhrchen wird nun zentrifugiert (15 min, 2185 rpm (1036 g), bei min 16°C, ohne Bremse).



**Abbildung 3:** Isolierung der Lymphozyten aus Heparinblut

Die Zellfraktion wird nun mit einer sterilen Plastikpasteurpipette abgenommen und in ein steriles 15 ml-Falconröhrchen (Zentrifugenröhrchen) überführt. Um die Zellen zu waschen werden 15 ml abgekühlter PBS-Puffer auf die Zellsuspension gegeben. Ab diesem Schritt wird auf Eis gearbeitet um die Lymphozyten vor Oxidation zu schützen.

Mittels einer sterilen Glaspasteurpipette wird die Zellsuspension in ein neues Röhrchen überführt. Dieses wird mit PBS-Puffer auf 10 ml aufgefüllt, dann 5x über Kopf geschwenkt und anschließend zentrifugiert (304 rcf = 1300 rpm, 10 min, 4°C, brake).

Mittels einer sterilen Glaspasteurpipette wird danach der Überstand abgesaugt und das verschlossene Röhrchen 5 mal über Kopf geschwenkt und zentrifugiert (304 rcf = 1300 rpm, 15 min, 4°C, brake).

Nach Absaugen des Überstandes wird das Zellpellet in 1 ml PBS-Puffer resuspendiert. Davon werden 20 µl in einem Cup mit 60 µl PBS-Puffer für Zellzahlbestimmung (mittels Countess, VF = 4) gemischt.

Der Rest wird zentrifugiert (304 rcf = 1300 rpm, 10 min, 4°C, brake) und der Überstand wird nachher erneut abgesaugt.

Der Pellet wird in 530 µl Medium aufgenommen.

#### d) Zellzahlbestimmung (Countess):

10  $\mu$ l der verdünnten Zellsuspension werden mit 10  $\mu$ l Trypanblau gemischt auf einen Objektträger pipettiert und anschließend mithilfe des Countess (Invitrogen) vermessen.

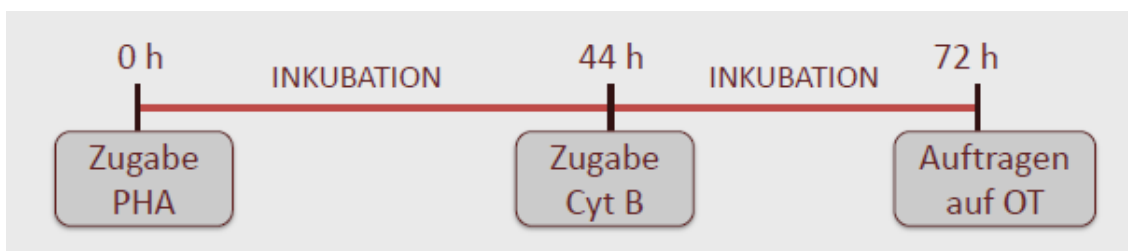
#### e) Inkubation:

x  $\mu$ l Zellsuspension + x  $\mu$ l RPMI in einem Falconröhrchen ansetzen.

Insgesamt wird ein Volumen von 750  $\mu$ l benötigt mit einer Konz. von  $10^6$  Zellen/ml. Die genauen Mengen richten sich nach der ermittelten Zellzahl.

Pro Probe werden 2 sterile Röhrchen (A und B) angesetzt (Doppelbestimmung).  
(Die Zellen können bei Raumtemperatur im Dunkeln 1-2 h in verschlossenen Röhrchen stehen.)

Die folgenden Schritte richten sich nach dem Zeitplan in Abbildung 4.



**Abbildung 4:** Zeitliche Abfolge des CBMN cyt Assay

Nun werden 15  $\mu$ l **Phytohämagglutinin (PHA)** hinzugefügt, um die mitotische Zellteilung zu stimulieren. Anschließend werden die Falconröhrchen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> für genau 44 h inkubiert (*wichtig: Startzeit notieren!*).

#### f) Zugabe von Cytochalasin B (Cyt-B):

Die Konzentration der Cyt-B-Stocklösung beträgt 600  $\mu$ g/ml. Benötigt wird eine Konzentration von 60  $\mu$ g/ml. Um diese Konzentration zu erhalten werden 20  $\mu$ l der Stocklösung mit 1980  $\mu$ l RPMI gemischt.

56,2  $\mu$ l vom Überstand des Mediums der Zellkultur werden entfernt und durch 56,2  $\mu$ l Cyt-B-Lösung ersetzt (*Spitze nur im Überstand spülen*).

Durch die Zugabe von Cytochalasin B wird die Zellteilung gestoppt und die Falconröhrchen werden weitere 28h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Die folgenden Schritte werden nicht mehr im Laminar flow durchgeführt.

### **g) Auftragen der Zellen auf die Objektträger (OT):**

Für jeden Probanden werden vier Objektträger mit Codierung und Röhrchennummer versehen um Irrtümer auszuschließen.

Zunächst werden 200 µl vom Zellkulturüberstand entfernt und die Zellsuspension durch „Fingerklopfen“ am Röhrchen leicht gemischt.

Nun erfolgt die Zugabe von 46 µl DMSO (*mit Spitze mischen*) und 120 µl der Zellsuspension werden nach erneutem mischen durch „Fingerklopfen“ in die Trichteröffnung des entsprechend beschrifteten Objektträger pipettiert. *(Die Objektträger werden vorher beschriftet und mit Filterpapier und Trichter zusammen in die Zentrifuge gegeben.)*

Ein Spot pro Objektträger wird erzeugt und für jedes Röhrchen werden zwei Objektträger (a und b) präpariert, was vier Objektträger pro Proband entspricht (Aa, Ab, Ba, Bb).

Nun wird mittels einer dafür geeigneten Zentrifuge (Cytospin) die Zellen auf den Objektträger gebracht (*600 rpm, 5 min, ACCEL high*).

Anschließend lässt man die Objektträger für genau 10 Minuten trocknen (*Uhr stellen - bei längerem Trocknen verändert sich die Morphologie der Zelle, wodurch das Auszählen erschwert wird*).

### **h) Färben der Objektträger:**

Die Objektträger werden in die Färbekammer Rücken an Rücken geschichtet und wie folgt nacheinander in die Färbetröge mit den Färbemitteln gestellt:

→ Diff-Quick Fix: 10 Minuten stehen lassen (*Deckel schließen, Uhr stellen*)

→ Diff-Quick I: 10 x eintauchen

→ Diff-Quick II: 8 x eintauchen

Objektträger zuerst mit Leitungswasser und dann mit bidestilliertem Wasser vorsichtig abspülen, danach mit der Oberseite nach unten auf ein Papier legen (*zum Entfernen des überschüssigen Wassers*). Nach 2 Minuten wenden und für ca. 10-15 Minuten weiter trocknen lassen (*eventuell Kontrolle der Färbung unter dem Lichtmikroskop*).

Die Objektträger mindestens eine halbe Stunde, maximal über Nacht bei Raumtemperatur trocknen lassen.

### **i) Eindeckeln:**

2-3 Tropfen Entellan pro Objektträger auftropfen (*nicht direkt auf den Spot*).

Deckglas darauf geben und über Nacht trocknen lassen, dabei soll das Entellan auch über den Spot gelangen und keine Luftbläschen bilden.

Durch diese Methode werden demnach pro Proband vier Objektträger (Aa, Ab, Ba, Bb) mit gefärbten Lymphozyten erhalten, die haltbar sind und in einem unbestimmten Zeitraum gezählt werden können. Die Objektträger werden bis zum Auszählen in Objektträgerkästen im Dunkeln gelagert und können beliebig oft ausgezählt werden.

## **3. 3. 4. Probenauswertung**

### **a) Auszählen der Proben**

Die fertigen Objektträger werden unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Mit einem Handzähler werden folgende Werte ermittelt:

Insgesamt werden 2000 Zweikernzellen (BN) pro Proband auf insgesamt vier Objektträgern abgezählt.

Auf jedem Objektträger wird zunächst bis 250 BN gezählt, wobei folgende Parameter mitgezählt werden:

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

Ab 250 BN bis 500 BN werden ausschließlich BN betrachtet und nur noch diese Parameter gezählt:

- ❖ BN mit MNi und MNi insgesamt in BN
- ❖ BN mit NPBs
- ❖ BN mit NBUDs

## b) Beispielhafte Abbildungen

### Zweikernzellen (BN):

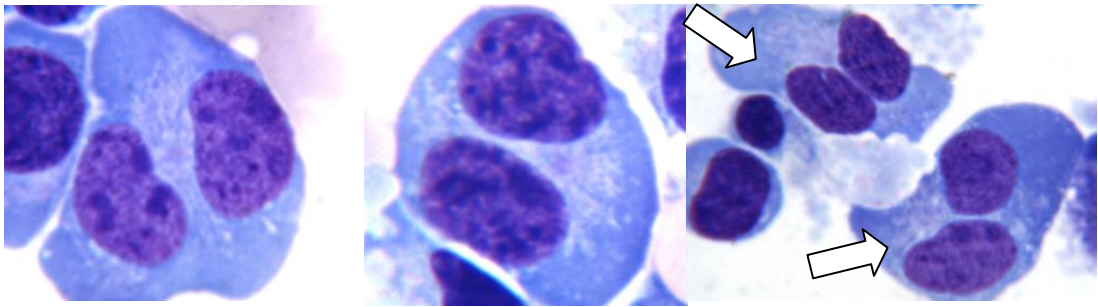


Abbildung 5: Fotografien von Zweikernzellen

### Einkernzellen (MONO):

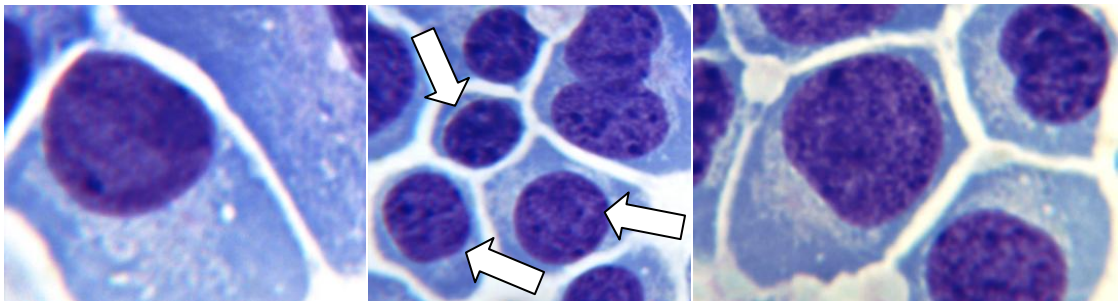


Abbildung 6: Fotografien von Monokernzellen

### Multikernzellen (MULT):

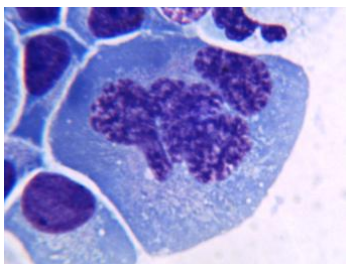


Abbildung 7: Fotografie einer Multikernzellen

### Apoptosen:

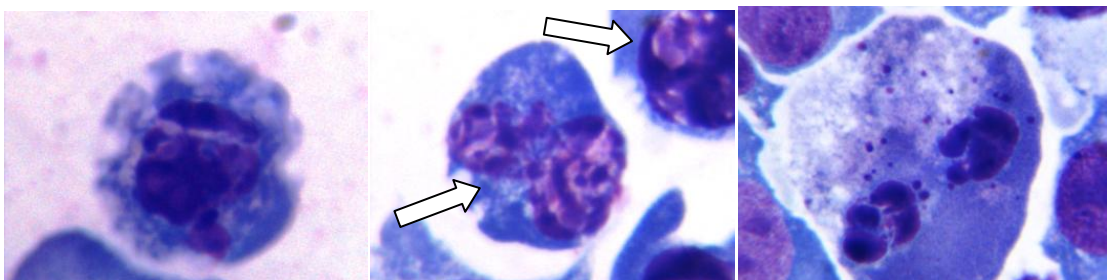
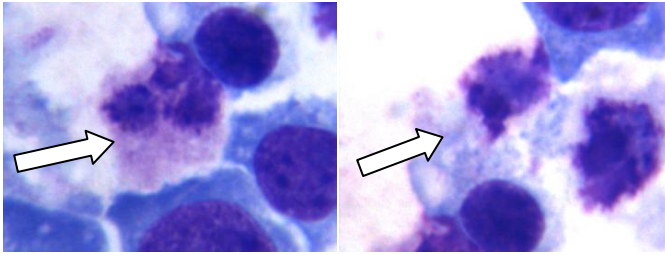


