



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Der Einfluss erhöhten Bilirubins auf den humanen
enzymatischen Antioxidantienstatus“

Verfasserin

Alexandra Kauril

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, Februar 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Ernährungswissenschaften

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

Danksagung:

Ein herzliches Dankeschön richte ich an meine Betreuerin Mag. Marlies Wallner, die mir durch Ihr fachliches Wissen und Ihre Hilfsbereitschaft stets weitergeholfen hat.

Mein Dank geht ebenso an Dr. Mag. Ao. Univ.-Prof. Karl Heinz Wagner für die freundliche und geduldige Betreuung.

Für die schnelle Beantwortung meiner Fragen möchte ich mich auch herzlichst bei Mag. Elisabeth Müllner bedanken.

Des Weiteren geht mein Dank an Mag. Dr. Elisabeth Fabian, die so freundlich war mir mit fachspezifischen Unterlagen zu helfen.

Ein großes Dankeschön geht an meine Kolleginnen Nadja Antl, Admira Plavotic, Manuela Wimmer, Theresia Fastian und Anita Ertl die mir stets weitergeholfen haben.

Bedanken möchte ich mich vor allem bei meiner Familie, die mich während meiner gesamten Studienzeit unterstützt hat.

Ebenso danke ich mich meinen Freundinnen Marie, Nicole und Bettina, die immer für mich da waren.

Zu guter letzt möchte ich mich bei meinem Freund Andreas bedanken, der mir in den letzten zwei Jahren die Kraft für Vollendung meines Studiums gegeben hat.

Inhaltsverzeichnis:

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung und Fragestellung	1
2. Literaturübersicht	2
2.1. Oxidativer Stress	2
2.1.1. Freie Radikale	3
2.1.2. Antioxidative Schutzmechanismen	5
2.2. nicht enzymatische Antioxidantien	6
2.2.1. Glutathion (GSH)	6
2.2.2. Vitamin C (Ascorbinsäure)	7
2.2.3. Vitamin E (Tocopherol)	8
2.2.4. β -Carotin	9
2.2.5. Ubichinon	10
2.3. Enzymatische Antioxidantien	10
2.3.1. Superoxiddismutase (SOD)	10
2.3.2. Glutathion-Peroxidase (GSH-Px)	11
2.3.3. Katalase (KAT)	14
2.3.4. Interaktion der drei Enzyme	15
2.4. Bilirubin	15
2.4.1. Bilirubinabbau im Darm	17
2.4.2. Hyperbilirubinämien	17
2.4.3. Erworbene Hyperbilirubinämien	18
I. Hämolytischer (prähepatischer) Ikterus	18

II. Physiologischer Neugeborenenikterus	18
III. Pathologischer Neugeborenenikterus	19
IV. Hepatozellulärer (intrahepatischer) Ikterus	20
V. Verschlussikterus (posthepatischer Ikterus).....	20
2.4.4. Angeborene Hyperbilirubinämie	20
I. Rotor-Syndrom.....	20
II. Dubin-Johnson-Syndrom	21
III. Morbus Meulengracht (Gilbert-Syndrom).....	21
IV. Crigler-Najjar-Syndrom	22
2.4.5. Wirkung der Hyperbilirubinämie	23
2.4.5.1. Bilirubin als Antioxidants.....	24
2.4.5.2. Chemopräventive Eigenschaften von Bilirubin	25
2.4.5.3. Bilirubin und kardiovaskuläre Erkrankungen	26
3. Material und Methoden	28
3.1. Studiendesign	28
3.2. Probanden.....	29
3.3. Blutaufbereitung	30
3.3.1. Herstellung des isotonischen Phosphatpuffers	31
3.4. Bestimmung der enzymatischen Antioxidantien	32
3.4.1. Bestimmung der Glutathionperoxidase im Blut	32
3.4.1.1. Prinzip	32
3.4.1.2. Materialien und Geräte.....	32
3.4.1.3. Durchführung	34
3.4.1.4. Auswertung	35
3.4.1.5. Überprüfung der Analysengenauigkeit	35

3.4.2. Bestimmung der Superoxiddismutase in Erythrozyten	36
3.4.2.1. Prinzip	36
3.4.2.2. Material und Geräte	37
3.4.2.3. Durchführung	38
3.4.2.4. Auswertung	39
3.4.2.5. Überprüfung der Analysengenauigkeit	40
3.4.3. Bestimmung der Katalase in Erythrozyten	40
3.4.3.1. Prinzip	40
3.4.3.1. Material und Geräte	40
3.4.3.2. Ablauf	41
3.4.3.3. Auswertung	42
3.4.3.4. Überprüfung der Analysengenauigkeit	42
3.5. Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration	43
3.5.1. Materialien und Geräte	43
3.5.2. Durchführung	44
3.5.3. Auswertung	44
3.5.4. Überprüfung der Analysengenauigkeit	44
3.6. Statistische Auswertung	44
4. Ergebnisse	45
4.1. Studiencharakteristik	46
4.2. Unterschiede zwischen GS und Kontrolle	47
4.3. Einfluss von Alter und Geschlecht	48
4.4. Enzymaktivitäten bei den verschiedenen Bilirubin Tertilen	50
4.5. Unterschiede GS/K <30 mit GS/K ≥30	50
4.6. Korrelationen	54

4.6.1. Korrelationen mit der Glutathion-Peroxidase.....	54
4.6.1.1. GSH-Px und UCB	54
4.6.1.2. GSH-Px und Triglyzeride	54
4.6.1.3. GSH-Px und Cholesterin/HDL-C und HDL-C	56
4.6.1.4. GSH-Px und ox LDL/LDL-C	57
4.6.1.5. GSH-Px und Apolipoprotein A1	58
4.6.2. Korrelationen mit der Katalase	59
4.6.2.1. Katalase und UCB.....	59
4.6.2.2. Katalase mit Albumin und Eisen.....	59
4.6.2.3. Katalase und Folsäure	63
4.6.3. Korrelationen mit der Superoxiddismutase.....	65
4.6.3.1. SOD und UCB.....	65
4.6.3.2. SOD und Ratio ox LDL/LDL-C	65
4.6.3.3. SOD und Lipoprotein (a)	67
4.6.3.4. SOD und MPO	69
5. Schlussbetrachtung	71
6. Zusammenfassung	73
7. Summary	75
8. Literaturverzeichnis:.....	78
9. Curriculum Vitae:	89

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gleichgewicht zwischen AO und Oxidantien [ELMADFA und LEITZMANN, 2004].....	2
Abbildung 2: Umwandlung der ROS [APEL und HIRT 2004].....	5
Abbildung 3: Glutathion [LÖFFLER et al, 2006].....	6
Abbildung 4: Ascorbinsäure [ELMADFA 2003]	7
Abbildung 5: Vitamin E [BELITZ et al., 2007].....	8
Abbildung 6: β -Carotin [ELMADFA und LEITZMANN, 2004]	9
Abbildung 7: Bilirubin(b) und Biliverdin (a) [ASAD et al., 2001].....	15
Abbildung 8: Korrelation der GSH-Px von Triglyzeriden (gesamte Studienpopulation) ($r=-0,299^{**}$, $p=0,003$)	55
Abbildung 9: Korrelation der Katalase mit Eisen bei Männern ($r=-0,111$, $p=0,364$) und Frauen ($r=-0,431^{*}$, $p=0,017$).	61
Abbildung 10: Korrelation der Katalase mit Folsäure (Erys) bei Männern ($r=-0,240$, $p=0,052$) und Frauen ($r=-0,444^{*}$, $p=0,018$)	63
Abbildung 11: Korrelation von SOD mit ox LDL/LDL-C ($r=-0,324^{**}$, $p=0,001$) ..	66
Abbildung 12: Korrelation von SOD bei den <30 ($r=-0,172$, $p=0,186$) und ≥ 30 ($r=-0,465^{**}$, $p=0,004$) Jährigen	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: endogene und exogene Quellen der Radikalbildung [SIEMS et al. 2005, [ELMADFA und LEITZMANN 2004].....	3
Tabelle 2: Unterschiedliche im Organismus wirksame ROS [APEL und HIRT 2004].....	4
Tabelle 3: Reagenzien für den isotonischen Phosphatpuffer.....	31
Tabelle 4: Reagenzien für die GSH-Px –Bestimmung	32
Tabelle 5: Pipettierschema für die Aktivitätsbestimmung von GSH-Px	34
Tabelle 6: Reagenzien für die SOD - Bestimmung	37
Tabelle 7: Pipettierschema der SOD-Bestimmung, alle Proben + Leewerte (LW) in µl	38
Tabelle 8: Materialien für die Katalase-Bestimmung.....	40
Tabelle 9: Pipettierschema für die Katalasebestimmung	41
Tabelle 10: Reagenzien für die Hämoglobinbestimmung.....	43
Tabelle 11: Studiencharakteristik bei GS und Kontrolle, (MW ± SD)	46
Tabelle 12: Enzymaktivitäten, Alter und UCB bei Frauen und Männern, (MW ± SD).....	47
Tabelle 13: Enzymaktivitäten bei GS und Kontrolle, (MW ± SD).....	47
Tabelle 14: Enzymaktivitätsvergleiche zwischen <30 Jährigen (n=61) und ≥30 Jährigen (n=39) Studienteilnehmern, (MW ± SD)	48

Tabelle 15: Enzymaktivitätsunterschiede zwischen männlichen und weiblichen Studienteilnehmern, (MW $\pm$ SD)	49
Tabelle 16: Enzymaktivitäten von SOD, KAT und GSH-Px, Alter und UCB bei Bilirubin Tertilen, (MW $\pm$ SD).....	50
Tabelle 17: Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von Alter und Bilirubinlevel (MW $\pm$ SD).....	51
Tabelle 18: Posthoc-test der Katalase (KAT)	51
Tabelle 19: Korrelationen der GSH-Px mit Triglyzeriden bei GS, Kontrolle, Alter, Geschlecht, gesamter Studienpopulation (g. SP) * (p<0,05); ** (p <0,01)	54
Tabelle 20: Korrelationen mit GSH-Px des gesamten Studienkollektivs (g. SP), bei GS und Kontrolle, * (p<0,05); ** (p<0,01)	56
Tabelle 21: Korrelationen von KAT mit Albumin und Eisen in allen Gruppen, * (p<0,05); ** (p<0,01)	59
Tabelle 22: Korrelationen der Katalase mit Folsäure (Erythrozyten=Ery) der gesamten Studienpopulation (g. SP) bei den Subgruppen, * (p<0,05); ** (p<0,01)	63
Tabelle 23: Korrelationen von der KAT bei der gesamten Studienpopulation (g. SP), GS und Kontrolle, * (p<0,05); ** (p<0,01).....	64
Tabelle 24: Korrelationen von SOD mit ox LDL/LDL-C, * (p<0,05); ** (p<0,01) bei der gesamten Studienpopulation (g. SP) und den Subgruppen	65
Tabelle 25: Korrelation von SOD mit Lipoprotein (a) bei der gesamten Studienpopulation (g. SP) und den Subgruppen, * (p<0,05); ** (p<0,01)	67

Tabelle 26: Korrelation von SOD mit MPO bei der gesamten Studienpopulation (g. SP) und den Subgruppen, * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$).....	69
--	----

Abkürzungsverzeichnis

SOD: Superoxiddismutase

KAT: Katalase

GSH-Px: Glutathionperoxidase

GS: Gilbert Syndrom

GR: Glutathion-Reduktase

UCB: unkonjugiertes Bilirubin

LDH: Laktatdehydrogenase

MLR: multiple lineare Regression

ATP: Adenosintriphosphat

UDP: Uridindiphosphat

UGT: Uridinediphosphate-glucuronosyltransferase

DNA: Desoxyribonukleinsäure

FFQ: Food Frequency Questionnaire

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

NaCl: Natriumchlorid

ox. LDL: oxidiertes Low density Lipoprotein

HDL: High Density Lipoprotein

Chol: Cholesterin

ROS: reactive oxygen species

TG: Triglyzeride

AO: Antioxidantien

GSH: Glutathion

GSSG: Glutathion disulfide

NADPH: Nicotinadenin

ROOH: organische Peroxide

TBARS: thiobarbituric acid reactive substances

LOOH: Lipidhydroperoxide

LDL: Lipoproteine

MPO: Myeloperoxidase

SD: Standardabweichung

MW: Mittelwert

Abb: Abbildung

n.s: nicht signifikant

SP: Studienpopulation

Na-EDTA: Natrium-Ethylendiamintetraacetat

Tris-HCl: Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid

t-BHP: t-Butylhydroperoxid, 70%

1. Einleitung und Fragestellung

Themenbereich der vorliegenden Diplomarbeit ist der protektive Einfluss erhöhten Bilirubins auf den menschlichen Organismus. Die Arbeit zählt zu dem vom FWF geförderten Forschungsprojekt „Antioxidative and Antigenotoxic Potential of Bile Pigments“ am Department für Ernährungswissenschaften der Universität Wien.

Die Laboranalysen sind zum Teil gemeinsam mit meiner Kollegin Manuela Wimmer entstanden, da sämtliche Proben für die Analysen zwischen uns aufgeteilt worden sind.

Das Tetrapyrrol Bilirubin zählt zu den Gallenfarbstoffen, wird aus Hämoglobin gebildet und über die Galle ausgeschieden. Der Normwert für Gesamtbilirubin im Blut liegt unter 1,2 mg/dl. Erhöhtes Serumbilirubin, über 1,0 mg/dl, wird als Gilbert's Syndrom (GS) bezeichnet. Bei 3-12% der Bevölkerung kommt diese Hyperbilirubinämie vor, wobei Männer häufiger betroffen sind als Frauen. GS wird autosomal-rezessiv vererbt, durch einen Polymorphismus in der Genpromotorregion für Uridin Diphosphat Glucuronosyltransferase (UGT 1A1), die für die Regulation der Bilirubinkonzentration im Körper verantwortlich ist.

Bilirubin ist nicht nur Abbauprodukt, sondern wirkt im Körper vor allem als Antioxidans. Studienresultate bei Probanden mit GS zeigen einen verbesserten Schutz gegen oxidativen Stress und eine geringere Inzidenz für Herz-, Kreislauf- und Krebserkrankungen.

Damit die Wirkweise erhöhten Bilirubins auf das antioxidative Schutzsystem im Körper geklärt werden kann, wurde in der vorliegenden Arbeit der Effekt von erhöhtem Bilirubin auf die drei enzymatischen Antioxidantien, die Glutathionperoxidase, Katalase und Superoxiddismutase untersucht.

Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob erhöhtes Bilirubin Einfluss auf die Aktivität der Enzymsysteme hat.

2. Literaturübersicht

2.1. Oxidativer Stress

Im menschlichen Körper herrscht oxidativer Stress, wenn das Gleichgewicht zwischen Antioxidantien und Oxidantien gestört ist. Meistens wird ein Ungleichgewicht durch einen Mangel an bestimmten Antioxidantien oder/und durch eine erhöhte Bildung von freien Radikalen verursacht.

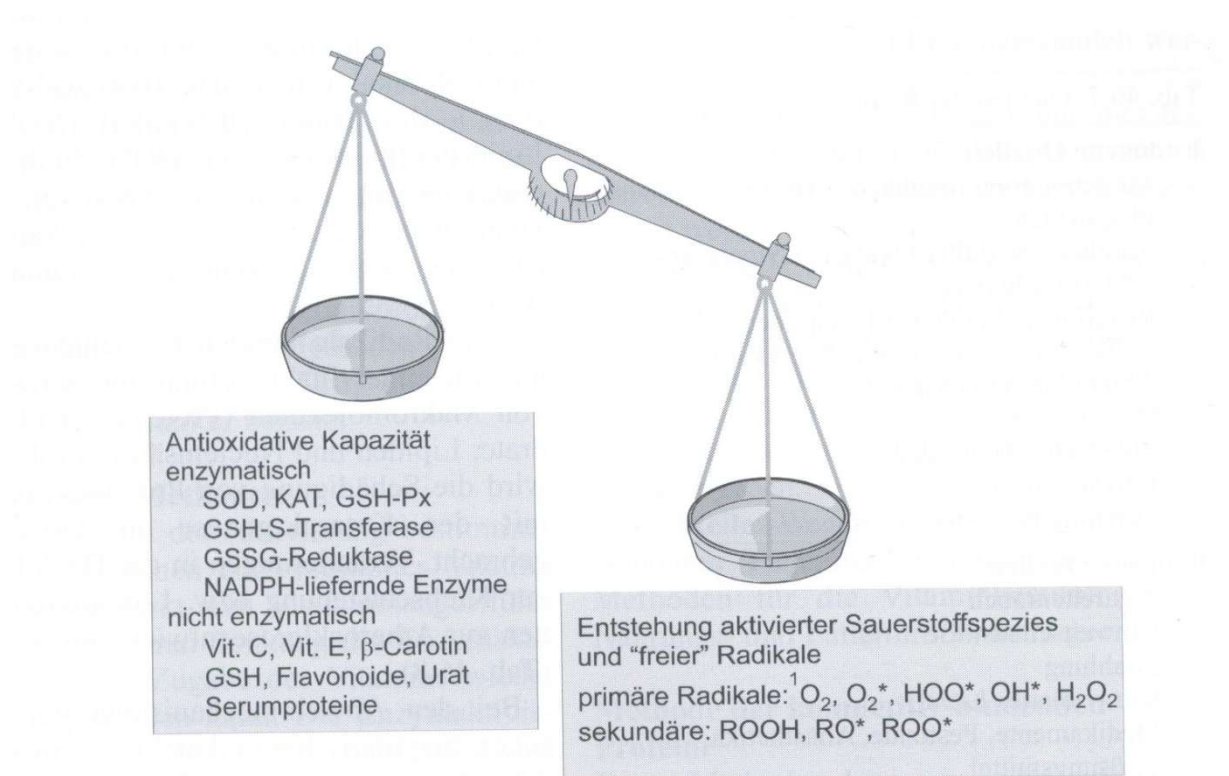


Abbildung 1: Gleichgewicht zwischen AO und Oxidantien [ELMADFA und LEITZMANN, 2004]

2.1.1. Freie Radikale

Unter einem freien Radikal versteht man eine chemische Verbindung, die eine oder mehrere ungepaarte Elektronen enthält. Diese Atome oder Moleküle sind sehr reaktionsfähig, da ihre Orbitale mit nur einem Elektron besetzt sind [LATSCHA und KAZMEIER 2008].

Radikale zählen zu der Gruppe der reaktiven Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species = ROS). Zu diesen zählen auch Verbindungen nicht radikalischer Natur, wie Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff [JACOBI G. et al., 2005].

Radikale entstehen z.B. durch die Ein-Elektronenreduktion von molekularem Sauerstoff zum Superoxid-Radikal O^{σ}_2 . Die ungepaarten Elektronen sind bestrebt einen Elektronenpartner zu finden und entreißen diesen daher einem anderen naheliegenden Molekül [LÖFFLER et al, 2006]. Die Bildung freier Radikale kann exogen oder endogen erfolgen.

Tabelle 1: endogene und exogene Quellen der Radikalbildung [SIEMS et al. 2005, [ELMADFA und LEITZMANN 2004]

Endogene Quellen	Exogene Quellen	
Mitochondriale Atmungskette	Chemisch	Physikalisch
Purinabbau	Nahrungsbestandteile	Ozon
Stoffwechsel der Katecholamine	Umwelttoxine	UV-Strahlung
Detoxifikation über Cytochrom-P-450-System	Medikamente, Anästhetika	ionisierende Strahlung
Phagozyten	Pestizide	Zigarettenrauch
Peroxisomen	Lösungsmittel	
sportliche Betätigung		
Ischämie/Perfusion		

Tabelle 2: Unterschiedliche im Organismus wirksame ROS [APEL und HIRT 2004]

	Formel
Hydroperoxid	ROOH
Peroxyradikal	ROO°
Singulett-sauerstoff	$^1\text{O}_2$
Superoxidanion	$\text{O}_2^{\cdot -}$
Perhydroxylradikal	$\text{HO}_2^\cdot$
Wasserstoffperoxid	H_2O_2
Hydroxylradikal	$\text{OH}^\cdot$
Alkoxyradikal	$\text{RO}^\cdot$

Freie Radikale können Zellen und das Gewebe schädigen. Dieser Vorgang kann verhindert bzw. verlangsamt werden, da in allen aeroben Lebewesen ein System antioxidativer Schutzmechanismen vorhanden ist (siehe Kapitel 2.2.) [SIEMS et al., 2005].

Molekularer Sauerstoff ist im menschlichen Organismus in verschiedenen Zwischenformen vertreten. Dieser kann durch Energietransfer oder durch Elektronentransferreaktionen in reaktive Sauerstoffspezies umgewandelt werden. Die erste Reaktion führt zur Bildung von Singulett-sauerstoff. Aus diesem erfolgt durch Reduktion die Bildung von Superoxid, Hydrogenperoxid und Hydroxylradikal.