Abbildung 8: Fotografien von apoptotischen Zellen

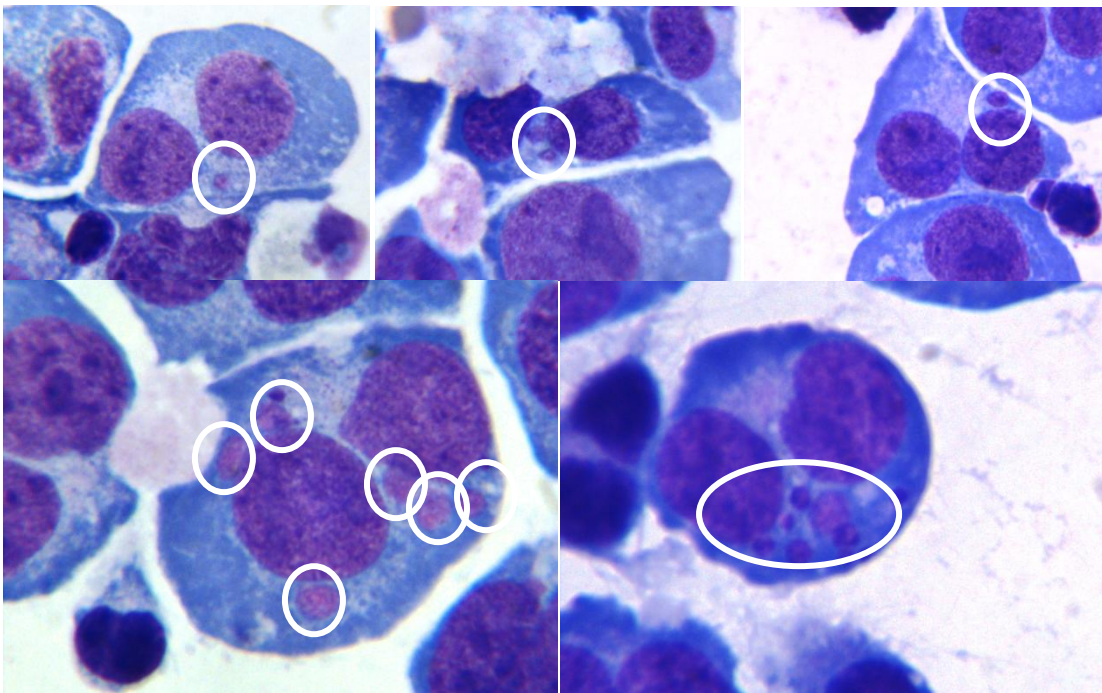
### Nekrosen:



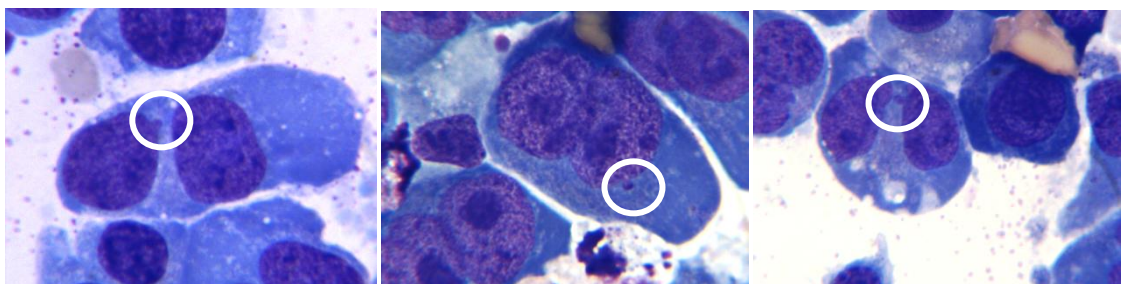
**Abbildung 9:** Fotografien von nekrotischen Zellen

Die Unterscheidung von apoptotischen und nekrotischen Zellen kann schwierig sein. Nekrosen haben eine aufgelöste Zellmembran und das Plasma kann sich auf eine größere Fläche ausgebreitet haben. Sie sind meist heller als die gesunden Zellen in ihrer Umgebung. Apoptosen zersetzen sich anders. Sie haben ein abgegrenztes Plasma mit Membran. Das Innere der Zelle teilt sich in Körperchen auf (Apoptosekörperchen). Apoptitische Zellen sind meist dunkler als gesunde Zellen.

### BN mit MNi:



**Abbildung 10:** Fotografien von Zweikernzellen mit MNi

**BN mit NPBs:****Abbildung 11:** Fotografien von Zellen mit NPBs**BN mit NBUDs:****Abbildung 12:** Fotografien von Zellen mit NBUDs**c) Erwartete Werte laut Literatur**

Die Ergebnisse des CBMN Cyt Assay hängen neben der individuellen Situation der entsprechenden Person (Exposition gegenüber zell- oder genotoxischen Substanzen, genetischer Hintergrund, Alter und Geschlecht) auch von Faktoren der Probenaufbereitung (Umstände der Zellkultivierung, Nährstoffzusammensetzung des Mediums) ab.

Wenn die Lymphozyten von gesunden Individuen stammen und bei optimalen Bedingungen aufbereitet wurden, sind folgende Werte zu erwarten, wobei die MNi-Häufigkeit mit dem Alter steigt und generell bei Frauen um den Faktor 1,4 höher ist:

Häufigkeit von Zweikernzellen (Binucleated cells, BN): 30 – 60 %

Kernteilungsindex (Nuclear Division Index, NDI): 1,3 – 2,2

Nekrotische Zellen: 0 – 9 %

Apoptotische Zellen: 0 – 7 %

MNi pro 1000 BN-Zellen: 0 – 30

NPBs pro 1000 BN-Zellen: 0 – 10

NBUDS pro 1000 BN-Zellen: 0 – 5

Je nachdem, welche genauen Mechanismen hinter Einflussfaktoren dieser Biomarker stehen, kommt es zu unterschiedlichen Veränderungen, so dass einzelne Werte erhöht sein können während andere kaum beeinflusst sind. Besonders hohe Werte für MNi, NPBs, NBUDs, Nekrosen und Apoptosen sowie erniedrigte NDIs können bei Zellen mit genetischem Fehler der DNA-Reparatur, der Antioxidantien-Antwort oder der Apoptose gemessen werden [Fenech, 2007].

### 3.3.5. Datenberechnung

Folgende Berechnungen werden mit Hilfe des Programms Microsoft Office Excel 2007 für jeden Objektträger berechnet:

#### a) Summe aller gezählten Zellen:

|                                                                        |
|------------------------------------------------------------------------|
| Apoptosen + Nekrosen + Einkernzellen + Zweikernzellen + Mehrkernzellen |
|------------------------------------------------------------------------|

#### b) Zellhäufigkeit in %:

|                                                   |
|---------------------------------------------------|
| Zweikernzellen / Summe aller gezählten Zellen*100 |
|---------------------------------------------------|

|                                              |
|----------------------------------------------|
| Apoptosen / Summe aller gezählten Zellen*100 |
|----------------------------------------------|

|                                             |
|---------------------------------------------|
| Nekrosen / Summe aller gezählten Zellen*100 |
|---------------------------------------------|

#### c) Nuclear Division Index (NDI) [Fenech, 2000]:

|                                                                                                                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\frac{\text{Einkernzellen} + 2 \cdot \text{Zweikernzellen} + 4 \cdot \text{Mehrkernzellen}}{\text{Summe lebender Zellen (Einkernzellen + Zweikernzellen + Mehrkernzellen)}}$ |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

#### d) Nuclear Division Cytotoxicity Index (NDCI) [Fenech, 2000]:

|                                                                                                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $\frac{\text{Apoptosen} + \text{Nekrosen} + \text{Einkernzellen} + 2 \cdot \text{Zweikernzellen} + 4 \cdot \text{Mehrkernzellen}}{\text{Summe aller gezählten Zellen}}$ |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

**e) MNi, NPBs und NBUDs pro 1000 Zweikernzellen:**

|                                              |
|----------------------------------------------|
| Zweikernzellen mit MNi / Zweikernzellen*1000 |
| MNi / Zweikernzellen*1000                    |
| NPBs / Zweikernzellen*1000                   |
| NBUDs / Zweikernzellen*1000                  |

Für jeden Probanden werden vier verschiedene Werte für jeden Parameter ermittelt aus denen anschließend pro Proband ein Mittelwert errechnet wird.

**3. 4. Bilirubin im Serum**

Die Konzentrationen des Gesamtbilirubin und des unkonjugierten Bilirubin im Plasma werden mittels einer HPLC-Methode bestimmt (Details siehe Diplomarbeit von Katharina Marisch).

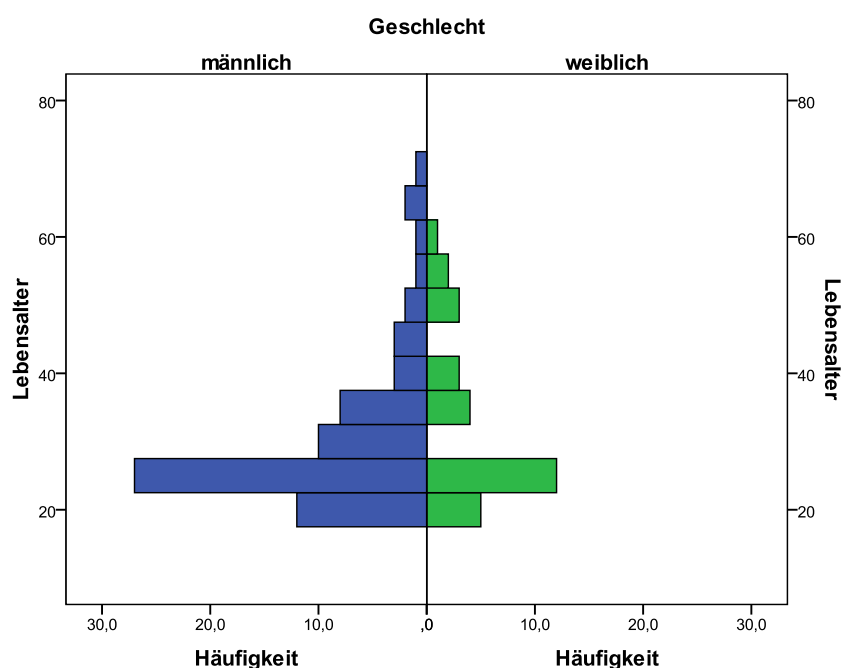
**3. 5. Datenauswertung**

Die erhaltenen Daten werden in das Programm SPSS Statistics 17.0. übertragen und ausgewertet. Sofern die Daten normalverteilt sind, werden die Variablen bei „Gilbert Syndrom“ und „Kontrolle“ mit Hilfe des t-Tests für 2 unabhängige Stichproben verglichen. Der Mann-Whitney-U-Test ist die Alternative für den Fall, dass Daten nicht normalverteilt sind. Der Zusammenhang zwischen Variablen wird durch die Pearson Korrelation geprüft. Das Kriterium für einen signifikanten Unterschied der Gruppen beziehungsweise einer signifikanten Korrelation ist ein p-Wert  $\leq 0,05$ .

## 4. ERGEBNISSE

### 4. 1. Deskriptive Statistik

Zur Teilnahme an der Studie erklärten sich 110 Personen bereit, wovon 103 beide Blutabnahmen absolvierten. Zwei von diesen 103 Probanden wurden nachträglich von den Auswertungen exkludiert, da eine stark rauchte und die andere eine erhöhte Nüchternblutglukose aufwies.



**Abbildung 13:** Alter und Geschlecht der Studienpopulation

Die Studienpopulation beinhaltete demnach insgesamt 101 Personen, wovon 70 Männer ( $31 \pm 12$  Jahre alt) und 31 Frauen ( $32 \pm 12$  Jahre alt) waren. Die durchschnittliche Serumkonzentration des unkonjugierten Bilirubin betrug  $1,19 \text{ mg/dl}$  ( $\pm 0,88 \text{ mg/dl}$ ) für die gesamte Studienpopulation.

Bei zwei Probanden konnten die Objektträger nicht ausgezählt werden, sie wurden daher von der Analyse ausgeschlossen.

## 4. 2. Der Einfluss von unkonjugiertem Serum-Bilirubin

Insgesamt wurden bei 99 Personen Bilirubinspiegel und Micronucleus Assay Daten analysiert.

### a) Gruppenvergleiche

Die Gruppenzuteilung erfolgte anhand der Konzentration an unkonjugiertem Bilirubin (UCB) im Serum, wobei ein Wert oberhalb von  $17,1 \mu\text{mol/l}$  zu Gilbert Syndrom (GS) und unterhalb zu Kontrolle (K) eingeteilt wurde. 17 Personen wurden exkludiert, da eine eindeutige Zuteilung nicht möglich war.