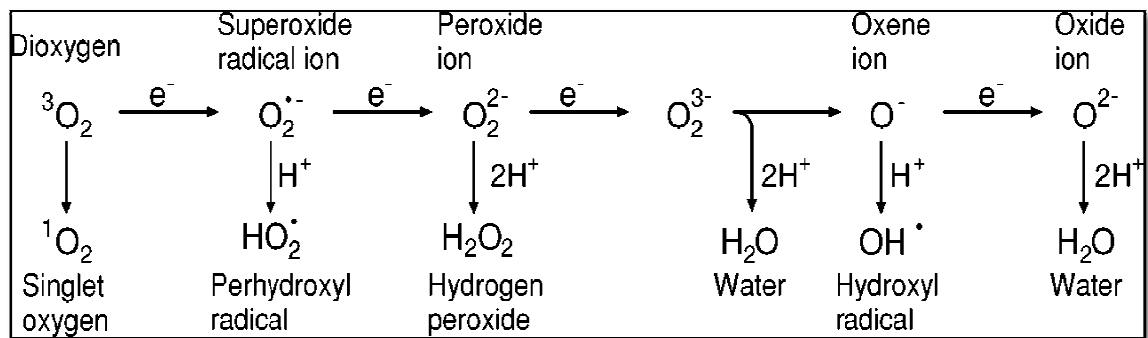


Abbildung 2: Umwandlung der ROS [APEL und HIRT 2004]

2.1.2. Antioxidative Schutzmechanismen

Um das Gleichgewicht zwischen Antioxidantien und Oxidantien zu gewährleisten gibt es im menschlichen Körper eine Reihe von antioxidativen Schutzmechanismen. Diese werden in primäre und sekundäre antioxidative Schutzsysteme eingeteilt. Zur ersten Gruppe gehören die in der Zelle vorhandenen Enzyme und niedermolekularen Antioxidantien. Die Antioxidantien werden nach ihrer Löslichkeit entsprechend in lipophile, wie Vitamin E, Coenzym Q10 und Carotinoide sowie in hydrophile wie Vitamin C eingeteilt. Zum sekundären antioxidativen Schutzsystem zählen z.B. die Proteinreparatur, -abbau, die Membranreparatur, der Lipidabbau und die Reparatur von DNA – Schäden [SIEMS et al.2005].

Im menschlichen Körper existieren zwei Arten antioxidativer Schutzgruppen, die enzymatischen und nicht enzymatischen Antioxidantien.

➤ Enzymatische Antioxidantien:

Zu diesen zählen die Superoxiddismutase, die Katalase und die Glutathionperoxidase. Die Enzyme benötigen Mikronährstoffe, um vollständig funktionsfähig zu sein.

➤ Nicht enzymatische Antioxidantien:

Einerseits zählen zu dieser Gruppe Vitamin E und C und β -Carotin, die mit der Nahrung aufgenommen werden, andererseits die vom Körper synthetisierten Verbindungen Glutathion und Ubichinon [ELMADFA und LEITZMANN, 2004].

2.2. nicht enzymatische Antioxidantien

Zu den endogenen Antioxidantien zählen:

2.2.1. Glutathion (GSH)

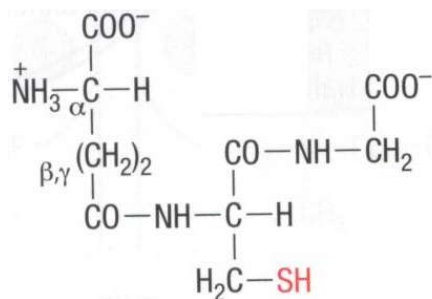


Abbildung 3: Glutathion [LÖFFLER et al, 2006]

Glutathion ist ein Tripeptid, das aus Glutamat, Cystein und Glycin besteht und in allen Zellen des Organismus vorkommt. In besonders hoher Konzentration ist es in den Erythrozyten enthalten. Die Biosynthese von Glutathion ist enzymkatalysiert. Aufgrund der SH-Gruppen von Glutathion zählt es zu den Sulfhydrylverbindungen [LÖFFLER 2004].

Seine intrazelluläre Konzentration liegt zwischen 0,5-10 mmol/l. Die Thiolgruppe hat eine stark reduzierende Wirkung und reagiert leicht mit freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies. Bei dieser Reaktion entsteht das Glutathion – Disulfid GSSG, das in einer NADPH-abhängigen Reaktion wieder zu GSH reduziert werden kann [LÖFFLER et al., 2006].

Glutathion ist ein Cofaktor von einigen gegen oxidativen Stress wirksamen Enzymen, wie z.B. GSH-Px, Glutathion-transferase. GSH ist beim Aminosäuretransport durch die Plasmamembran beteiligt. Durch Glutathion

Studienresultate zeigen die Wirksamkeit von Vitamin C bei der Reduktion der Konzentration von LDL-Cholesterin und Triglyzeriden. Diese beiden Fettstoffwechselfparamater sind mit erhöhter Inzidenz für Herzerkrankungen assoziiert [VINSON und JANG, 2001; SHIDFAR et al., 2003; REZIAN et al., 2002].

2.2.3. Vitamin E (Tocopherol)

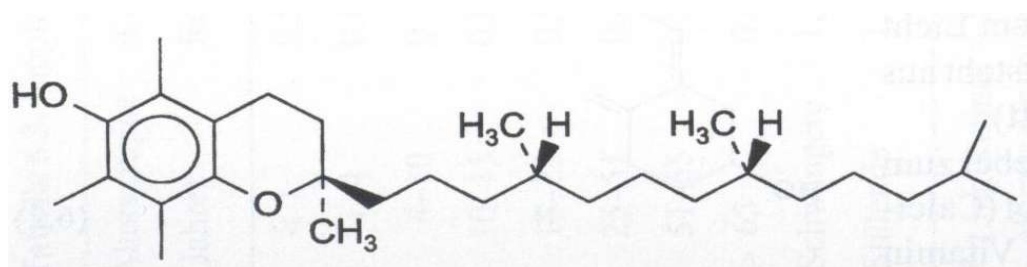


Abbildung 5: Vitamin E [BELITZ et al., 2007]

Unter Vitamin E versteht man eine Gruppe von acht fettlöslichen Tocopherolen und Tocotrienolen. Die Tocopherole und Tocotrienole α , β , γ , δ unterscheiden sich durch die Stellung und Anzahl der Methylgruppen am Benzolring. Alle haben antioxidative Eigenschaften, wobei α -Tocopherol die höchste Wirksamkeit in vivo besitzt [Fuchs et al., 2003].

Vitamin E ist ein wichtiges Antioxidans und kann vor Lipidperoxidation schützen. Es ist in der Lage reaktive Radikale wie das Hydroxylradikal oder Superoxidradikal abzufangen [Valko et al., 2006].

Der Schutz der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Phospholipiden der Zellmembranen ist eine weitere wichtige Funktion der Tocopherole.

Vitamin E ist in der Lage Peroxidradikale abzufangen und hat eine Schutzwirkung gegen radikalbildende Schwermetalle, Medikamente oder Luftschadstoffe wie z.B.: Ozon [ELMADFA und LEITZMANN, 2004; FUCHS et al., 2003].

Bei allen aufgezählten Effekten von Vitamin E muss die Dosis - Wirkungsbeziehung berücksichtigt werden. Konzentrationen von Vitamin E > 300 mg/Tag können die Gesamtmortalität erhöhen, besonders bei Personen mit kardiovaskulären Erkrankungen. Der Referenzbereich für Erwachsene liegt bei 12-14 mg/Tag. [KASPER et al., 2009; MILLER et al., 2005, DACH 2008].

2.2.4. β -Carotin

β -Carotin ist die Vorstufe von Vitamin A. Beide zählen zu den fettlöslichen Vitaminen. Im Vergleich zu anderen Provitaminen hat β -Carotin eine hohe Wirksamkeit, da es aus zwei β -Iononringen besteht. [GRIMM und BIESALSKI, 2007].

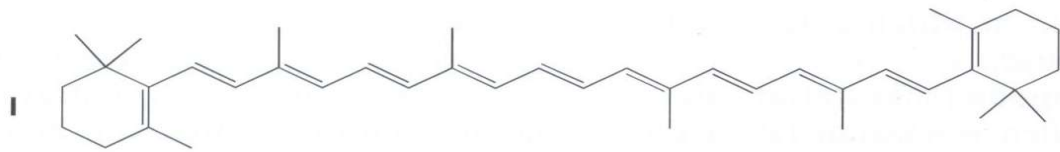


Abbildung 6: β -Carotin [ELMADFA und LEITZMANN, 2004]

In den Leberzellen bzw. Darmmukosazellen kann aus β -Carotin Vitamin A gebildet werden. β -Carotin ist ein Antioxidans und wirkt gegen freie Radikale wie z.B. Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$. Studienergebnisse zeigen die Wirksamkeit gegen die Entstehung maligner Tumore und Atherosklerose [KASPER et al., 2009].

Zu hohen Dosen von β -Carotin im Bereich von 20-30 mg/Tag können besonders bei Risikogruppen (wie z.B. Rauchern) schädigend wirken und das Risiko für die Krebsentstehung erhöhen [KASPER et al., 2009, TANVETYANON T. et al., 2008]. Der Referenzbereich für die Zufuhr liegt bei 4,8-6 mg/Tag für Erwachsene [DACH, 2008].

2.2.5. Ubichinon

Ubichinon, auch Coenzym Q genannt, ist ein Benzochinonderivat mit einer isoprenen Seitenkette. Der Index für Ubichinon - 50 bzw. Coenzym Q10 steht dafür, dass das betreffende Molekül 10 Isoprenreste bzw. 50 C-Atome besitzt.

Hydrochinone sind Ubichinone (z.B. Coenzym Q6 bei Mikroorganismen, Coenzym Q 11 bei Ratten) in reduzierter Form und sind in der Lage freie Radikale und Peroxide in Membranen zu reduzieren bzw. zu entfernen. Lipoproteine werden durch Ubichinone vor Oxidation geschützt [ELMADFA 2009; OGNJANOVIC B.I. et al., 2010].

2.3. Enzymatische Antioxidantien

Die enzymatischen Antioxidantien Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase und Katalase kommen in allen Zellen vor und schützen den Organismus vor reaktiven Sauerstoffspezies [HELMUT 1997].

2.3.1. Superoxiddismutase (SOD)

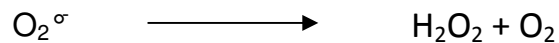
Das Enzym Superoxiddismutase kommt in Säugetieren in drei verschiedenen Formen vor. Sie unterscheiden sich durch ihre Lokalisation und in ihrem aktiven Zentrum.

Die Mangan enthaltene Form (Mn-SOD) ist in den Mitochondrien lokalisiert, die Kupfer und Zink enthaltende dimere Form (CuZn-SOD) ist vor allem im Cytosol enthalten und die tetramere Form CuZn-SOD wird in den extrazellulären Raum abgegeben [LÖFFLER et al, 2007].

Diese Formen sind optimal funktionsfähig, wenn der Körper ausreichend mit Kupfer, Zink und Mangan versorgt ist. CuZn-SOD katalysiert vor allem die Dismutation des Superoxidanions zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid. Mn-

SOD ist eines der effektivsten antioxidativen Enzyme bei Tumoren. Eine Vielzahl von Studien bei verschiedenen Zelllinien hat ergeben, dass eine Überproduktion von Mn-SOD zu einer Verzögerung des Tumorstwachstums führt [VALKO et al., 2006].

Die Aktivität von SOD hängt stark mit oxidativen Vorgängen im Körper zusammen. Daher kann man aufgrund der Aktivitätsmessung von SOD auf den oxidativen Status des Organismus schließen. Bei vorhandenen Belastungen des Körpers wie Lipidperoxidation kommt es zu einer verminderten SOD-Aktivität [KARAJIBANI et al., 2009].

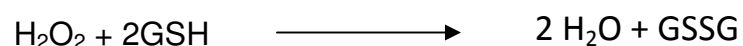


Das gebildete Wasserstoffperoxid kann von der Katalase weiter zu Wasser abgebaut werden [LUBERT 1995].

2.3.2. Glutathion-Peroxidase (GSH-Px)

Die Glutathion-Peroxidase ist ein antioxidativ wirksames Enzym, das im menschlichen Körper in Leber, Herz und Lunge und in Bakterien vorkommt. Ihre Wirkweise beruht auf der Reduktion organischer Peroxide (ROOH) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Glutathion (siehe 2.2.1.) stellt die Reduktionsäquivalente bereit. Dabei entsteht GSSG, welches durch die Glutathion-Reduktase mit dem Cofaktor NADPH wieder zu GSH regeneriert wird.

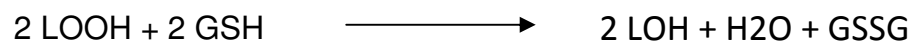
Reduktion von Wasserstoffperoxid:



Gesunde Zellen enthalten einen hohen intrazellulären GSH/GSSG Anteil um die Reduktion von H_2O_2 zu fördern. Liegt oxidativer Stress vor, kommt es rasch zu Veränderungen der GSH und GSSG Konzentrationen durch Aktivität der GSH-Px [SUZY et al, 2005].

Bei Belastungen wie Ozon, Aufnahme oxidierten Fette und oxidativer Schädigung der Muskelzelle ist die Aktivität der GSH-Px erhöht. Zur Senkung kommt es bei Mangel an Eisen, Riboflavin, Protein, Pyridoxin und Kupfer [ELMADFA und LEITZMANN, 2004].

GSH-Px ist auch für die Detoxifikation von Lipidhydroperoxiden (LOOH) zuständig. Bei dieser Reaktion werden LOOH in weniger toxische Hydroxyfettsäuren (LOH) reduziert.



[LÖFFLER et al, 2007]

Die Regulation des Arachidonsäure-Stoffwechsels und die dadurch erfolgende Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen Prostaglandin und Thromboxan und damit der Thrombozytenaggregation ist eine weitere Aufgabe der GSH-Px [ELMADFA und LEITZMANN, 2004].

Die Glutathion-Peroxidase besteht aus vier identen Untereinheiten und besitzt in seinem aktiven Zentrum die Aminosäure Selenocystein, in der das Schwefelenzym des Cystein durch ein Selenatom ersetzt ist. Daher ist die Aktivität von GSH-Px von der Bioverfügbarkeit und Aufnahme des Selens abhängig.

Man unterscheidet bei der GSH-Px fünf Formen, die sich aufgrund ihrer Lokalisation, Struktur, enzymatischen Natur und unterschiedlicher Spezifität gegenüber Hydroperoxiden unterscheiden [MATÉS et al., 1999].

Das sind die klassische oder zelluläre GSH-Px, die mitochondriale GSH-Px, die Phospholipid-Hydroperoxid GSH-Px, die gastrointestinale Form der GSH-Px und die extrazelluläre GSH-Px [VALKO et al., 2006].

Die Phospholipid-Hydroperoxid GSH-Px ist in fast allen Geweben zu finden und ist in der Lage Phospholipid-Hydroperoxide, Fettsäurehydroperoxide, Cholesterolhydroperoxide, die in peroxidierten Membranen lokalisiert sind, und oxidierte Lipoproteine zu reduzieren.

Die klassische Form der GSH-Px ist vor allem in Leber, Nieren, Erythrocyten oder Lunge zu finden. Die mitochondriale GSH-Px ist in den Erythrocyten, Nieren und Leber lokalisiert.

Zu den Funktionen der mitochondrialen GSH-Px und der zellulären GSH-Px zählen die Reduktion von Fettsäurehydroperoxiden und H_2O_2 [MATÉS et al., 1999]. Die klassische GSH-Px wirkt gegen Hydroperoxid verursachten Reaktionen entgegen, und moduliert den nukleären Transkriptionsfaktor [BRIGELIUS-FLOHÉ R. 1999] NF-KB, der bei Entzündungsreaktionen eine bedeutende Rolle spielt.

Die extrazelluläre Form ist vor allem in den Nieren lokalisiert, kommt aber auch in geringeren Mengen in anderen Körpergeweben vor. Hauptaufgabe ist der Schutz vor jeglichem Hydroperoxidtransfer. Möglicherweise reguliert die extrazelluläre Form den Tonus von extrazellulären Hydroperoxiden, die vermutlich verantwortlich für die Biosynthese von Lipidmediatoren, wie Leukotrienen, Thromboxanen sind.

Im Gastrointestinaltrakt und der Leber ist eine weitere Art der GSH-Px zu finden, die aufgrund ihrer Lokalisation auch als gastrointestinale GSH-Px bezeichnet wird [BRIGELIUS-FLOHÉ R. 1999]. Es wird angenommen, dass diese Form der GSH-Px als erste Abwehr gegen Lipidhydroperoxide dient [CHU F.F et al., 1993].

In einem Tierversuch von Silva E.L et al. konnte ein Anstieg der SOD- und eine Abnahme der GSH-Px- Aktivität nach 60 tägiger Fütterung mit Cholesterol beobachtet werden [SILVA et al., 1995]. In einem Studienergebnis eines

Tierversuchs von DEL BOCCIO et al. zeigte sich ein Anstieg der GSH-Px bei jenen Tieren die mit cholesterinreicher Nahrung gefüttert worden sind [DEL BOCCIO G et al., 1990].

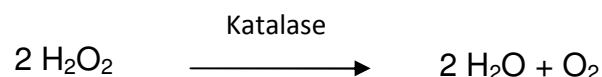
TREVISAN et al. konnten eine hoch signifikante Korrelation zwischen der GSH-Px und HDL-Cholesterin entdecken. Höhere Konzentrationen der GSH-Px führten zu einer Zunahme von HDL-Cholesterin bei allen Studienteilnehmern [TREVISAN et al., 2001].

Studienergebnisse zeigen, dass die GSH-Px 60 % der LOOH reduzieren kann. Die Wirkweise der GSH-Px ist von vorhergehender Aktivität der Phospholipase 2 abhängig. Diese hydrolisiert die LOOH bevor die GSH-Px diese reduziert. [THOMAS et al., 1990].

2.3.3. Katalase (KAT)

Die Katalase kommt in fast allen pflanzlichen und tierischen Zellen vor. Beim Menschen kommen die höchsten Konzentrationen dieses Enzyms vor allem in den Peroxisomen der Leberzellen und in den Erythrozyten vor. Das Enzym ist ein eisenhaltiges Hämprotein, das aus 4 Protein-Untereinheiten besteht. Ihre Aufgabe ist der Schutz vor Wasserstoffperoxid. Die Katalase hat eine der höchsten Umsatzgeschwindigkeiten aller Enzyme. Ein Molekül Katalase kann 6 Millionen Wasserstoffperoxide zu Wasser und Sauerstoff umwandeln [VALKO et al., 2006].

Die Katalase reduziert Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff.



[LUBERT 1995]

2.3.4. Interaktion der drei Enzyme

Die drei Enzyme Katalase, Superoxiddismutase und Glutathion-Peroxidase interagieren im Körper stark vernetzt. SOD zählt zu der ersten und Kat und GSH-Px zu der zweiten Abwehr gegen oxidativen Stress. SOD ist wie bereits erwähnt für die Umwandlung des Superoxidradikals zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff zuständig. Durch das Vorhandensein von H_2O_2 werden GSH-Px und KAT aktiviert [NIKOLIC et al., 2006].

Jeder Anstieg von SOD ist daher mit einer Zunahme an GSH-Px und KAT verbunden. Wenn H_2O_2 nicht abgebaut wird reagiert es mit dem Superoxidradikal zum Hydroxylradikal. Die Katalase wird erst bei höheren Konzentrationen des Superoxidradikals aktiviert [PASTOR et al., 1998].

2.4. Bilirubin

Bilirubin gehört zu der Gruppe der Gallenfarbstoffe. Es wird aus dem Porphyringerüst des Hämoglobins gebildet. Dieses wird im Monozyten-Makrophagen-System von Leber, Milz und Knochenmark in zwei Reaktionen umgewandelt. Zuerst wird Häm oxidativ zum grünen Biliverdin gespalten und danach zum gelben Bilirubin reduziert.

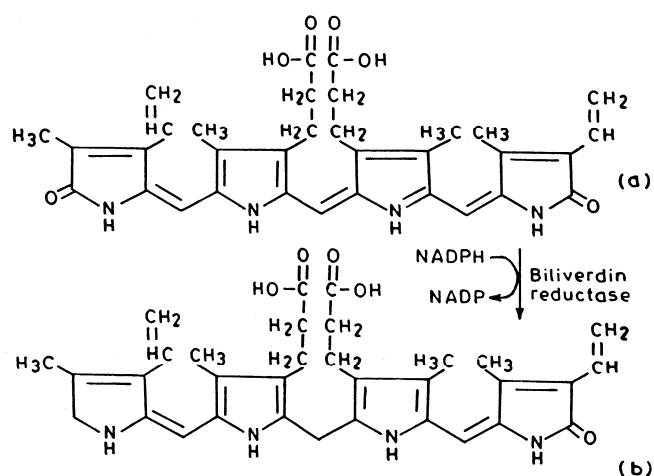


Abbildung 7: Bilirubin(b) und Biliverdin (a) [ASAD et al., 2001]

Der weitere Stoffwechsel von Bilirubin findet in der Leber statt. Der Transport im Blut dorthin erfolgt gebunden an Albumin aufgrund der Löslichkeit im Plasma. Bilirubin wird in der Galle als wasserlösliches Diglukuronid gespeichert [LÖFFLER et al., 2007].

Die Bilirubin-Konjugate werden im Darm, besonders im Dickdarm unter der Einwirkung von Enzymen anaerober Bakterien partiell gespalten. Das bei dieser Reaktion freiwerdende Bilirubin wird zu Urobilinogen und Sterkobilinogen reduziert. Die beiden Verbindungen werden mittels Dehydrierung in Urobilin in der Niere und Sterkobilin im Dickdarm umgewandelt. Sterkobilin wird über den Fäzes ausgeschieden und ist der Grund für seine gelb-braune Färbung [THEWS et al., 1999].

Hämoglobin enthält den größten Anteil an Häm im Körper. An einem Tag werden zirka 90 mg/kg Körpergewicht Hämoglobin umgesetzt. Die tägliche Ausscheidung an Gallenfarbstoffen entspricht etwa der Menge an Hämoglobin, das täglich gebildet und abgebaut wird. Der Porphyrinanteil im Hämoglobin beträgt 3,5 % des Hämoglobingewichts. Daher werden beim Abbau von 1 g Hämoglobin 35 mg Bilirubin gebildet. Zu diesem Wert kommen noch das beim Abbau von anderen Hämproteinen wie Myoglobin oder Cytochrom, freigesetzte Bilirubin sowie die Nebenprodukte der Hämbiosynthese. Somit beträgt die Gesamtproduktion von Gallenfarbstoffen beim Menschen etwa 250 mg. Die Bildung von Bilirubin beträgt 220-250 mg pro Tag [LÖFFLER et al., 2007, KOOLMAN und RÖHM, 2002].