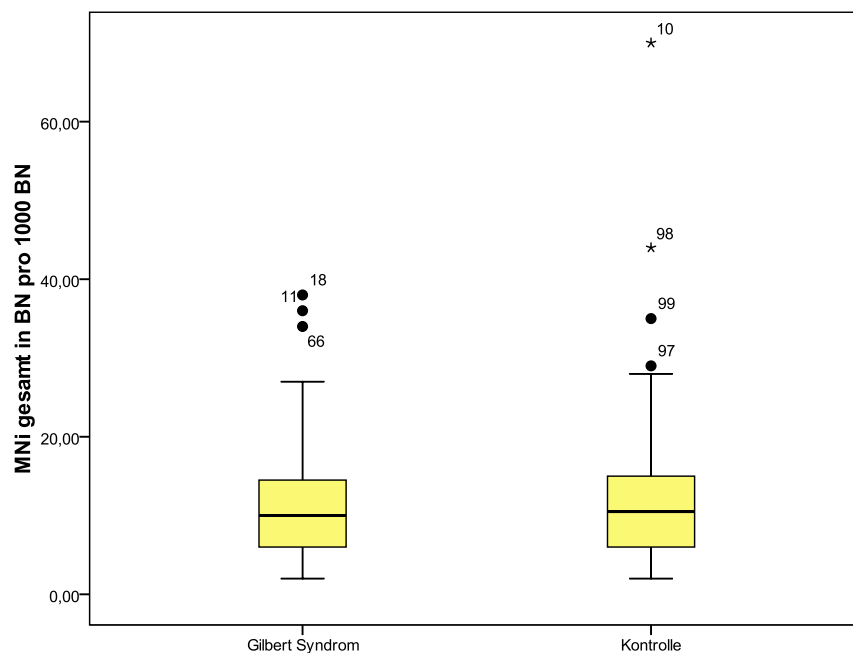
Im direkten Vergleich der beiden Gruppen konnten für keinen der Parameter des CBMN cytome Assay ein signifikanter Unterschied gezeigt werden (siehe Tabelle 2).

|                     | Gilbert Syndrom  | Kontrolle         | p-Wert |
|---------------------|------------------|-------------------|--------|
| <b>Anzahl</b>       | 44               | 38                | -      |
| <b>MNi (gesamt)</b> | $12,27 \pm 8,86$ | $14,26 \pm 13,09$ | 0,514  |
| <b>BN mit NPBs</b>  | $1,32 \pm 1,49$  | $1,37 \pm 1,30$   | 0,472  |
| <b>BN mit NBUDs</b> | $3,46 \pm 2,59$  | $2,90 \pm 1,86$   | 0,523  |
| <b>Apoptosen</b>    | $0,70 \pm 0,38$  | $0,81 \pm 0,56$   | 0,298  |
| <b>Nekrosen</b>     | $0,65 \pm 0,43$  | $0,57 \pm 0,51$   | 0,435  |
| <b>NDI</b>          | $2,11 \pm 0,18$  | $2,06 \pm 0,20$   | 0,170  |
| <b>NDCI</b>         | $2,10 \pm 0,17$  | $2,04 \pm 0,19$   | 0,172  |

**Tabelle 2:** Vergleiche Gilbert Syndrom und Kontrolle bezüglich der Parameter des Micronucleus Assay

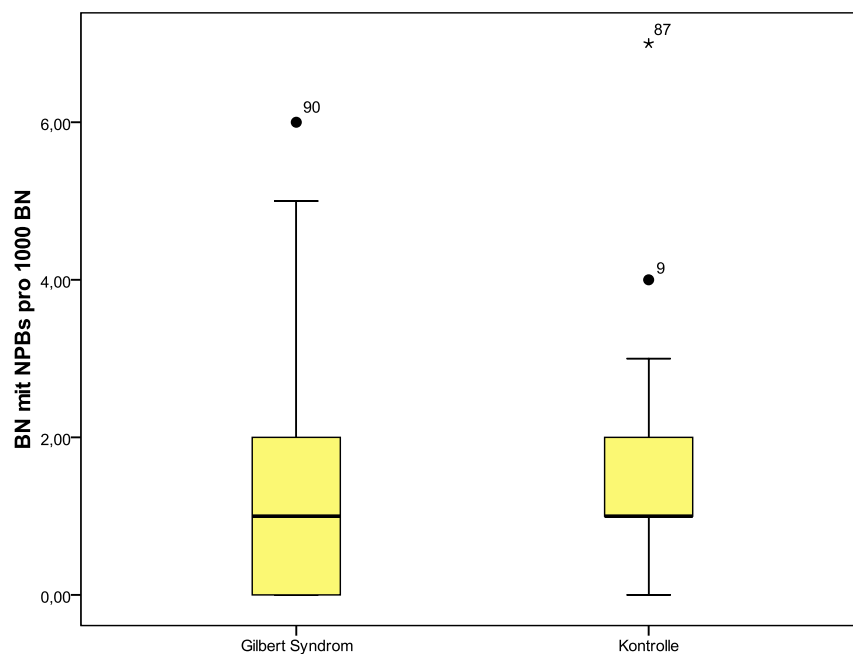
In den Abbildungen 14–20 werden jeweils die Gruppe Gilbert Syndrom der Kontrollgruppe bezüglich der einzelnen Parameter als Boxplot Diagramm gegenübergestellt. Die dunkle Linie in der Mitte der Box steht für den Median. Die Ausdehnung der Box entspricht dem Interquartilsabstand. Die Ausdehnung der T-Balken (Whisker) entspricht dem 1,5fachen Interquartilsabstand. Die Punkte stehen für Extremwerte, die Sterne für Ausreißer.

**b) MNI und unkonjugiertes Serum-Bilirubin**

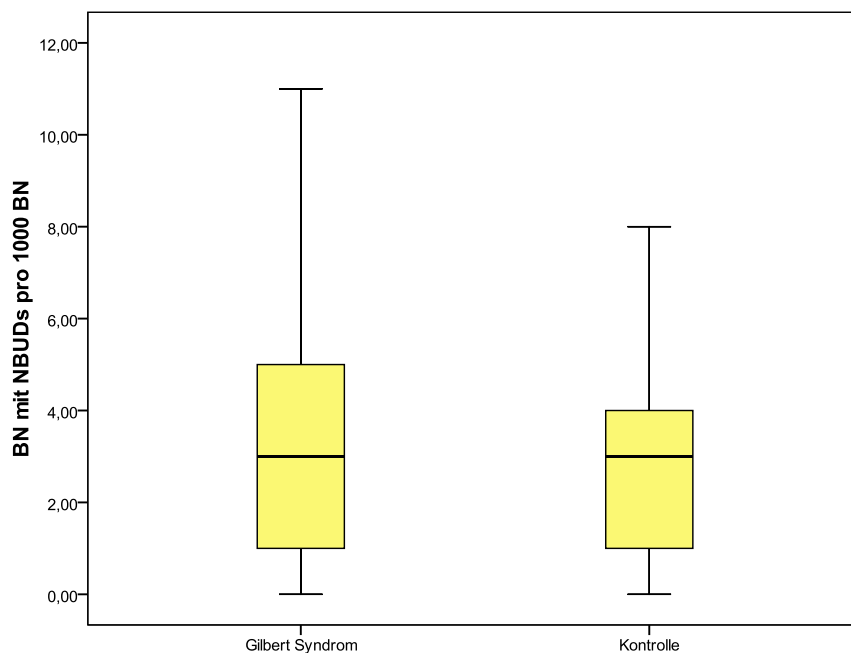
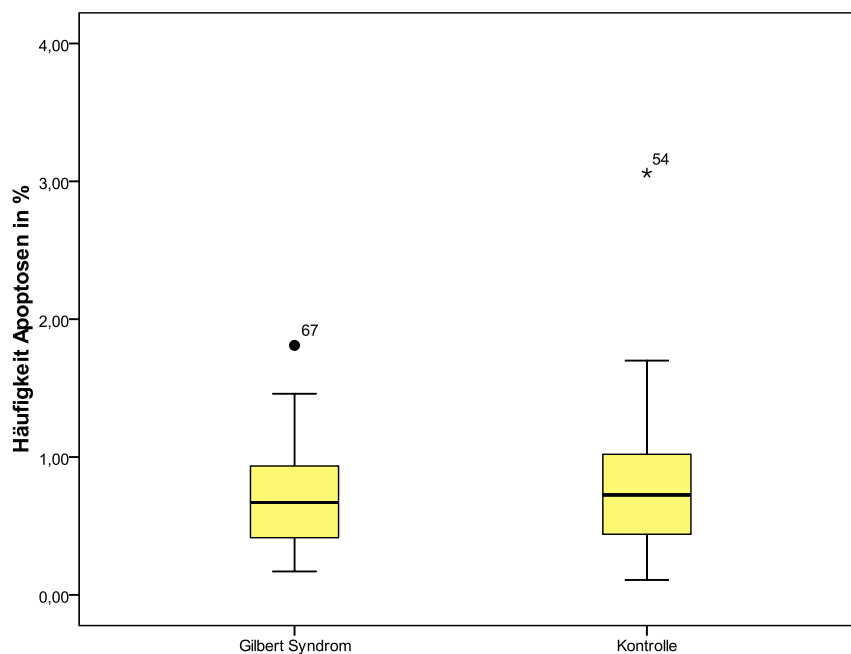


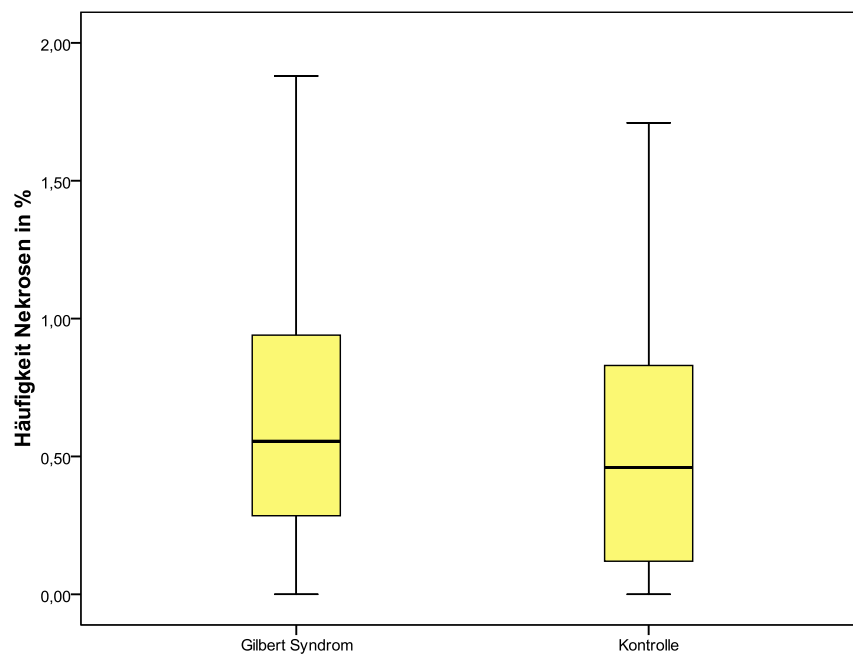
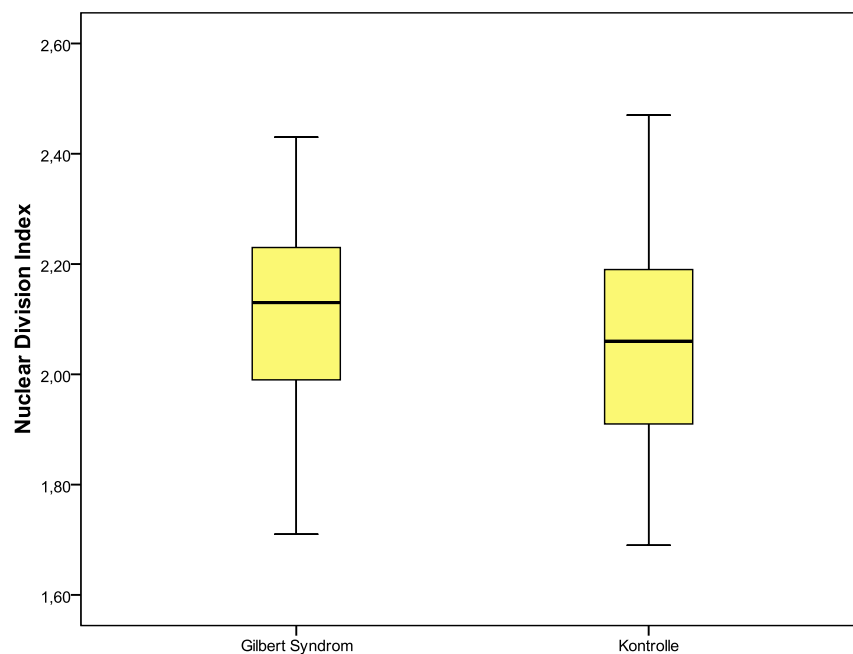
**Abbildung 14:** MN-Häufigkeit in Gilbert Syndrom und Kontrolle

**c) NPBs und unkonjugiertes Serum-Bilirubin**

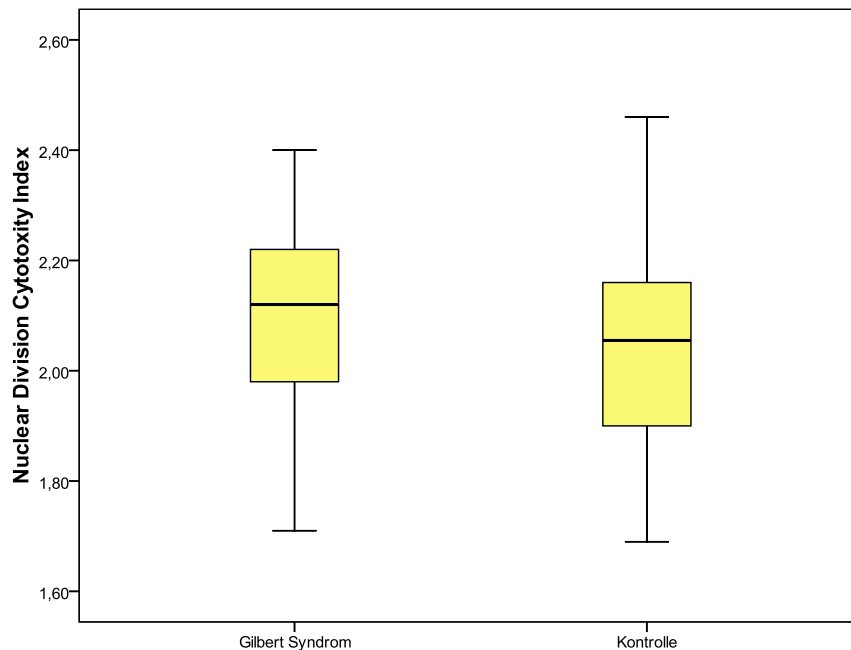


**Abbildung 15:** NPB-Häufigkeit in Gilbert Syndrom und Kontrolle

**d) NBUDs und unkonjugiertes Serum-Bilirubin****Abbildung 16:** NBUD-Häufigkeit in Gilbert Syndrom und Kontrolle**e) Apoptosen und unkonjugiertes Serum-Bilirubin****Abbildung 17:** Häufigkeit von Apoptosen in Gilbert Syndrom und Kontrolle

**f) Nekrosen und unkonjugiertes Serumbilirubin****Abbildung 18:** Häufigkeit von Nekrosen in Gilbert Syndrom und Kontrolle**g) NDI und unkonjugiertes Serumbilirubin****Abbildung 19:** NDI in Gilbert Syndrom und Kontrolle

## h) NDCI und unkonjugiertes Serumbilirubin

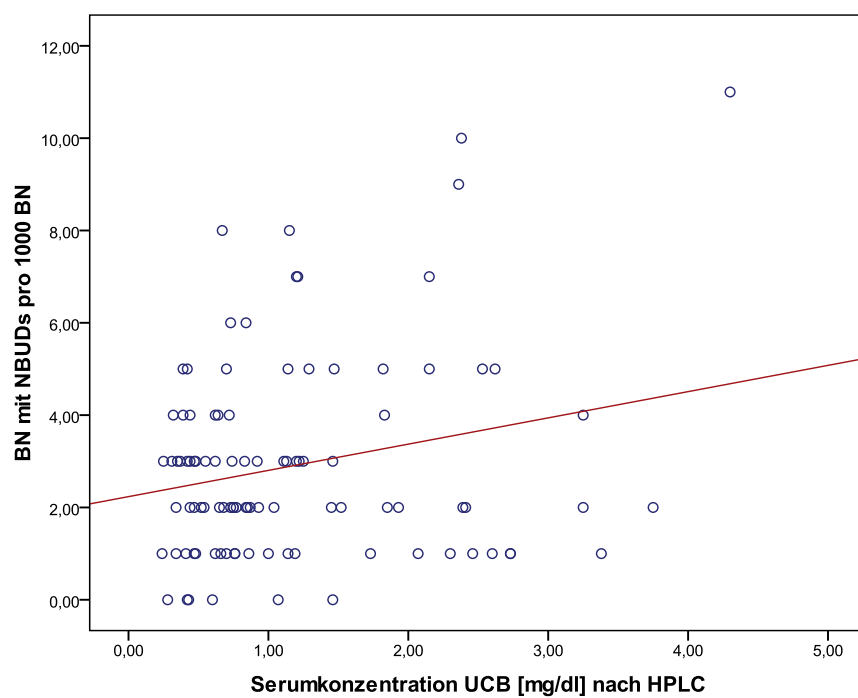


**Abbildung 20:** NDCI in Gilbert Syndrom und Kontrolle

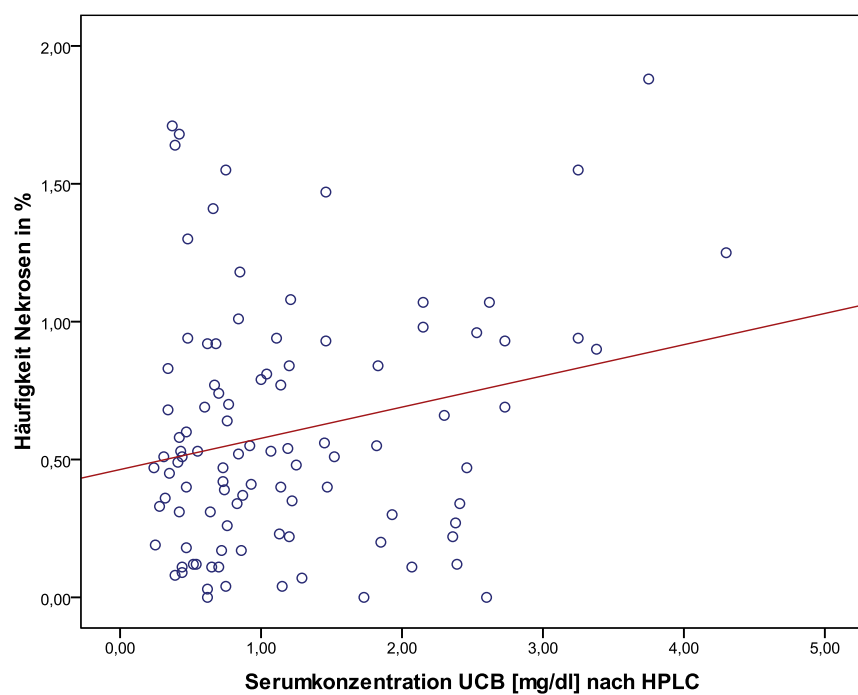
## i) Korrelationen zu UCB-Konzentration im Serum

In diesem Abschnitt werden Zusammenhänge zwischen Serumkonzentration des unkonjugierten Bilirubin (von den 99 Probanden) und Parametern des Micronucleus Assay geprüft.

Nur die Häufigkeiten von NBUDs und Nekrosen korrelierten positiv mit der Konzentration an unkonjugiertem Serum-Bilirubin. (siehe Abbildungen 21 und 22). Andere Parameter zeigten keinen signifikanten Zusammenhang und sind auch nicht graphisch dargestellt.



**Abbildung 21:** Korrelation Serumkonzentration UCB und NBUD-Häufigkeit ( $r = 0,227$ ;  $p = 0,024$ )



**Abbildung 22:** Korrelation Serumkonzentration UCB und Nekrosen-Häufigkeit ( $r = 0,227$ ;  $p = 0,024$ )

#### 4. 3. Geschlechtsspezifische Unterschiede

Die Vergleiche zwischen Männer und Frauen hinsichtlich der Messwerte des Micronucleus Assay sind in Tabelle 3 zusammengefasst und signifikante Unterschiede sind hervorgehoben.

|                     | Männer       | Frauen        | p-Wert       |
|---------------------|--------------|---------------|--------------|
| <b>Anzahl</b>       | 69           | 30            | -            |
| <b>MNi (gesamt)</b> | 10,29 ± 7,76 | 17,53 ± 14,47 | <b>0,004</b> |
| <b>BN mit NPBs</b>  | 1,28 ± 1,42  | 1,20 ± 1,03   | 0,725        |
| <b>BN mit NBUDs</b> | 2,91 ± 2,19  | 2,90 ± 2,30   | 0,981        |
| <b>Apoptosen</b>    | 0,83 ± 0,51  | 0,66 ± 0,37   | 0,116        |
| <b>Nekrosen</b>     | 0,69 ± 0,47  | 0,38 ± 0,26   | <b>0,000</b> |
| <b>NDI</b>          | 2,12 ± 0,20  | 2,01 ± 0,15   | <b>0,010</b> |
| <b>NDCI</b>         | 2,10 ± 0,20  | 2,00 ± 0,15   | <b>0,014</b> |

**Tabelle 3:** Vergleiche Männer und Frauen bezüglich der Parameter des Micronucleus Assay

Bei den Frauen zeigten sich signifikant mehr MNi und signifikant weniger Nekrosen. NDI und NDCI waren ebenfalls signifikant niedriger. Die anderen Parameter des CBMN cyt Assay waren unbeeinflusst vom Geschlecht (siehe Tabelle 3).

In den Abbildungen 23–26 werden die signifikanten Unterschiede zwischen den Männern und Frauen als Boxplot dargestellt

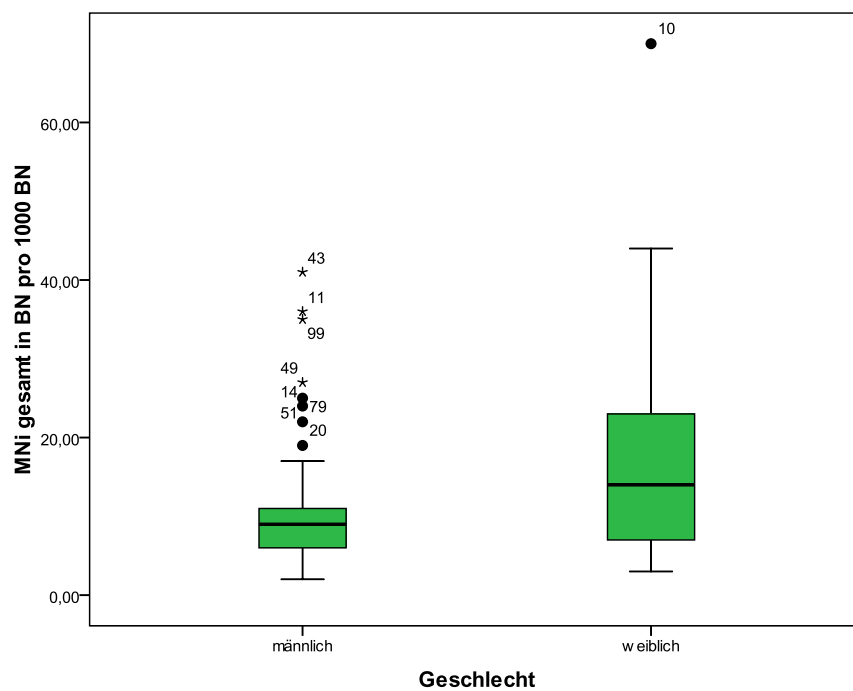


Abbildung 23: MN-Häufigkeit bei Männern und Frauen ( $\text{♀} > \text{♂}$ ,  $p = 0,004$ )

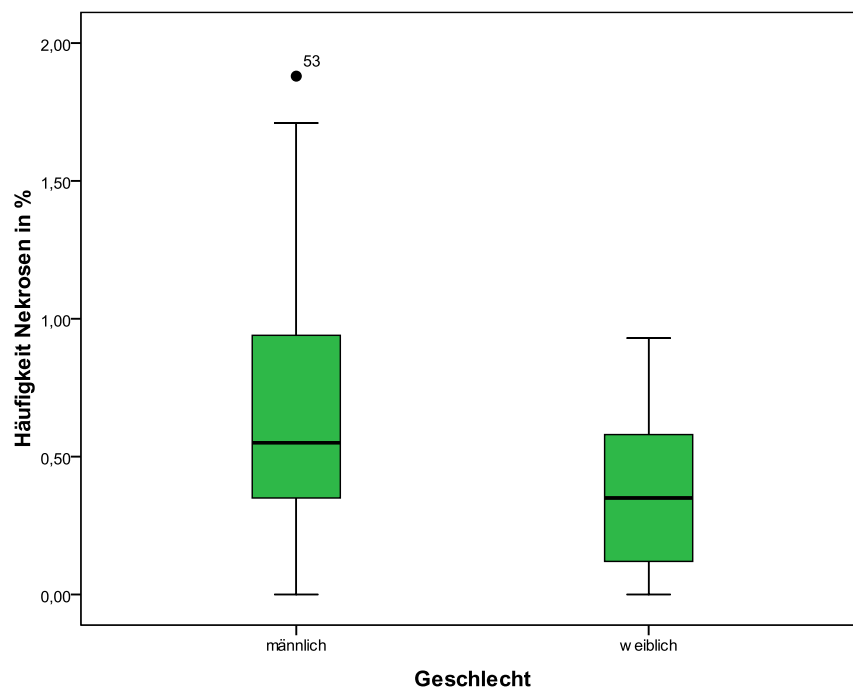


Abbildung 24: Häufigkeit von Nekrosen bei Männern und Frauen ( $\text{♀} < \text{♂}$ ,  $p < 0,001$ )