Im Plasma gibt es zwei Arten von Bilirubin: Das direkte oder konjugierte Bilirubin, welches das glucuronidierte Bilirubin darstellt, und das indirekte, auch unkonjugierte Bilirubin, das an Albumin gebunden ist. Das glucuronidierte Bilirubin macht circa 10-20% des Gesamtbilirubins im Serum aus, das unkonjugierte 80-90%.

2.4.1. Bilirubinabbau im Darm

Bilirubin kann nur teilweise über den enterohepatischen Kreislauf wiederverwertet werden und wird daher in mehreren Schritten abgebaut.

Im Dickdarm wird durch eine β -Glucuronidase der Glucuronatrest des Bilirubin abgespalten. Danach erfolgt die Reduktion zum Stercobilinogen. Das erste Zwischenprodukt ist das Mesobilirubin, das durch Hydrierung der Vinylgruppen zu Ethylgruppen entsteht. Weiters wird durch Hydrierung der Methingruppen ($-\text{CH}=\text{}$) zwischen den Ringen A, B und C zu Methylengruppen Mesobilirubinogen gebildet. Es folgt ein weiterer Hydrierungsschritt an den Pyrrolringen A und B bei dem Stercobilinogen entsteht. Beim letzten Reaktionsschritt wird durch Dehydrierung der Methylengruppe am Ring D zu einer Methingruppe aus Stercobilinogen Stercobilin gebildet. Die Ausscheidung von Stercobilin beträgt etwa 40-280 mg/Tag.

Durch bakterielle Enzyme wird ein Teil des Stercobilinogens in Dipyrrole zerlegt (Mesobilifuchsin, Bilifuchsin). Die entstanden Verbindungen Dipyrrol und Stercobilin sind für die normale Stuhlfarbe mitverantwortlich. Die im Darm aus Bilirubin entstehenden Verbindungen werden bis zu 20% reabsorbiert. Sie gelangen über die Pfortader in die Leber, wo sie erneut ausgeschieden werden (enterohepatischer Kreislauf). Davon gelangt ein kleiner Teil über das Blut zu den Nieren. Dort wird es als Urobilin oder Urobilinogen mit dem Harn ausgeschieden [THEWS et al., 1999].

2.4.2. Hyperbilirubinämien

Die Normwerte für das Gesamtbilirubin liegen unter 1,0 mg/dl [THEWS et al., 1999]. Werte von mehr als 1,0 mg/dl (17 $\mu\text{mol/l}$) Gesamtbilirubin gelten als erhöht. Eine leichte Hyperbilirubinämie liegt bei einer Konzentration von 2-3 mg /100 dl (34-51 μmol) Gesamtbilirubin vor. Bei einer starken Hyperbilirubinämie kommt es zu einem Übertritt des Bilirubins in die Gewebe. Als Folge dessen

tritt die Gelbfärbung der Haut und der Skleren auf, was als Gelbsucht oder Ikterus bezeichnet wird.

Folgende Ursachen gibt es dafür:

- I. Eine gesteigerte Produktion von Bilirubin, mit der die Leber bei der Ausscheidung überfordert ist.
- II. Ein Verschluss der ableitenden Gallenwege und dadurch eine Unterbrechung des Gallenflusses und der Bilirubinausscheidung.
- III. Eine Störung der Bilirubinkonjugation bzw. Ausscheidung in der Leber.

In Abhängigkeit der Ursache der Bilirubinerhöhung wird zwischen prä-, intra- und posthepatischem Ikterus unterschieden, wobei auch Mischformen dieser Gelbsuchtsarten auftreten können.

2.4.3. Erworbene Hyperbilirubinämien

I. Hämolytischer (prähepatischer) Ikterus

Ein erhöhter Abbau von Erythrozyten bei z.B. hämolytischen Anämien führt zu einer gesteigerten Produktion der Abbauprodukte des Häms und in Folge der Gallenfarbstoffe. Wenn die Bilirubinbildung die Glucuronidierung und die anschließende Ausscheidung in die Galle übersteigt kommt es zu Hyperbilirubinämie und somit zum hämolytisch verursachten Ikterus. Bei diesem ist die Konzentration des unkonjugierten Bilirubins im Plasma erhöht, was auch als prähepatischer Ikterus bezeichnet wird. Die Konzentrationen von Kalium und der Laktatdehydrogenase (LDH) sind bei schwacher Hämolyse im Blut erhöht.

II. Physiologischer Neugeborenenikterus

Nach der Geburt hat jedes Baby eine Hyperbilirubinämie und etwa 50 % der Neugeborenen weisen in den ersten Lebenstagen auch eine Gelbsucht auf. Der

Plasmabilirubinspiegel erhöht sich durch die Hämolyse von 1-2 mg/dl bzw. 17-34 $\mu\text{mol/l}$ (unkonjugiert) auf 5-6 mg/dl bzw. 85 -102 $\mu\text{mol/l}$. Dieser Ikterus ist physiologisch und sinkt im Laufe einer Woche wieder auf die Normalwerte ab. Bei dieser Art des Ikterus ist keine Therapie notwendig, da die Bilirubinwerte nur leicht erhöht sind.

Die Hauptursachen für die Erhöhung sind ein signifikanter Anstieg der Hämoglobinkonzentration, eine auf 60% verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten und eine hohe Konzentration an nicht verwertbaren Hämoglobin, welches als Shunthämoglobin bezeichnet, gleich abgebaut wird [SILBERNAGL und DESPOPOULOS 2003; BURCKHARD 2002].

III. Pathologischer Neugeborenenikterus

Ursache für diese Form des Neugeborenenikterus ist eine erhöhte Hämolyse, die z.B. durch niedriges Geburtsgewicht oder eine Frühgeburt, zystische Fibrose oder Rhesusinkompatibilität entsteht. Bei dieser Art des Ikterus befindet sich im Blut des Neugeborenen zu wenig Albumin, um das freie unkonjugierte Bilirubin zu binden. Freies Bilirubin kann in hohen Konzentrationen die Blut-Hirn-Schranke überwinden und einen Kernikterus verursachen. Wenn dieser nicht behandelt wird kann es zu Hörschäden und geistiger Retardierung kommen [SILBERNAGL und DESPOPOULOS 2003].

Steigt die Konzentration des unkonjugierten Bilirubins auf Plasmawerte über 5 mg/100 ml gibt es fast nur mehr die Möglichkeit einer regelmäßigen Phototherapie. Bei dieser wird das Neugeborene mit Licht im Wellenlängenbereich von 400-500 nm bestrahlt. Dabei wird das Bilirubin durch Photoisomerisierung zu Lumirubin umgewandelt. Diese Form des Bilirubin kann unkonjugiert ausgeschieden werden, da sich Salzbrückenbindungen bilden, welche die Wasserlöslichkeit des Bilirubins erhöhen [AGATI et al., 1998; KHAN et al., 2000].

IV. Hepatozellulärer (intrahepatischer) Ikterus

Bei dieser Art des Ikterus kommt es zu einer Störung der Sekretion von konjugiertem Bilirubin aus den Leberzellen in die Gallenkapillaren. Sie wird auch als Sekretionsikterus bezeichnet. Durch Hepatitis, Medikamente, Sepsis, Leberzirrhose, Dubin-Johnson-Syndrom oder das Rotor-Syndrom kommt es zu einer Schädigung des Leberparenchyms. Das konjugierte Bilirubin kann von den Hepatozyten nicht mehr in ausreichender Weise in die Gallenkanälchen transportiert werden und es kommt zu einem Anstieg des Bilirubin im Plasma [THEWS et al., 1999; SILBERNAGL et al., 2005].

V. Verschlussikterus (posthepatischer Ikterus)

Beim Verschlussikterus werden die Gallenwege durch Gallensteine oder Tumore verlegt. Dadurch kann es zu einem Gallenstau kommen (Cholestase). Die Ausscheidung des konjugierten Bilirubins ist blockiert, da sich die Galle vor dem Abflusshindernis staut. Die Galle wird durch die Desmosomen in extrazelluläre Räume gepresst und das konjugierte Bilirubin, das nicht auf diese Weise ausgeschieden werden kann, erhöht die Plasmakonzentration [KLINKER und SILBERNAGL, 2003].

2.4.4. Angeborene Hyperbilirubinämie

I. Rotor-Syndrom

Bei dieser Form der Hyperbilirubinämie ist die Sekretion von konjugiertem Bilirubin aus den Leberzellen in die Gallenkapillaren und somit die Bilirubinausscheidung gestört. Das Rotor-Syndrom wird autosomal-rezessiv vererbt. Bei dieser Hyperbilirubinämie ist die Plasmakonzentration an konjugiertem und dadurch auch die Konzentration des Gesamtbilirubins erhöht. Es handelt sich um einen milden Ikterus, der meistens vor dem 20 Lebensjahr auftritt [THEWS et al, 1999; URBAN und FISCHER 1999].

II. Dubin-Johnson-Syndrom

Das Dubin-Johnson Syndrom wird autosomal rezessiv vererbt. Es ist eine benigne Stoffwechselerkrankung verursacht durch eine Mutation des Gens, das für das MRP-2 codiert. MRP steht für Multidrug Resistent Protein und ist ein ATP-abhängiger Transporter, der dazu dient das konjugierte Bilirubin an die Gallenflüssigkeit abzugeben. Dieser Gendefekt bewirkt, dass die Abgabe des konjugierten Bilirubin an die Gallenflüssigkeit nicht erfolgen kann und sich in Folge in den Hepatozyten ansammelt. Die Leber färbt sich durch Pigmentablagerungen schwarz und es entsteht eine leichte chronische Hyperbilirubinämie mit Gelbsucht. Ab dem Kindesalter kommt es zu auftretender Gelbsucht ohne Cholestase, die in Schüben auftritt. Das Defizit an MRP-2 kann zum Teil durch eine Up-Regulation des MRP-3 kompensiert werden. Das Dubin-Johnson-Syndrom kommt meistens bei Jugendlichen vor [THEWS et al, 1999; PAULUSMA et al, 1999; URBAN und FISCHER 2003].

III. Morbus Meulengracht (Gilbert-Syndrom)

Bei dieser Hyperbilirubinämie kann das unkonjugierte Bilirubin bis 6 mg/100ml im Plasma ansteigen. Es wird als Morbus Meulengracht aber auch als Gilbert-Syndrom bezeichnet, da es von Augustin Nicolas Gilbert erklärt worden ist. Im Normalfall kommt es zu einem leichten Anstieg des unkonjugierten Bilirubin zwischen 1-3mg/dl bzw. 17,1-51,3 $\mu\text{mol/l}$ mit einer leichten Gelbfärbung der Skleren. Bei stressbedingten Belastungen wie Nahrungskarenz, Infekten, körperlichen Belastungen oder Medikamenten, kann Bilirubin bis zu 100 % ansteigen. Bei Europäern mit Morbus Meulengracht liegt eine Mutationen im Bereich der Promotorregion des UDP-Glucuronyltransferase I-Gens vor. Das Gilbert-Syndrom wird autosomal-rezessiv vererbt [BURCHEL und HUME 1999; LÖFFLER et al., 2007].

Die Aktivität des Enzyms UGT liegt bei Personen mit Gilbert's Syndrom bei ca. 70 % im Vergleich zu gesunden Menschen [KAMISAKO 2004].