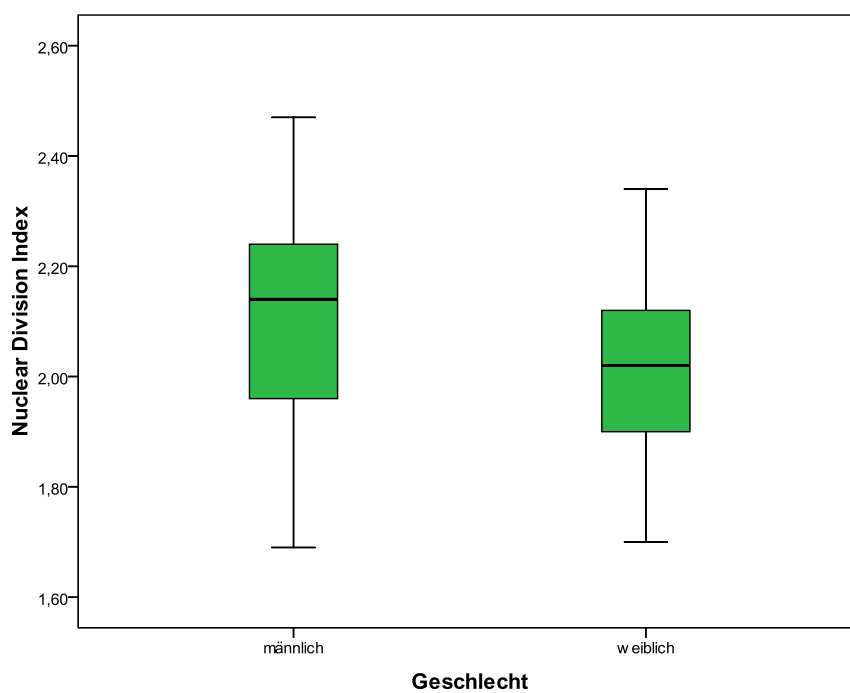


Abbildung 25: NDI bei Männern und Frauen (♀ < ♂,  $p = 0,010$ )

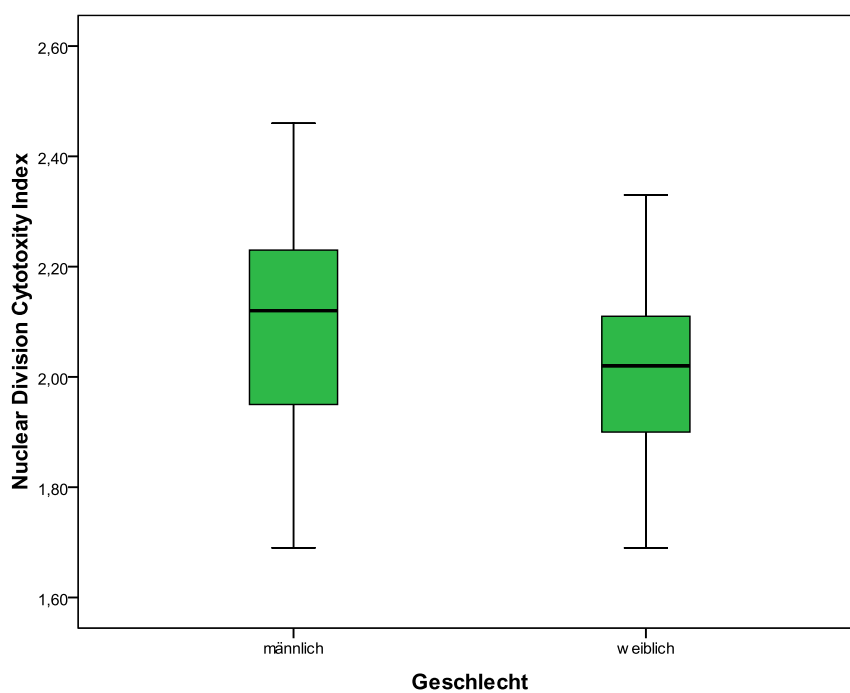
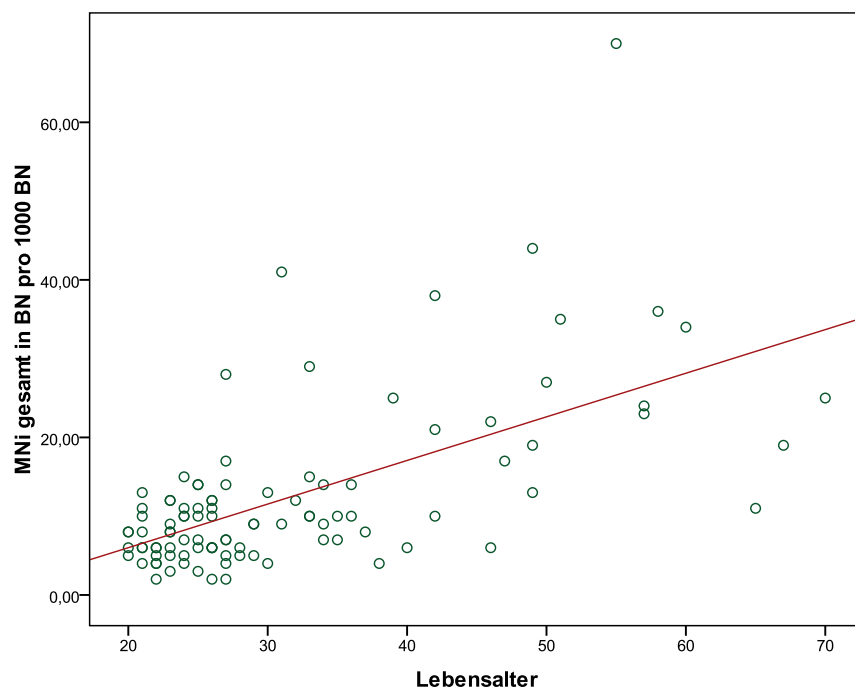


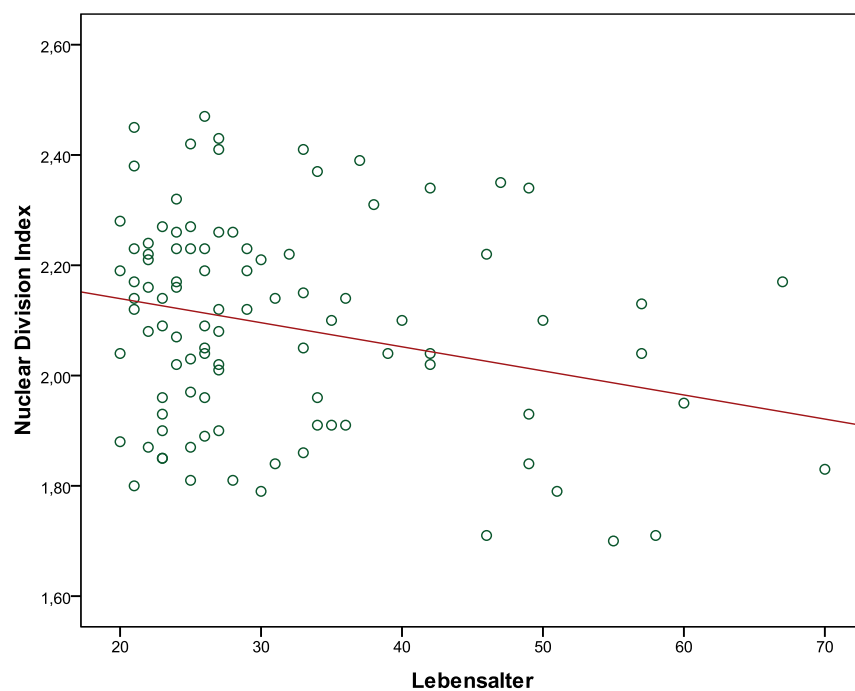
Abbildung 26: NDCI bei Männern und Frauen (♀ < ♂,  $p = 0,014$ )

#### 4. 4. Altersbedingte Einflüsse

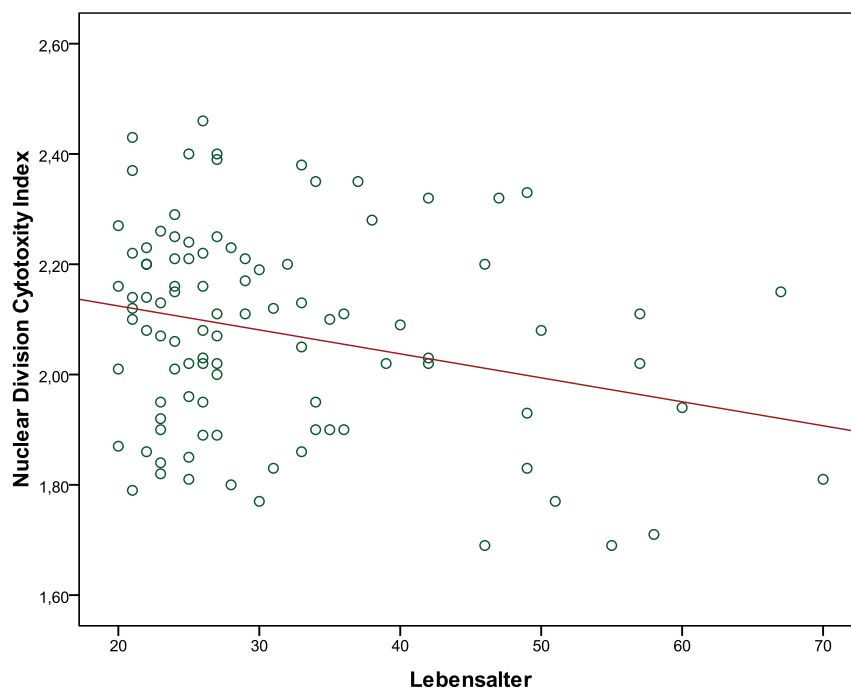
Die signifikanten Zusammenhänge zwischen Alter und den Messwerten des Micronucleus Assay werden in diesem Abschnitt grafisch dargestellt.



**Abbildung 27:** Korrelation Lebensalter und Häufigkeit von MNi ( $r = 0,611$ ;  $p < 0,001$ )



**Abbildung 28:** Korrelation von Lebensalter und NDI ( $r = -0,273$ ;  $p = 0,006$ )



**Abbildung 29:** Korrelation von Lebensalter und NDCI ( $r = -0,273$ ;  $p = 0,006$ )

Eine sehr starke positive Korrelation besteht zwischen dem Alter und der Häufigkeit von MNi. Je älter die Personen waren desto mehr MNi wiesen sie auf. NDI und NDCI sanken mit zunehmendem Alter, wobei diese Korrelationen weniger stark sind (siehe Abbildungen 27, 28, 29). Die anderen Parameter des Micronucleus Assay zeigen sich unbeeinflusst vom Alter.

#### 4. 5. Lebensalter, Geschlecht und Bilirubin

##### 4. 5. 1. Einflussfaktor Alter bei Männern und Frauen

|                                                 | Korrelation | p-Wert       |
|-------------------------------------------------|-------------|--------------|
| <b>MNi [pro 1000 BN] - Lebensalter (Männer)</b> | 0,604       | <b>0,000</b> |
| <b>MNi [pro 1000 BN] - Lebensalter (Frauen)</b> | 0,708       | <b>0,000</b> |
| <b>NDI - Lebensalter (Männer)</b>               | -0,267      | <b>0,026</b> |
| <b>NDI - Lebensalter (Frauen)</b>               | -0,251      | 0,180        |
| <b>NDCI - Lebensalter (Männer)</b>              | -0,273      | <b>0,023</b> |
| <b>NDCI - Lebensalter (Frauen)</b>              | -0,252      | 0,179        |

**Tabelle 4:** Altersbedingte Korrelationen bei Männern und Frauen

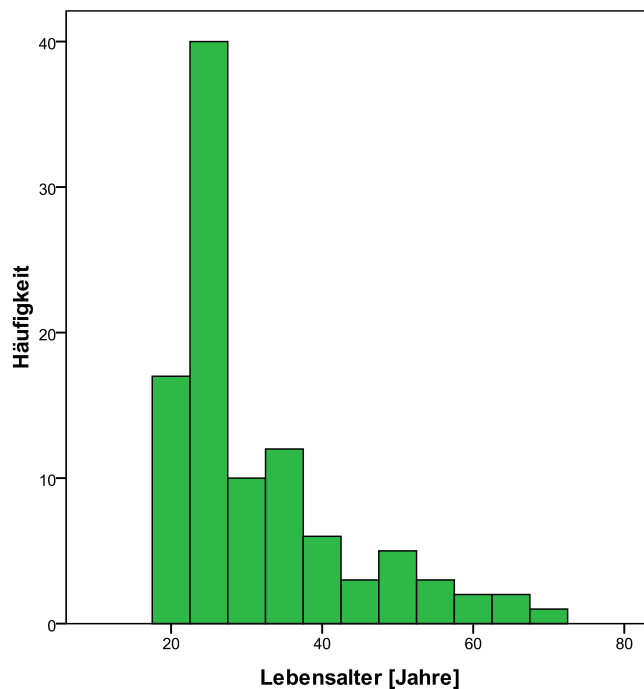
Der Zusammenhang zwischen MNi, NDI, NDCI und dem Lebensalter zeigte sich bei den Männern ebenfalls auf einem signifikanten Niveau. Bei den Frauen bestand kein Zusammenhang zwischen NDI, NDCI und dem Lebensalter (siehe Tabelle 4).

##### 4. 5. 2. Einflussfaktor Bilirubin bei Männern und Frauen

Innerhalb der Geschlechter bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Personen mit Gilbert Syndrom und der Kontrollgruppe hinsichtlich der unterschiedlichen Parameter des Micronucleus Assay. Lediglich ein möglicher Trend zu einer geringeren Apoptose-Häufigkeit ( $p = 0,086$ ) bestand bei den Männern mit Gilbert Syndrom.

### 4. 5. 3. Einflussfaktor Bilirubin in verschiedenen Altersgruppen

#### a) Altersverteilung in der Studienpopulation



**Abbildung 30:** Das Alter der Studienpopulation

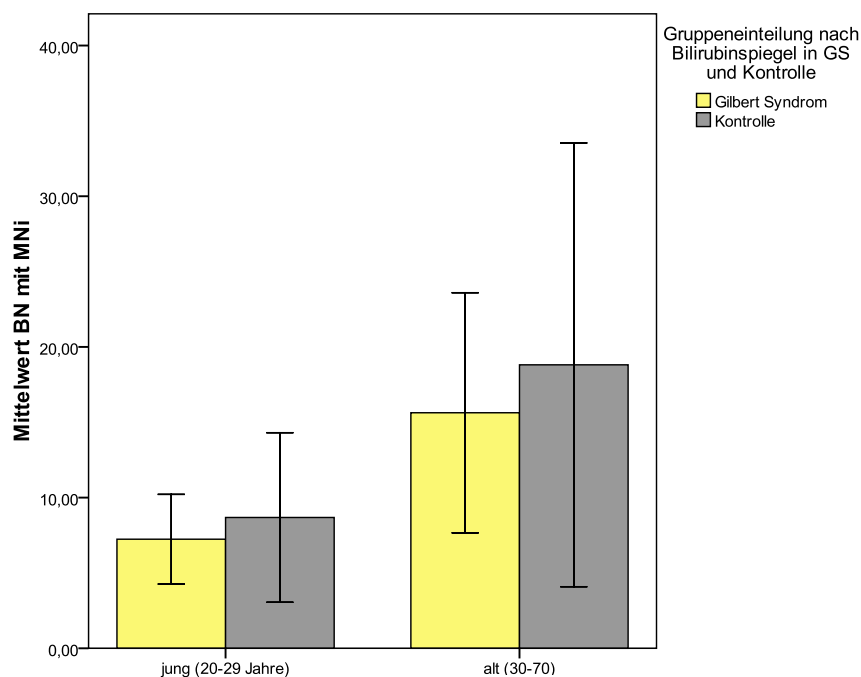
Jüngere Teilnehmer überwiegen in dieser Probandengruppe. Von den insgesamt 99 Studienteilnehmern mußten 17 aus der folgenden Analyse exkludiert werden, da eine eindeutige Zuteilung zu Gilbert Syndrom oder Kontrolle nicht möglich war (Gesamtanzahl = 82).

#### b) Vergleiche innerhalb von zwei Altersgruppen:

| Personenanzahl in den Gruppen |                 |           |        |
|-------------------------------|-----------------|-----------|--------|
|                               | Gilbert Syndrom | Kontrolle | Gesamt |
| <b>Jung: 20–29 Jahre</b>      | 25              | 22        | 47     |
| <b>Alt: 30–70 Jahre</b>       | 16              | 19        | 35     |
| <b>Gesamt</b>                 | 44              | 38        | 82     |

**Tabelle 5:** Gruppeneinteilung nach Alter

Beim Vergleich von GS und Kontrolle innerhalb der beiden Altersgruppen (Einteilung siehe Tabelle 5) zeigte sich in der Gruppe der jüngeren ein signifikanter Unterschied bei NDCI, der höher in der GS-Gruppe war ( $p = 0,030$ ). In der älteren Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede von GS und Kontrolle bezüglich des Micronucleus Assay. Auch für die anderen Parameter des Micronucleus Assay zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen GS und Kontrolle.



**Abbildung 31:** Vergleich NBUD-Häufigkeit innerhalb zweier Altersgruppen (Gruppe alt:  $p = 0,192$ )

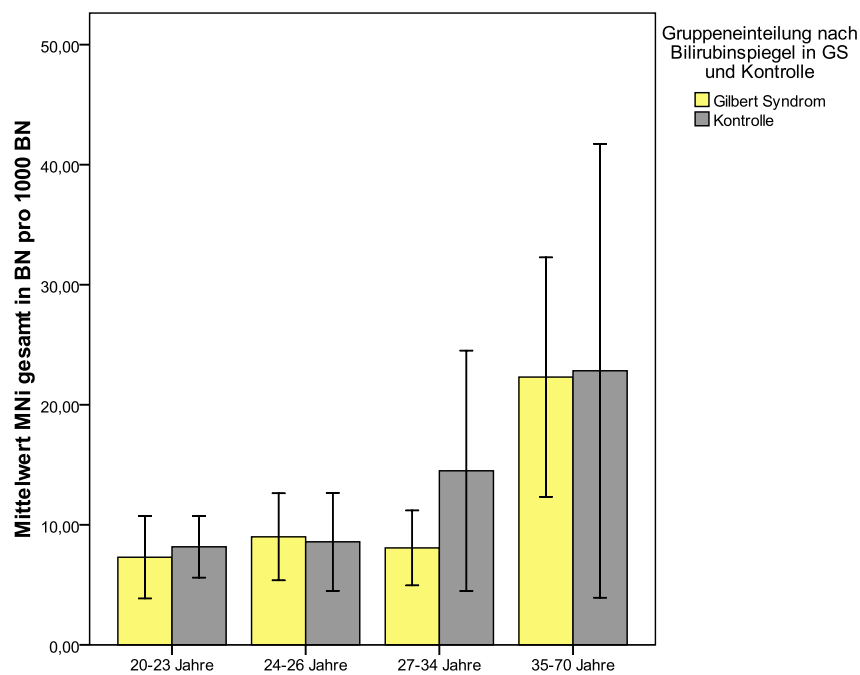
In der älteren Gruppe tendierten Personen mit dem Gilbert Syndrom zu einer höheren NBUD-Häufigkeit als jene der Kontrollgruppe ohne jedoch einen signifikanten Unterschied zu zeigen (siehe Abbildung 30).

**c) Vergleiche innerhalb von vier Altersgruppen:**

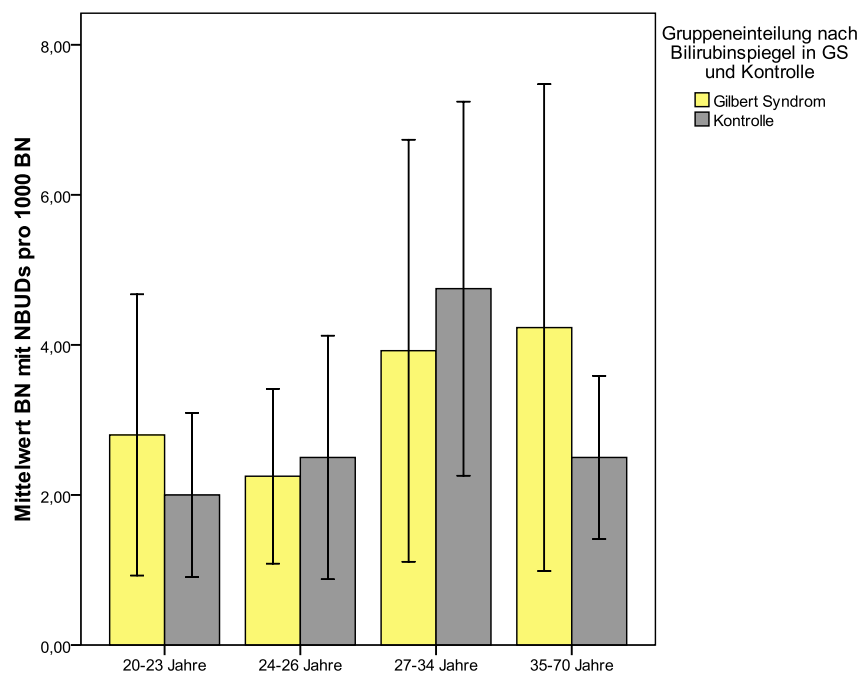
| <b>Personenanzahl in den Gruppen</b> |                        |                  |               |
|--------------------------------------|------------------------|------------------|---------------|
|                                      | <b>Gilbert Syndrom</b> | <b>Kontrolle</b> | <b>Gesamt</b> |
| <b>20–23 Jahre</b>                   | 10                     | 6                | 16            |
| <b>24–26 Jahre</b>                   | 8                      | 12               | 20            |
| <b>27–34 Jahre</b>                   | 13                     | 8                | 21            |
| <b>35–70 Jahre</b>                   | 13                     | 12               | 25            |
| <b>Gesamt</b>                        | 44                     | 38               | 82            |

**Tabelle 6:** Gruppeneinteilung nach Alter

Hinsichtlich dieser altersabhängigen Einteilung (siehe Tabelle 6) zeigten sich beim direkten Vergleich von GS und Kontrolle signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppe 24–26 Jahre bezüglich NDI ( $p = 0,017$ ) und NDCI ( $p = 0,011$ ), die beide höher in der GS-Gruppe waren. In der Gruppe 27–34 Jahre wiesen Apoptose- ( $p = 0,011$ ) und Nekrose-Häufigkeit ( $p = 0,014$ ) signifikant höhere Werte in der GS-Gruppe auf. Des Weiteren tendierten Apoptosen zu einer geringeren Häufigkeit bei GS in der jüngsten Gruppe ( $p = 0,189$ ).



**Abbildung 32:** Vergleich MN-Häufigkeit innerhalb vierer Altersgruppen (Gruppe 27-34 Jahre:  $p = 0,117$ )



**Abbildung 33:** Vergleich NBUD-Häufigkeit innerhalb vierer Altersgruppen (Gruppe 35-70 Jahre:  $p = 0,090$ )

Ohne ein signifikantes Niveau zu erreichen zeichneten sich sowohl eine niedrigere MN-Häufigkeit bei GS ( $p = 0,117$ ) in der 27–34 –jährigen Gruppe

(siehe Abbildung 32) als auch eine höhere NBUD-Häufigkeit bei GS ( $p = 0,090$ ) in der ältesten Gruppe (Abbildung 33) als Trends ab.

#### 4. 6. Der Einfluss weiterer Parameter

Inkludiert in diese Analysen waren folgende im Serum bestimmte Parameter:

Triglyceride [mg/dl], Cholesterin [mg/dl], High Density Lipoprotein (HDL) [mg/dl], Cholesterin/HDL-Index, Low Density Lipoprotein (LDL) [mg/dl], Kreatinin [mg/dl], Harnsäure [mg/dl], Glukose [mg/dl], Albumin [g/l] und Eisen [ $\mu$ g/dl].

|                                              | Korrelation | p-Wert       |
|----------------------------------------------|-------------|--------------|
| <b>MNi [pro 1000 BN] – Kreatinin [mg/dl]</b> | -0,246      | <b>0,014</b> |
| <b>MNi [pro 1000 BN] – Glucose [mg/dl]</b>   | 0,214       | <b>0,034</b> |
| <b>MNi [pro 1000 BN] – Albumin [g/l]</b>     | -0,328      | <b>0,001</b> |
| <b>Nekrosen [%] – Kreatinin [mg/dl]</b>      | 0,203       | <b>0,044</b> |
| <b>Nekrosen [%] – Harnsäure [mg/dl]</b>      | 0,215       | <b>0,032</b> |
| <b>NDI – Kreatinin [mg/dl]</b>               | 0,222       | <b>0,027</b> |
| <b>NDI – Albumin [g/l]</b>                   | 0,209       | <b>0,038</b> |
| <b>NDCI – Kreatinin [mg/dl]</b>              | 0,212       | <b>0,035</b> |
| <b>NDCI – Albumin [g/l]</b>                  | 0,205       | <b>0,042</b> |

**Tabelle 7:** Signifikante Korrelationen des Micronucleus Assay mit weiteren erhobenen Parametern

Alle signifikanten Ergebnisse sind in Tabelle 7 aufgelistet. Diese Zusammenhänge zeigten sich bei einfacher Gegenüberstellung der verschiedenen Parameter

In einer linearen Regressions-Analyse, in die auch die Konzentration des UCB inkludiert wurde, zeigte sich jedoch, dass sobald der Einfluss von Alter und Geschlecht (bzw. nur Geschlecht bei den Nekrosen) korrigiert wurden, die Einflüsse dieser Parameter nicht mehr bestanden. Auch die Korrelation von UCB und Nekrose-Häufigkeit beziehungsweise Häufigkeit von NBUDs verschwand.

## 5. DISKUSSION

Das Ziel dieser Studie war herauszufinden, ob hohes Serumbilirubin die Häufigkeit von MNi, NPBs und NBUDs erniedrigt und eventuell auch Einfluss auf Nekrosen, Apoptosen, NDI und NDCI hat. Es konnte hier jedoch kein Einfluss auf Einzelparameter des Micronucleus Assay gezeigt werden. Eine relativ schwache, unerwartet positive Korrelation mit der Häufigkeit von NBUDs verschwindet in der linearen Regressions-Analyse. Da es derzeit noch keine anderen Studien gibt, die erhöhtes und normales Bilirubin im Zusammenhang mit dem Micronucleus Assay untersucht haben, können die Daten nicht verglichen werden. Hier ist es auf jeden Fall erforderlich weitere Studien durchzuführen mit höherer Teilnehmerzahl und optimalerweise älteren Personen, um einen möglichen Einfluss von Bilirubin auf die Bildung von Mikrokernen aufzeigen zu können, da diese mit dem Lebensalter ansteigen. Bei dem Vergleich unterschiedlicher Ausprägungen des Genotyps, die mit unterschiedlich hohen Blut-Bilirubinspiegeln assoziiert sind, zeigen sich keine Unterschiede der MNi-Häufigkeit [GRANT et al., 2004].