Bei 3-10 % der Bevölkerung kommt diese Hyperbilirubinämie vor. Männer sind mit 12,4 % häufiger betroffen als Frauen mit 4,8 % [LÖFFLER et al., 2007].

Beim Gilbert's Syndrom unterscheidet man zwischen zwei Typen der Mutation von UGT1A1. Das erste ist ein dinukleotider Polymorphismus in der TATA Box der UGT1A1 Gene. Meistens kommt es zu 7 TA Wiederholungen, statt wie beim Wildtyp zu 6, also A(TA)₇TAA statt A(TA)₆TAA.

Erhöhte Plasmakonzentrationen des unkonjugierten Bilirubins ohne Hämolyse und veränderten Leberenzymen sind wichtige Kennzeichen für die Diagnose von Morbus Meulengracht [LÖFFLER et al, 2007; KAMISKAO 2004].

Aufgrund der antioxidativen Eigenschaften von unkonjugiertem Bilirubin zeigt das Gilbert Syndrom einen positiven Effekt auf Oxidationsvorgänge im Körper auf. Laut einer Studie von Bulmer et al. weisen Personen mit dieser Mutation eine geringere Anfälligkeit für die Oxidation des Serums und in weiterer Folge einer geringeren Prävalenz für Herz-Kreislauf-Erkrankungen auf [BULMER et al., 2008].

In einer Studie von Vitek et al. konnte beobachtet werden, dass Studienteilnehmer mit Gilbert's Syndrom eine niedrigere Prävalenz für ischämische Herzerkrankungen hatten [VITEK et al., 2002]. Die Auswertungen der NHANES Studie bestehend aus 7.000 Probanden zeigen, dass moderat erhöhtes Bilirubin zu einer niedrigeren Prävalenz für periphere Gefäßerkrankungen führt und Bilirubin daher eine Rolle bei der Prävention von Arteriosklerose spielt [VITEK et al., 2008].

IV. Crigler-Najjar-Syndrom

Dieses Syndrom wird durch einen genetischen Defekt des Gens für die UDP-Glukuronosyl-Transferase verursacht. Dadurch wird das Enzym UGT teilweise oder ganz inaktiviert und dies führt zu einer höheren Bilirubin-Konzentration im Plasma als beim Gilbert-Syndrom. Es liegt eine Mutation bei einem der fünf Exons des Gens vor, das für die UGT codiert [JANSEN 1999; URBAN und FISCHER 2003].

Das Crigler-Najjar-Syndrom wird aufgrund der Art der Vererbung und der Restaktivität des Enzyms in zwei Typen eingeteilt.

Typ 1:

Crigler-Najjar Typ 1 kommt sehr selten vor und wird autosomal-rezessiv vererbt. Das Enzym UGT fehlt ganz und führt nach wenigen Tagen zu einem Kernikterus. Als einzige Therapie hilft eine Lebertransplantation, was oft aufgrund der Wartezeiten für Organe nicht so schnell möglich ist. Die Kinder mit dieser Erkrankung können mittels Phototherapie oder Austauschtransfusion behandelt werden bis sie eine Lebertransplantation bekommen. Die Phototherapie ist allerdings maximal 4 Jahre möglich.

Die Lebenserwartung für solche Patienten liegt bei 30 Jahren. Die Bilirubinwerte liegen bei 25 – 40 mg/dl Plasma bzw. 425 – 680 $\mu\text{mol/l}$ [JANSEN 1999].

Typ 2:

Bei dieser Hyperbilirubinämie ist die Vererbung autosomal-dominant. Sie ist auch unter dem Namen Arias-Syndrom bekannt. Das Enzym ist in geringen Mengen vorhanden, mit einer Restaktivität von 10 % im Vergleich zu Gesunden. Die Plasma-Bilirubinwerte liegen bei 6 – 25 mg/dl bzw. 102 – 425 $\mu\text{mol/l}$. Im Körper der Betroffenen wird Bilirubin hauptsächlich als Monoglukuronid ausgeschieden. Behandelt werden die Patienten mit Phenobarbital, was die Enzyminduktion stimuliert [JANSEN 1999; KAMISAKO 2004].

2.4.5. Wirkung der Hyperbilirubinämie

Wie bereits im Kapitel 2.4.4. erwähnt hat das unkonjugierte Bilirubin auch protektive Wirkungen auf den Körper.

Es sind bereits zahlreiche Studien über Bilirubin durchgeführt worden, die die Wirkungsweise dieser Verbindung auf den Organismus untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass Bilirubin antioxidative, antimutagene und antikanzerogene Eigenschaften besitzt und auch bei der Entstehung von

kardiovaskulären Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielt. Die Wirkung Bilirubins ist jedoch Dosisabhängig. Zu niedrige und zu hohe Konzentrationen können sich negativ auf den Organismus auswirken. Schwertner et al. beobachteten bei Bilirubinkonzentrationen $< 1 \text{ mg/dl}$ gleichzeitig eine erhöhte Präsenz von koronaren Herzgefäßerkrankungen [SCHWERTNER et al., 1994].

Zu hohe Bilirubinkonzentrationen $> 6 \text{ mg/dl}$ können neurotoxisch im Organismus wirken [VITEK et al. 2009] und z.B. beim Crigler-Najjar-Syndrom Typ 1 ($25\text{-}40 \text{ mg/dl}$) bei Neugeborenen zu einem Kernikterus führen. [JANSEN 1999].

Moderat erhöhte Bilirubinkonzentrationen von $1\text{-}3 \text{ mg/dl}$ können die genannten positiven Effekte auf den Organismus haben.

2.4.5.1. Bilirubin als Antioxidants

Bilirubin schützt die Zellen vor Schädigung durch Inhibierung der Membranlipidperoxidation welche durch fettlösliche Peroxylradikale ausgelöst wird. Dabei wirkt es synergistisch mit α -Tocopherol und anderen exogenen Antioxidantien [NEUZIL und STOCKER, 1994].

Dieser Synergismus basiert auf der Fähigkeit der Gallenfarbstoffe z.B. das α -Tocopheroxyradikal zu reduzieren [WITTING et al., 1996].

Bilirubin agiert als Antioxidans im Körper. Der Mechanismus hinter der Regeneration von Bilirubin ist noch unklar. Eine Theorie lautet, dass Bilirubin zu Biliverdin oxidiert wird und mittels der Biliverdinreduktase wieder zu Bilirubin reduziert wird [SEDLAK et al., 2009].

In einer Studie von Asad et al. ist die antioxidative Wirkung von Bilirubin untersucht worden, wobei Bilirubin im Vergleich zu Biliverdin einen stärkeren antioxidativen Effekt aufwies. Die durch L-DOPA- Cu[II] verursachte oxidative DNA-Spaltung und die dadurch entstandenen Hydroxylradikale, wurden erfolgreicher durch Bilirubin entgiftet [ASAD et al., 2001].

Rauchen beschleunigt oxidative Vorgänge im Körper und trägt somit zur Entstehung von oxidativem Stress bei. Die Auswertung der NHANES III, einer flächendeckenden Erhebung der Gesundheit und Ernährung der U.S. Bevölkerung hat ergeben, dass bei Rauchern der Serumbilirubinspiegel signifikant erniedrigt war. Was den Schluss zulässt, dass der Bilirubinverbrauch bei Rauchern höher ist als bei Gesunden und Bilirubin wahrscheinlich antioxidativ wirksam ist [ZUCKER et al., 2004].

Bilirubin wurde auch auf **seine antimutagene Eigenschaften** mittels Ames Test getestet. In der Studie wurde untersucht ob Gallenfarbstoffe den genotoxischen Effekten von Mutagenen entgegenwirken können. Bilirubin hat den mutagenen Effekt von Trinitrofluoron und 2-Aminofluoron und Benzo(α)pyren signifikant gehemmt [BULMER et al., 2006].

2.4.5.2. Chemopräventive Eigenschaften von Bilirubin

Eine positive Wirkung von Bilirubin wurde bereits bei diversen Krebsarten beobachtet. Mäßig erhöhte Bilirubinwerte waren mit einem reduzierten Risiko für Atemwegserkrankungen assoziiert. Bei Personen mit Lungenkrebs waren die Bilirubinlevel geringer als bei Gesunden [HORSFALL et al., 2011].

In der NHANES III konnte ein schützender Effekt von Bilirubin bei gastrointestinalen Malignomen nachgewiesen werden. Je höher das Serumbilirubin, desto niedriger war die Prävalenz für Dickdarmkrebs [ZUCKER et al., 2004].

Die Auswertung der Daten über die Sterblichkeit in der BIRNH-Studie, einer 10-jährigen follow-up-Studie, zeigen einen Zusammenhang zwischen Bilirubin und der Mortalität durch Krebs. Es wurde die Beziehung zwischen Serumbilirubin und allgemeiner, kardiovaskulärer und kanzerogener Mortalität bei 5460 Männern und 4843 Frauen untersucht. Das Risiko der Mortalität durch Krebs sank bei ansteigender Konzentration des Serumbilirubins. [TEMME et al., 2001]

2.4.5.3. Bilirubin und kardiovaskuläre Erkrankungen

Bilirubin zeigte auch protektive Wirkungen bei kardiovaskulären Erkrankungen, was durch zahlreiche Studien nachgewiesen werden konnte. Es gibt bereits einige Humanstudien, die sich mit dieser Thematik beschäftigen.

In einer Studie von Bulmer et al. sind mechanistische Ansätze bezüglich der Wirkung von Bilirubin bei Personen mit Gilbert's Syndrom hinsichtlich kardiovaskulärer Risikofaktoren (ox. Stress) analysiert worden. Probanden mit GS hatten eine erhöhte antioxidative Kapazität und die Verzögerung der Serumoxidation war signifikant länger, was deren reduzierte Prävalenz für kardiovaskuläre Erkrankungen erklären kann [BULMER et al., 2008].

Vitek et al. haben den Zusammenhang zwischen Serumbilirubinkonzentrationen und peripheren arteriellen Erkrankungen in der NHANES erforscht. Es konnte festgestellt werden, dass erhöhte Serumbilirubinwerte zu einer Reduktion der Prävalenz von peripheren arteriellen Erkrankungen führen [VITEK et al., 2002].

Die Forschergruppe von Hopkins et al. hat den Einfluss von Bilirubin auf koronare arterielle Erkrankungen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass ein Ansteigen des Serumbilirubins innerhalb des Referenzbereichs von 7 -17 $\mu\text{mol/l}$ mit einer signifikanten Risikoreduktion (60-90%) für koronare arteriellen Erkrankungen assoziiert war [Hopkins et al., 1996].

Gullu et al. haben erstmals den Effekt von hohen, mittleren und niedrigen Serumbilirubinwerten auf die koronare Flussreserve erforscht. Die Ergebnisse zeigten, dass erhöhte Serumbilirubinlevel vor Beeinträchtigung der koronaren Flussreserve, sowie vor mikrovaskulären Störungen und außerdem vor koronarer Arteriosklerose schützen. Der Schutz Bilirubins vor Artherosklerose ist durch die protektive Wirkung gegen Oxidation von Lipoproteinen wie LDL-Cholesterin und Lipiden begründet [GULLU et al., 2005].