Die höhere Häufigkeit von MNi mit zunehmendem Alter und bei Frauen bestätigt Ergebnisse aus anderen Studien [WOJDA et al., 2007; BONASSI et al., 2001; PEACE und SUCCOP, 1999].

Zudem kann in der vorliegenden Studie ein negativer Zusammenhang von Alter mit NDI und NDCI gezeigt werden. Diese Indices sinken mit dem Alter und sind niedriger bei den Frauen. Nekrosen zeigen sich hier auch vom Geschlecht beeinflusst, sie sind häufiger bei Männern. Das erklärt durch die Berechnungsformel des NDCI wiederum den höheren Wert dieses Index bei den Männern. In der Literatur wird heutzutage nur sehr wenig auf Veränderungen bei NDI, NDCI, Nekrose- und Apoptosehäufigkeit aufgrund verschiedener Einflussfaktoren eingegangen, was Vergleiche unmöglich macht. Alter und Geschlecht sind die einzigen Einflussfaktoren auf bestimmte Einzelparameter des Micronucleus Assay, die in der linearen

Regressionsanalyse weiterbestehen. Alle anderen Faktoren zeigen nach Ausschluss dieser beiden Parameter keinen Einfluss mehr.

Dies zeigt, dass die Bedeutung von Alter und Geschlecht in diesem Assay groß ist und in jeder derartigen Analyse unbedingt mitberücksichtigt werden muss.

Eine erhöhte MNi-Frequenz im Alter ist multifaktoriell begründbar. Einerseits kommt es mit zunehmendem Alter zu kumulativen Effekten von entstandenen Genmutationen in Genabschnitten, die für die Reparatur, Chromosomentrennung und die Kontrolle des Zellzyklus wichtig sind. Andererseits wirken Faktoren wie ungesunde Ernährung, ungesunder Lebensstil und die Belastung durch Genotoxine mit dem Alter längerfristig auf den Organismus ein, was zunehmend zu Chromosomenanomalien führt [FENECH und BONASSI, 2011].

Das weibliche X-Chromosom weist eine höhere Neigung auf, im Zuge der Mitose „verloren“ zu gehen und einen MNi zu bilden als andere Chromosomen. Daher können bei Frauen bis zu 72% der vorhandenen MNi x-chromosomalen Ursprungs sein. Die meisten Chromosomenverluste sind auf dieses Chromosom zurückzuführen. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es verständlich, dass Frauen generell höhere MNi-Frequenzen aufweisen [FENECH und BONASSI, 2011; FENECH et al., 2011], was jedoch nicht bedeutet, dass Frauen generell ein höheres Risiko haben an Krebs zu erkranken.

Die Bestätigung des Einflusses von Alter und Geschlecht auf die Bildung von Mikrokernen zeigt, dass die erhobenen Daten qualitativ hochwertig und reproduzierbar sind.

Dass der Alterseffekt auf NDI und NDCI bei den Frauen nicht signifikant ist, liegt vermutlich daran, dass der Frauenanteil der vorliegenden Studie geringer ist. Das ist durch die Prävalenz des Gilbert Syndroms begründbar, bei dem 12,4 % der Männer aber nur 4,8 % der Frauen betroffen sind (siehe Seite 7).

Betrachtet man nun den Einfluss von Bilirubin innerhalb bestimmter Altersgruppen ergibt sich eine Tendenz, dass ein erhöhter Bilirubinspiegel ab einem Alter von 27 mit einer niedrigeren Anzahl an Mikrokernen einhergeht. Diese Beobachtung konnte auf keinem signifikanten Niveau gezeigt werden und

bestand auch nur in der Gruppe der 27–34-jährigen. Darum wäre es interessant hier weitere Daten zu erheben, um eine Abklärung mit einer höheren Probandenzahl in diesem Alter zu erhalten. Das würde erklären warum in dieser Studie kein signifikanter Unterschied zwischen GS- und Kontrollgruppe auftritt, da der Großteil der Studienteilnehmer unter 30 Jahre alt ist und insbesondere in den höheren Altersgruppen (>40) weniger Probanden sind. Nachdem Mikrokerne mit dem Alter zunehmen [WOJDA et al., 2007; BONASSI et al., 2001; PEACE und SUCCOP, 1999] könnten sich erhöhte Bilirubinspiegel mit steigendem Alter deutlicher auswirken, da in jüngeren Personen die MNi-Häufigkeit generell geringer ist.

NBUDs scheinen mit steigendem Bilirubinspiegel anzusteigen. Nachdem auch dies eine Form von DNA-Schaden ist, wurde eigentlich ein gegenteiliger Effekt erwartet. Die Hypothese der vorliegenden Studie kann somit nicht bestätigt werden. Bei älteren Personen wirkt sich erhöhtes Bilirubin deutlicher auf die NBUD-Häufigkeit aus, wobei innerhalb dieser Gruppen kein signifikanter Unterschied von Kontrolle und GS beschrieben werden kann.

Eine Erklärung für diesen bilirubinbedingten Anstieg von NBUDs zu finden ist schwierig, da es bisher zu wenige Untersuchungen von Auswirkungen erhöhten Serumbilirubins durch den Micronucleus Assay gibt. Eine mögliche Ursache könnten die prooxidativen Eigenschaften des Bilirubin sein, die bei Rao et al., 2006 beschrieben werden (siehe Seite 11 und 12). Jedoch wurden diese Beobachtungen lediglich in vitro gemacht, was den Vergleich mit einer Humanstudie unmöglich macht. Darüber hinaus würde man in diesem Fall, auch wenn NBUDs, MNi und NPBs in unterschiedlichem Ausmaß durch einen Einflussfaktor beeinflusst sein können [DUAN et al., 2009; BENASSI et al., 2007], ebenfalls eine Erhöhung der MNi und NPBs erwarten, was hier nicht zutrifft.

Zur Interpretation von diesem Ergebnis ist es erforderlich mehr Untersuchungen mit erhöhtem Bilirubin und dem Micronucleus Assay durchzuführen und die Ergebnisse miteinander zu vergleichen.

Innerhalb dieser Studie wurde ebenfalls der Status von Vitamin B<sub>12</sub> und Folsäure bestimmt, da diese ebenfalls Einfluss auf die Mikrokernbildung haben [TEO und FENECH, 2008; MILIC et al., 2010; MINOZZO et al., 2010]. Jedoch sind diese Daten innerhalb dieser Arbeit nicht ausgewertet, da dies den Rahmen dieser Arbeit übersteigen würde. In anderen Arbeiten, die im Rahmen dieser Studie entstehen wird dieser Aspekt ausgewertet und interpretiert werden.

## 6. SCHLUSSBETRACHTUNG

Da erhöhtes Bilirubin in vielen vor allem beobachtenden Untersuchungen als protektiv vor Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen gesehen wird, liegt die Vermutung nahe, dass Bilirubin als endogenes Antioxidans im Organismus oxidativem Stress, der ursächlich an deren Pathogenese beteiligt ist, entgegenwirkt. Da besonders das Erbgut oxidativer Schädigung gegenüber empfindlich ist, ist eine Betrachtung der Auswirkungen des erhöhten Bilirubin auf DNA-Ebene erforderlich, um die genauen Wirkmechanismen zu erforschen. Der Micronucleus Assay erfasst hierzu effektiv verschiedene Arten der Schädigung. Die ermittelten Werte wurden hier hinsichtlich des Einflusses der Serumkonzentration des Bilirubin ausgewertet.

Die Haupthypothese dieser Studie, dass erhöhtes Serumbilirubin mit einer niedrigeren Häufigkeit an MNi sowie NPBs und NBUDs einhergeht, konnte nicht bestätigt werden. Jedoch konnte eindeutig gezeigt werden, dass die MNi-Frequenz mit dem Alter zunimmt und generell bei Frauen höher ist. Diese Beobachtung lässt sich durch den Mechanismus der Entstehung von MNi erklären und bestätigt Ergebnisse anderer Studien.

Des Weiteren ist eine Tendenz zu niedrigerer MNi-Häufigkeit bei Personen mit erhöhtem Serumbilirubin innerhalb der älteren Studienteilnehmer zu erkennen. Aufgrund der eher jungen Studienpopulation, konnte sich dieser Trend nicht auf signifikantem Niveau zeigen. Mit einer älteren Studienpopulation ist es auf Basis der vorliegenden Daten wahrscheinlicher die Haupthypothese dieser Studie zu beweisen.

## 7. ZUSAMMENFASSUNG

Das endogene Antioxidans Bilirubin ist ein Blutabbauprodukt. Es zirkuliert im Blut und wird in die Leber aufgenommen, dort mit Glukuronsäure konjugiert und über die Galle ausgeschieden. Es gibt verschiedene Ursachen für eine erhöhte Konzentration von Bilirubin im Blut. Eine weit verbreitete Form der milden Hyperbilirubinämie, die keiner Therapie bedarf, ist das Gilbert Syndrom (GS) (Plasmabilirubinkonzentration  $> 17,1 \mu\text{mol/l}$ ). In vielen Studien wurde gezeigt, dass Bilirubin antioxidativ und antimutagen wirkt. Erhöhtes Bilirubin steht zudem epidemiologisch im Zusammenhang mit einer verminderten Inzidenz für Krebs- und Kardiovaskuläre Erkrankungen. Um die genauen Wirkmechanismen des Bilirubin zu erforschen wird in dieser Arbeit erstmals der Effekt eines erhöhten Bilirubinspiegels auf den Micronucleus Assay verwendet. Diese gut evaluierte Methode misst DNA-Schäden, die sich im Zuge der Zellteilung als Mikrokerne (MNI), nukleoplasmatischen Brücken (NPBs) und nukleäre Buds (NBUDs) zeigen, und untersucht die Zellgesundheit (NDI, NDCI, Apoptose, Nekrose). Die Häufigkeiten dieser Schäden in peripheren Blutlymphozyten werden von Alter, Geschlecht, Alkoholkonsum, Folsäure-, Cobalamin-, Selenstatus, der Belastung durch genotoxische Substanzen und möglicherweise Zigarettenrauch beeinflusst. Eine erhöhte MNI-Frequenz ist stark mit erhöhtem Risiko von Krebserkrankungen assoziiert. Daher eignet sich dieser Assay als Biomarker, um das Krebsrisiko zu beurteilen.

In dieser Studie wurden im Blut von 110 Personen die Konzentration des Gesamtbilirubin, des unkonjugierten Bilirubin, der Micronucleus Assay und weitere Parameter erhoben. Es zeigt sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhtem Serumbilirubin und den Parametern des Micronucleus Assay. Mit zunehmendem Alter kommt es signifikant zur Erhöhung der MNI und Senkung von NDI und NDCI. Innerhalb der älteren Personen (30 bis 70 Jahre bzw. 27 bis 34 Jahre) zeigt sich ein nicht signifikanter Trend zu einer geringeren NBUD- bzw. MNI-Häufigkeit bei Personen mit GS. NDI und NDCI sowie Apoptose- und Nekrosehäufigkeit sind signifikant höher bei Personen mit GS

innerhalb der 24–26-jährigen bzw. der 27–34-jährigen. Nekrosen, NDI, und NDCI sind signifikant höher bei Männern, die MNI-Frequenz ist geringer.

Die Ergebnisse zeigen in der jüngeren Studienpopulation keine protektiven Effekte von Bilirubin. Weitergehende Untersuchungen mit älteren Personen sind empfehlenswert, da grundsätzlich DNA-Schäden mit dem Alter zunehmen und hierher möglicherweise Bilirubin einen größeren Einfluss zeigen könnte.

## 8. SUMMARY

The endogenous antioxidant bilirubin is a degradation product of blood. It circulates in the blood and is gathered in the liver, where it is conjugated to glucuronic acid and then excreted via the bile. There is various cause for a mild elevation of bilirubin concentration in the blood. A common form of mild hyperbilirubinaemia is the Gilbert's syndrome (GS) (plasma concentration of bilirubin  $> 17,1 \mu\text{mol/l}$ ). In many studies bilirubin was shown antioxidative and antimutagenic. Furthermore elevated bilirubin is epidemiological associated with a lower incidence for cancer or cardiovascular diseases. In order to investigate the mechanisms behind the function of bilirubin, the impact of elevated blood-bilirubin on the Micronucleus Assay was tested for the first time. This well published method measures DNA-damages which appear while mitosis as micronuclei (MNI), nucleoplasmic bridges (NPBs) and nuclear buds (NBUDs) and it investigates the cell function (NDI, NDCI, apoptosis, necrosis). The frequencies of DNA damage in peripheral blood lymphocytes are influenced by age, gender, alcohol consumption, status in folic acid, cobalamine, selenium, exposure to genotoxic agents and probably cigarette smoke. A higher frequency in MNI is strongly associated with a higher cancer risk.

In this study blood of 110 individuals was taken and measured for total and unconjugated bilirubin, the Micronucleus Assay and other parameters. There is no significant link between elevated serum bilirubin and the parameters of the Micronucleus Assay. With age there is a significant increase in MNI and decreasing in NDI and NDCI. Within the older group (30 to 70 years; 27 to 34 years) there is a not significant trend towards a lower NBUD- and MNI-frequency in individuals with GS. NDI and NDCI as well as the frequency of apoptosis and necrosis are significantly higher within the people aged 24–26 respectively 27–34. Necrosis, NDI, NDCI are significantly higher in men, MNI-frequency is lower. The results show no protective effects on DNA in a younger group. Further investigations are needed, properly with elderly since DNA-damage is increasing with age and in this group bilirubin might be more powerful.

## 9. REFERENZEN

BESTE K. Bilirubin, ein potentielles Antioxidans. Institut für Ernährungswissenschaften. Wien. 2003.

BENASSI B., LELEU R., BIRD T., CLIFTON P., FENECH M. Cytogenesis-block micronucleus cytome assay for the determination of gentoxicity and cytotoxicity of cecal water in rats and fecal water in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16(12): 2676-2680.

BONASSI S., ZNAOR A., CEPPI M., LANDO C., CHANG W.P., HOLLAND N., KIRSCH-VOLDERS M., ZEIGER E., BAN S., BARALE R., BIGATTI M.P., BOLOGNESI C., CEBULSKA-WASILEWSKA A., FABIANOVA E., FUCIC A., HAGMAR L., JOKSIC G., MARTELLI A., MIGLIORE L., MIRKOVA E., SCARFI M.R., ZIJNO A., NORPPA H., FENECH M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2007; 28(3): 625-631.

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

BONASSI S., FENECH M., LANDO C., LIN Y.P., CEPPI M., CHANG W.P., HOLLAND N., KIRSCH-VOLDERS M., ZEIGER E., BAN S., BARALE R., BIGATTI M.P., BOLOGNESI C., JIA C., DI GIORGIO M., FERGUSON L.R.,<sup>13</sup> ALEKSANDRA FUCIC A.,<sup>14</sup> OMAR GARCIA LIMA O.G., HRELIA P., KRISHNAJA A.P.,<sup>17</sup> LEE T.K., MIGLIORE L., MIKHALEVICH L., MIRKOVA E., MOSESSO P., MÜLLER W.U., ODAGIRI Y., SCARFÒ M.R.`, SZABOVA E.,<sup>25</sup> VOROBTSOVA I., VRAL A., ZIJNO A. HUMAN MicroNucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria, and Host Factors on the Frequency of Micronuclei. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2001, 37; 31-45.

BROUARD S., OTTERBEIN L.E., ANRATHER J., TOBIASCH E., BACH F.H., CHOI A.M.K., SOARES M. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. 2000; *J Exp Med*: 192 (7): 1015-1025.

BULMER A.C., BLANCHFIELD J.T., TOTH I., FASSETT R.G., COOMBES J.S. Improved resistance to serum oxidation in Gilbert's syndrome: A mechanism for cardiovascular protection. *Atherosclerosis*. 2008; 199(2): 390-396.

DUAN H., LENG S., PAN Z., DAI Y., NIU Y., HUANG C., BIN P., WANG Y., LIU Q., CHEN W., ZHENG Y. Biomarkers measured by cytokinesis-block micronucleus cytome assay for evaluating genetic damages induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research*. 2009; 677: 93-99.

EHRlich V.A., NERSESYAN A.K., HOELZL C., FERK F., BICHLER J., VALIC E., SCHAFFER A., SCHULTE-HERMANN R., FENECH M., WAGNER K.H., KNASMÜLLER S. Inhalative exposure to vanadium pentoxide causes DNA damage in workers: results of a multiple end point study. *Environmental Health Perspectives*. 2008; 116(12): 1689-1693.

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

EL-ZEIN R., SCHABATH M.B., ETZEL C.J., LOPEZ M.S., FRANKLIN J.D., SPITZ M.R. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay as a novel biomarker for lung cancer risk. *Cancer Research.* 2006; 66(12): 6449-6456.

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

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

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

FENECH M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research.* 2006; 600:58-66.

FENECH M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research.* 2000; 455: 81-95.

GRANT D. J., HALL I. J., EASTMOND D. A., JONES I. M. BELL D. A. Bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1) gene promoter polymorphisms and HPRT, glycophorin A, and micronuclei mutant frequencies in human blood. *Mutation Research*. 2004; 560: 1-10.

HULEA S. A., WASOWICZ E., KUMMEROW F. A. Inhibition of metal-catalyzed oxidation of low-density lipoprotein by free and albumin-bound bilirubin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1995; 1259: 29-38.

IARMARCOVAI G., BONASSI S., BOTTA A., BAAN A., ORSIÈRE T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutation Research*. 2008; 658(3): 215-233.

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

IOANNOU G.N., LIOU I.W., WEISS N.S. Serum bilirubin and colorectal cancer risk: a population-based cohort study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2006; 23(11):1637-1642.

IYANAGI T., EMI Y., IKUSHIRO S. Biochemical and molecular aspects of genetic disorders of bilirubin metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1998, 1407: 173-184.

KOOLMAN J., RÖHM K.H. Stoffwechsel, In: Taschenatlas Biochemie 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2002; 194-195, 256.

KRAEMER D, SCHEURLLEN M., Morbus Gilbert und Crigler-Najjar-Syndrom Typ I und II beruhen auf Mutationen im selben Genlocus UGT1A1. *Medizinische Klinik*. 2002; 97(9): 528-532.

LIN J.P., O'DONNELL C.J., SCHWAIGER J.P., CUPPLES L.A., LINGENHEL A., HUNT S.C., YANG S., KRONENBERG F. Association between UGT1A1\*28 allele, bilirubin levels, and coronary heart disease in the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2006; 114(14): 1476-1481.

LÖFFLER G. Das Blut, In: *Basiswissen Biochemie* 6. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2004; 544-549.

LÖFFLER G., PETRIDES P.E., HEINRICH P.C. Häm und Gallenfarbstoffe, In: *Biochemie & Pathobiochemie* 8. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2007; 454-455, 621-626, 956.

MAGHZAL J. G., LECK M. C., COLLINSON E., LI C., STOCKER R. Limited role for the bilirubin-biliverdin redox amplification cycle in the cellular Antioxidans protection by biliverdin reductase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284: 29251-29259.

MATEUCA R. LOMBAERT N., AKA P.V., DECORDER I., KIRSCH-VOLDERS M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie*. 2006; 88: 1515-1531.

MCDONAGH A. F. Turning green to gold. *Nature structural biology*. 2001, 8(3): 198-200.

MCDONAGH A. F. The biliverdin-bilirubin Antioxidans cycle of cellular protection: Missing a wheel? *Free Radical Biology & Medicine*. 2010; 49: 814-820.

MILIC M., ROZGAJ R., KASUBA V., ORESCANIN V., BALIJA M., JUKIC I. Correlation between folate and vitamine B<sub>12</sub> and markers of DNA stability in healthy men: preliminary results. *ActaBP*. 2010; 57(3): 339-345.

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

MINETTI M., MALLOZZI C., DISTASI A. M. M., PIETRAFORTE D. Bilirubin is an effective Antioxidans of peroxyxynitrite-mediated oxidation in human blood plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1998; 352(2): 165-174.

MINOZZO R., DEIMLING L.I., SANTOS-MELLO R. Cytokines-block micronucleus cytome and comet assays in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead considering folate and vitamin B<sub>12</sub> status. *Mutation Research.* 2010; 697: 24–32.

MURGIA E., BALLARDIN M., BONASSI S., ROSSI A.M., BARALE R. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. 2008. 639: 27-34.

NEUZIL J., STOCKER R. Free and Albumin-bound Bilirubin are efficient co-antioxidants for  $\alpha$ -tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry.* 1994; 269(24): 16712-16719.

NOVOTNY L., VITEK L. Inverse relation between serum bilirubin and atherosclerosis in men: A meta-analysis of published studies. *Experimental Biology and Medicine.* 2003; 228: 568-571.

OTTERBEIN L.E., ZUCKERBRAUN B.S., HAGA M., LIU F., SONG R., USHEVA A., STACHULAK C., BODYAK N., NEAL SMITH R., CSIZMADIA E., TYAGI S., AKAMATSU Y., FLAVELL R.J., BILLIAR T.R., TZENG E., BACH F.H., CHOI A.M.K., SOARES M.P. Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nature Medicine.* 2003; 9: 183-190.

OWENS D., SHERLOCK S. Diagnosis of Gilbert`s Syndrome: Role of Reduced Caloric Intake Test. *British Medical Journal*, 1973; 3: 559-563.

PEACE B.E., SUCCOP P. Spontaneous micronucleus frequency and age: what are normal values? *Mutation Research*. 1999; 425: 225-230.

RADU P., ATSMON J. Gilbert`s Syndrome – Clinical and pharmacological implications. *IMAJ*. 2001; 3: 593-598.

RAO P., SUZUKI R., MIZOBUCHI S., YAMAGUCHI T., SASAGURI S. Bilirubin exhibits a novel anti-cancer effect on human adenocarcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 2006; 342: 1279-1283.

RIED K. Possible antimutagenic and antioxidative effects of bile pigments in the Ames Salmonella assay. *Institut für Ernährungswissenschaften*. Wien. 2006.

RYTER S. W., TYRRELL R. M. The heme synthesis and degradation pathways: Role in oxidation sensitivity. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000; 28(2): 289-309.

SCHWERTNER H.A., VITEK L. Gilbert syndrome, UGT1A1\*28 allele, and cardiovascular disease risk: Possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. *Atherosclerosis*. 2008; 198(1): 1-11.

SILBERNAGL S., DESPOPOULOS A. Verdauung, In: *Taschenatlas der Physiologie* 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003; 250-251.

STOCKER R. Antioxidans Activities of Bile Pigments. *Antioxidans & Redox Signaling*. 2004; 6(5): 842-849.

STRASSBURG C.P. Hyperbilirubinaemia syndromes (Gilbert-Meulengracht, Crigler-Najjar, Dubin-Johnson, and Rotor syndrome). *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2010; 24: 555-571.

TAPAN S., KARADURMUS N., DOGRU T., ERCIN M.K., TASCI I., BILGI C., KURT I., ERBIL M.K. Decreased small dense LDL level in Gilbert`s Syndrome. *Clinical Biochemistry*. 2011; doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.12.003.

TEMME E.H., ZHANG J., SCHOUTEN E.G., KESTELOOT H. Serum bilirubin and 10-year mortality risk in Belgian population. *Cancer Causes Control*. 2001; 12(10): 887-894.

TEO T., FENECH M. The interactive effect of alcohol and folic acid on genome stability in human WIL2-NS cells measured using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Mutation Research*. 2008; 657: 32-38.

VAN HOYDONCK P.G., TEMME E.H., SCHOUTEN E.G. Serum bilirubin concentration in a Belgian population: the association with smoking status and type of cigarettes. *International Journal of Epidemiology*. 2001; 30(6): 1465-1472.

VITEK L., OSTROW D. Bilirubin chemistry and metabolism; Harmful and protective aspects. *Current Pharmaceutical Design*. 2009; 15: 2869-2883.

VITEK L., SCHWERTNER H.A. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Advances in Clinical Chemistry*. 2007; 43: 1-57.

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

WU J., Lyons G.H., GRAHAM R.D., FENECH M. The effect of selenium, as selenomethionine, on genome stability and cytotoxicity in human lymphocytes measured using the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*. 2009; 24(3): 225-232.

WU J., SALISBURY C., GRAHAM R., LYONS G., FENECH M., Increased consumption of wheat biofortified with selenium does not modify biomarkers of cancer risk, oxidative stress, or immune function in healthy Australian males. Environmental and Molecular Mutagenesis. 2009; 50(6): 489-501.

ZUCKER S.D., HORN P.S., SHERMAN K.E Serum bilirubin levels in the U.S. population: gender effect and inverse correlation with colorectal cancer. Hepatology. 2004; 40(4): 827-835.

<http://de.wikipedia.org/wiki/Bilirubin> vom 26. 11. 2010

# Curriculum Vitae

## PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Maria Theresia Gräfin zu Pappenheim  
Geburtsdatum: 15/09/1982  
Familienstand: ledig

## AUSBILDUNG

---

10/2003 – 04/2011: Studium Ernährungswissenschaften, Universität Wien  
09/1998 – 03/2003: Damenschneiderlehre, Heimschule Kloster Wald,  
Sigmaringen  
Abschluss: Gesellenbrief

## SCHULISCHE AUSBILDUNG

---

2000 – 2002: Heimschule Kloster Wald, Sigmaringen, D  
Abschluss: Abitur  
1999 – 2000: Queen`s College, Taunton, UK  
1998 – 1999: Heimschule Kloster Wald, Sigmaringen, D  
1995 – 1998: Theresia-Gerhardinger-Gymnasium am Anger,  
München, D  
1993 – 1995: Theodolinden-Gymnasium, München, D  
1989 – 1993: Martin-Kneidl-Grundschule, München, D

## BERUFSERFAHRUNGEN UND PRAKTIKA

---

07/2009 – 09/2009: Praktikum bei Dr. August Oetker Nahrungsmittel KG,  
Ettlingen  
05/2009: Projektarbeit bei Jugend am Werk, Wien  
07/2007 – 09/2007: Praktikum bei Hipp GmbH & Co. Export KG, Gmunden  
09/2006: Praktikum im Krankenhaus für Naturheilweisen,  
München  
02/2006 -03/2006: Werkstätigkeit beim österr. Bundesministerium für  
Gesundheit und Frauen, Wien