Die antiatherogene Wirkung von moderat erhöhten Bilirubin konnte ebenfalls in einer Studie von Ishizaka et al. entdeckt werden. Erhöhtes Bilirubin war mit

verminderter Ablagerung der Hauptschlagadern assoziiert [ISHIZAKA et al., 2001].

Lin et al. führten eine Untersuchung zu den Ergebnissen der Framingham Offspring Studie über UGT1A1*28 Allele und kardiovaskuläre Krankheiten bei 1.780 Personen durch.

Personen mit Gilbert's Syndrom und UGT1A1*28 Allele, die eine moderate Erhöhung von Serumbilirubin zeigen, hatten ein geringeres Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen und koronare Herzerkrankungen [LIN et al., 2006].

Aus der Vielzahl der genannten Studien über Bilirubin kann die Wirksamkeit Bilirubins als Antioxidans im Körper bekräftigt werden. Bilirubin wirkt im Körper mit anderen Antioxidantien synergistisch und dient als wichtiger Radikalfänger. Jedoch konnten die Mechanismen für die Wirkung von Bilirubin als Protektor vor kardiovaskulären Erkrankungen und Krebs noch nicht vollständig erklärt werden. Hierfür fehlen klinische Studien mit umfassender Probandenanzahl und aussagekräftigen Parametern.

3. Material und Methoden

3.1. Studiendesign

Das Ziel dieser Studie war zu testen, ob mäßig erhöhte Serumbilirubinspiegel bei Personen mit Gilbert Syndrom verminderte oxidative Schäden, Entzündungsmarker, sowie verminderten oxidativen Stress im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen. In der vorliegenden Arbeit wird näher auf die antioxidativen Enzyme, Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase eingegangen.

Diese Studie ist eine Fall-Kontroll Studie im Querschnittsdesign, die durch die Ethikkommission des Allgemeinen Krankenhauses Wien (Nr. 274/2010) genehmigt worden ist. Die Rekrutierung der Probanden erfolgte über die Kartei des Allgemeinen Krankenhauses Wien, mithilfe von Aushängen an Universitäten und Spitälern in Wien sowie über Zeitungsannoncen und Internetplattformen. Insgesamt haben 104 Personen an der Studie teilgenommen. Um die festgelegten Ein-und Ausschlusskriterien zu bestimmen wurde ein Fragebogen erhoben und eine erste Blutabnahme durchgeführt.

Die Einteilung in die jeweilige Gruppe erfolgte nach ermittelten Werten des unkonjugierten Bilirubins und des Gesamtbilirubin, die Kontrollgruppe wurde nach Geschlecht und Alter gematcht.

Beim ersten Termin für die Blutabnahme wurde den Probanden eine Probandeninformation ausgehändigt und ihr Einverständnis eingeholt, sowie ein Food Frequency Questionnaire (FFQ) ausgefüllt.

Vor dem anschließenden Hauptblutabnahmetermin wurde ein Fastentag vorgeschlagen (<400kcal/Tag) um die Gruppenzuteilung zu erleichtern. Ein Fastentag führt besonders bei Personen mit GS zu einem leichten Anstieg der BR-Spiegeln [BETRAM et al. 1970].

Mithilfe einer kurzen Befragung wurde festgestellt ob seit dem 1. Blutabnahmetermin Änderungen bezüglich der Ein- und Ausschlusskriterien aufgetreten sind. Neben der Blutabnahme wurde auch eine Mundschleimhautprobe entnommen und eine Harnabgabe fand statt.

Die vorliegende Diplomarbeit geht auf die Auswirkung erhöhter Bilirubinspiegel auf den humanen Antioxidantienstatus näher ein, wobei die enzymatischen Antioxidantien SOD, Katalase und GSH-PX Hauptaugenmerk waren.

3.2. Probanden

An der Studie haben insgesamt 101 Personen teilgenommen. Davon waren 45 eindeutig der GS-Gruppe und 39 eindeutig der Kontrollgruppe zuzuordnen. 17 Probanden waren nicht einordbar, da sie einen Bilirubinspiegel um 1mg/dl hatten. Die Probanden wurden unter Rücksichtnahme folgender Punkte ausgesucht:

Einschlusskriterien

- Alter: 20-80 Jahre
- Gesamtbilirubin im Blut höher als 1,2 mg/dl (20,52 µmol/l) [GS]
- Unkonjugiertes Bilirubin im Blut höher als 1 mg/dl (17,1 µmol/l) [GS]
- Gesamtbilirubin < 1,2 mg/dl (20,52 µmol/l) [Kontrolle]
- Unkonjugiertes Bilirubin im Blut < 1 mg/dl (17,1 µmol/l) [Kontrolle]
- Gamma-Glutamyltranspeptidase im Blut (GGT)
 - < 39 U/l (Frauen)
 - < 66 U/l (Männer)
- Alanin Aminotransferase im Blut (ALT)
 - < 35 U/l (Frauen)
 - <50 U/l (Männer)
- Aspartat Aminotransferase im Blut (AST)
 - <35 U/l (Frauen)

<50 U/l (Männer)

- Moderates Bewegungsverhalten

Ausschlusskriterien

- Alter: Jünger als 20 Jahre oder älter als 80 Jahre
- Unkonjugiertes Bilirubin niedriger als 1 mg/dl (17,1 µmol/l)
- Gesamtbilirubin niedriger als 1,2 mg/dl (20,52 µmol/l)
- Kardiovaskuläre Erkrankungen
- Hepatitis B, C und jede andere Form einer Lebererkrankung
- Cholelithiasis
- Hämolyse
- Herzerkrankung
- Chronische Nierenerkrankung
- Akute Tumorerkrankung
- Diabetes Mellitus
- Keine Supplementierung mit Antioxidantien innerhalb der letzten 4 Wochen vor der 1. Blutabnahme
- Keine Medikamenteneinnahme, welche die Leberwerte beeinflussen können (z.B.: Probenecid, Rifampicin), innerhalb der letzten 5 Wochen vor der 1. Blutabnahme
- Raucher 5 Zigaretten/Tag
- Personen mit Organtransplantaten
- LeistungssportlerInnen

3.3. Blutaufbereitung

Mittels Venenpunktion wurde den nüchternen Probanden Blut entnommen. Die dabei verwendeten Röhrchen waren mit EDTA- oder Litium-Heparin beschichtet, außerdem wurden Serumröhrchen verwendet. Die Röhrchen sind

so schnell wie möglich zum Department für Ernährungswissenschaften transportiert worden.

Die Blutproben wurden für 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, das Plasma in Cups aliquotiert, mit Stickstoff begast und für später folgende Analysen bei -80 °C eingefroren worden.

Für die Enzyme wurden die zellulären Heparin-Blutbestandteile mit Phosphatpuffer gewaschen und 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert. Dazu wurde isotonischer Phosphatpuffer zugegeben, gemischt und anschließend zentrifugiert (10 Min; 3000 U/min). Dieser Schritt wurde insgesamt 2 Mal wiederholt. Um die Erythrozytensuspension herzustellen, ist die Blutprobe 1:1 mit dem Phosphatpuffer verdünnt, gemischt, in Cups pipettiert und mit N₂ begast worden. Die Proben wurden anschließend bei -80 °C bis zur Analyse gelagert.

3.3.1. Herstellung des isotonischen Phosphatpuffers

Tabelle 3: Reagenzien für den isotonischen Phosphatpuffer

Reagenzien	Firma	Nummer
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka	71640
Natrium-EDTA	Riedel de Haën	27285
Natriumchlorid	Riedel de Haën	31434

Herstellung des isotonischen Phosphatpuffers:

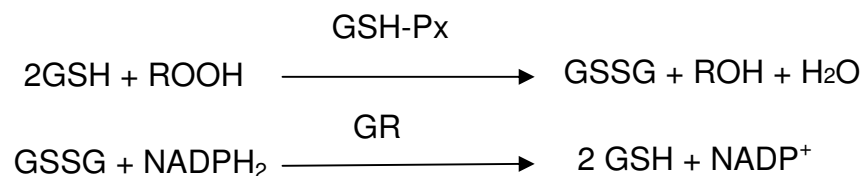
7,27 g NaCl und 1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat sowie 0,19 g Natrium-EDTA werden in ca. 950ml destilliertem Wasser gelöst. Mithilfe von 1N Salzsäure wird der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Anschließend wird der Messkolben mit destilliertem Wasser bis zur 1000 ml Markierung aufgefüllt.

3.4. Bestimmung der enzymatischen Antioxidantien

3.4.1. Bestimmung der Glutathionperoxidase im Blut

3.4.1.1. Prinzip

Die Glutathionperoxidase (GSH-Px) ist ein Enzym, das in Anwesenheit von Hydroperoxiden (ROOH) die Reaktion von reduziertem (GSH) zu oxidiertem (GSSG) Glutathion katalysiert. GSSG wird NADPH-abhängig mithilfe der Glutathionreduktase in reduziertes GSH umgewandelt.



Bei dieser Methode wird t-Butylhydroperoxid als Hydroperoxid verwendet. Es wird die Abnahme an NADPH gemessen, welche proportional der GSH-Px-Aktivität ist [BEUTLER, 1984].

3.4.1.2. Materialien und Geräte

Tabelle 4: Reagenzien für die GSH-Px –Bestimmung

Reagenzien	Hersteller	Nummer
Glutathion	Sigma-Aldrich	1000573197
GR	Roche	10105678001
NADPH Tetranatriumsalz	Roche	10107824001
t-BHP, 70%	Merck	5196306936
Tris-HCl	Fluka	93347
Na-EDTA	Riedel de Haën	27285

Kaliumhexacyanoferrat	Merck	4973
Kaliumcyanid	Aldrich	20781-0
Aqua dest.		

Lösungen:

Alle Lösungen, außer der Tris-Puffer und das Hämoglobinreagenz sind an jedem Analysentag frisch herzustellen.

GSH-Lösung [1M]: 61,46 mg Glutathion gelöst in 2 ml destilliertem Wasser

GR-Lösung [10 U/ml]: 50 µl GR-Lösung gemischt mit 2950 µl destilliertem Wasser.

NADPH-Lösung [2mM]: 3,48 mg NADPH gelöst in 2 ml destilliertem Wasser

t-BHP-Lösung [7mM]: 20 µl t-BHP in 20 ml destilliertem Wasser lösen

Tris-Puffer [1M]: 15,76 g Tris-HCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochloricum) + 186 mg NA-EDTA in etwas destilliertem Wasser vorlösen und den pH-Wert mit 1N NaOH auf 8 einstellen. Die Lösung mit destilliertem Wasser auf 100 ml auffüllen.

Hämoglobinreagenz: 198 mg Kaliumhexacyanoferrat + 49 mg Kaliumcyanid in destilliertem Wasser vorlösen und auf 1000 ml auffüllen

Geräte:

UV/VIS Photometer ATI Unicam UV4

Software : ATI Unicam Vision 2.11.

Wasserbad

pH-Meter

3.4.1.3. Durchführung

Vor der Aktivitätsmessung der GSH-Px stellt man ein Erythrozytenhämolysat her, indem man 100 µl Erythrozytensuspension mit 900 µl destilliertem Wasser mischt.

Anschließend werden die Testansätze nach folgendem Pipettierschema hergestellt:

Tabelle 5: Pipettierschema für die Aktivitätsbestimmung von GSH-Px

Reagenzien	Leerwert [µl]	Probe [µl]
Aqua dest.	670	660
Tris-Puffer	100	100
GSH	20	20
GR	100	100
NADPH	100	100
Probenhämolysat	-	10

Nach dem Pipettieren werden die Proben mithilfe eines Vortexers gemischt und 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach pipettiert man 10 µl t-BHP in den jeweiligen Testansatz und misst sofort photometrisch bei 340 nm.

Die photometrische Messung erfolgt über eine Zeitspanne von 90 Sekunden. Es wird die Extinktionsabnahme gegen den Leerwert gemessen.

Die Bestimmung des Hämoglobins ist im Kapitel 4.4. erklärt.

3.4.1.4. Auswertung

Um die spezifische Enzymaktivität zu messen wird die Extinktionsabnahme auf g Hämoglobin bezogen. Grundlage für die Berechnung ist das Lambert-Beer'sche Gesetz:

$$E = \varepsilon * c * d$$

E = Extinktion

ε = molarer Extinktionskoeffizient [1/(mol.cm)]

c = Konzentration oder Aktivität

d = Schichtdicke der Küvette [cm] =1

Nach Berücksichtigung der verwendeten Reaktionsvolumina wird folgende Formel verwendet:

$$A = \Delta E * V_c / (6,22 * V_H)$$

A = Aktivität der GSH-Px

ΔE = Extinktionsabnahme/min

V_c = Gesamtvolumen der Küvette in ml

6,22 = molarer Extinktionskoeffizient [1/(mol.cm)] von NADPH bei 340 nm

V_H = Volumen des Hämolsats

Dann wird die erhaltene Aktivität auf den Hb-Gehalt bezogen:

$$A * 100 / \text{Hb [g/dl]} = \text{I.U. /g Hb}$$

3.4.1.5. Überprüfung der Analysengenauigkeit

Der Intra-VK (=Variationskoeffizient= (Standardabweichung/ Mittelwert)* 100) der Methode betrug 4,97%.

Es wurde an jedem Analysentag eine Probe in Doppelbestimmung analysiert um die Analysengenauigkeit zu überprüfen. Dazu wurden an jedem Bestimmungstag Referenzproben analysiert. Die Kontrollprobe ist eine

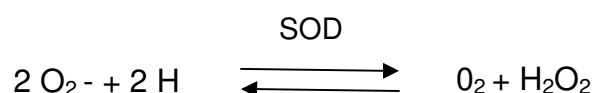
Erythrozytensuspension, die vor Beginn der Analysen hergestellt und eingefroren worden ist. Es konnte mittels der Kontrollproben der Inter-VK berechnet werden, der 3,54% beträgt.

3.4.2. Bestimmung der Superoxiddismutase in Erythrozyten

3.4.2.1. Prinzip

Diese Methode nützt die Fähigkeit des Enzymes Superoxiddismutase (SOD), die Autoxidation von Pyrogallol (1,2,3-Trihydroxybenzol) zu hemmen. [MARKLUND & MARKLUND, 1974] In wässriger Lösung autoxidiert Pyrogallol schnell unter Bildung eines gelben Farbstoffes, dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann.

Für die Reaktion ist die Anwesenheit von Superoxidanionen nötig. SOD hemmt diese Autoxidation, bei der Superoxidanionen dismutiert werden:



Um die Aktivität von SOD zu bestimmen, versetzt man eine autoxidierende Lösung von Pyrogallol mit steigenden Mengen SOD-haltiger Probe. Man ermittelt jene Probenkonzentration, bei der die Pyrogallolautoxidation zu 50% gehemmt wird. (= internationale Einheit (I. U.)).

3.4.2.2. Material und Geräte

Tabelle 6: Reagenzien für die SOD - Bestimmung

Reagenzien	Hersteller	Nummer
Pyrogallol	Riedel de Haën	16040
Ethanol p.a.	Merck	38122583748
Chloroform	Merck	38408045805
Salzsäure 37%	Riedel de Haën	30721
Na-EDTA	Riedel de Haën	27285
Tris-HCl	Merck	5196306936

Lösungen:

Die Pyrogallollösung muss an jedem Analysentag frisch hergestellt werden.

Pyrogallol-Lösung: 126,11 mg Pyrogallol + 82 µl 37 % ige Salzsäure mit destillierten Wasser auf 100ml auffüllen.

Tris-Puffer [1M]: 15,76 g Tris-HCl + 186 mg Natrium-EDTA in destilliertem Wasser lösen. Den ph-Wert mithilfe von 1N NaOH auf 8 einstellen und mit destilliertem Wasser auf 100ml auffüllen.

Hämoglobinreagenz: siehe 5.4 Hämoglobin-Bestimmung

Geräte:

UV/VIS Photometer ATI Unicam UV 4

Software : ATI Unicam Vision 2.11.

Wasserbad

Zentrifuge

pH-Meter

3.4.2.3. Durchführung

Es werden 300 µl Erythrozytensuspension mit 450 µl destilliertem Wasser verdünnt, um eine Hämolyse herbeizuführen. Von diesen 750 µl werden 500 µl entnommen und in ein Pyrexröhrchen pipettiert. Dazu fügt man 1 ml Ethanol p.a. und 600 µl Chloroform p.a.. Diese Lösung wird 60 Sekunden mittels Vortexer gemischt, 2 Minuten lang stehen gelassen und danach bei 3000 U/min zentrifugiert.

Der klare Überstand des Pyrexröhrchens wird für die anschließenden Arbeitsschritte verwendet. Es wird nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 7: Pipettierschema der SOD-Bestimmung, alle Proben + Leewerte (LW) in µl

Reagenz	LW	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
Tris-HCl-Puffer	100	100	100	100	100	100
Aqua dest.	880	840	820	780	730	680
Probe	0	20	30	50	75	100

Die Proben werden gemischt und anschließend 10 Minuten bei 25°C inkubiert. Erst unmittelbar vor jeder Messung werden 20 µl Pyrogallol-Lösung zu der Probe gegeben, diese wird gut gemischt und sofort in das Photometer gestellt. Der Extinktionsverlauf wird bei 320 nm über 2 Minuten gemessen, dabei wurden Halbmikroküvetten (1cm Schichtdicke) verwendet.

Die Ermittlung der Hämoglobinkonzentration wird im Kapitel 3.5. beschrieben.

Messparameter:

Wellenlänge: 320 nm

Messtemperatur: 25 °C

Messzeit: 180 s

3.4.2.4. Auswertung

Die SOD- Aktivität wird durch lineare Regression aus den sechs unterschiedlichen Probenkonzentrationen ermittelt. Aus der $\Delta E/\text{min}$ wird eine Konzentrations-gerade erstellt. Die Probenmenge x [ml], bei der eine 50%ige Hemmung der Pyrogallolautoxidation auftritt, wird mithilfe der allgemeinen Geradengleichung ermittelt.

$$y = k \cdot x + d$$

$y = (\Delta E/\text{min})/2$ des Probenleerwerts

k = Steigung der Konzentrationsgeraden einer Probe

x = Probenmenge bei 50%iger Hemmung der Pyrogallolautoxidation

d = Schnittpunkt der Konzentrationsgeraden einer Probe mit der y-Achse

Die erhaltene Probenmenge x wird in folgende Formel eingesetzt:

$$A = GV / (PV \cdot x)$$

A = Enzymaktivität

GV = Gesamtvolumen = 5,6 ml

PV = Probenvolumen = 0,5 ml

x = Probenmenge bei 50%iger Hemmung der Pyrogallolautoxidation

Da der Hämoglobingehalt für die Berechnung berücksichtigt werden muss, verwendet man folgende Formel:

$$A \cdot 100 / \text{Hb [g/dl]} = U / \text{g Hb}$$

A = Aktivität der SOD

Hb = Hämoglobin, bei einem eingesetzten Probenvolumen von 100 l ist $\text{Hb [g/l]} = \text{Extinktion} \cdot 7,354$

U = Units ... Enzymmenge, bei der 50% der Pyrogallolautoxidation gehemmt werden

3.4.2.5. Überprüfung der Analysengenauigkeit

Der Intra-VK der Methode beträgt 5,14%.

Der Inter-Vk der Proben in Doppelbestimmung beträgt 3,09%.

3.4.3. Bestimmung der Katalase in Erythrozyten

3.4.3.1. Prinzip

Die Katalase ist jenes Enzym, das die Verstoffwechselung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff katalysiert.



Für die vorliegende Arbeit wurde die Bestimmungsmethode nach Aebi (1974) verwendet. Dabei wird die Wasserstoffperoxidabnahme gemessen, die proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit ist. (Aebi, 1974)

3.4.3.1. Material und Geräte

Tabelle 8: Materialien für die Katalase-Bestimmung

Reagenzien	Hersteller	Nummer
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka	71640
Wasserstoffperoxid 30%	Riedel de Haën	31642
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel de Haën	30407

Lösungen:

An jedem Analysentag muss die Wasserstoffperoxidlösung frisch hergestellt werden.

H₂O₂-Lösung [30mM]: 0,34 ml Wasserstoffperoxid (30%) mit Phosphatpuffer auf 100ml auffüllen.

Phosphatpuffer [50mM]: 4,3 g Dinatriumhydrogenphosphat in ca. 800 ml dest. Wasser lösen. Ph 7 mit NaOH einstellen und bis 1000 ml mit dest. Wasser füllen.

Hämoglobinreagenz: siehe 3.5. Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration

Geräte:

pH-Meter

UV/VIS Photometer ATI Unicam UV 4

Software : ATI Unicam Vision 2.11.

3.4.3.2. Ablauf

Es werden 100 µl Erythrozytensuspension mit 500 µl destilliertem Wasser gemischt, um eine Hämolyse zu erzielen. Kurz vor der Bestimmung wird dieses Hämolysat verdünnt, indem auf 10 µl Hämolysat 5 ml destilliertes Wasser pipettiert werden. Anschließend erfolgt das Pipettieren nach folgender Anleitung:

Tabelle 9: Pipettierschema für die Katalasebestimmung

Chemikalien	Leerwert [ml]	Probe [ml]
Phosphatpuffer	1	-
Hämolysat 1: 500	2	2
H ₂ O ₂ –Lösung	-	1

Die Proben werden gut gemischt und sofort in Quarzküvetten überführt, danach erfolgt die Messung bei 240 nm und dauert 30 Sekunden. Es wird die Extinktionsabnahme gemessen. Die Ermittlung der Hämoglobinkonzentration ist im Kapitel 3.5 erklärt.

3.4.3.3. Auswertung

Als direktes Maß für die Enzymkonzentration kann die Geschwindigkeitskonstante k , der dieser Analyse zugrunde liegenden Reaktion 1. Ordnung, herangezogen werden.

$$k = 2,3 / t * \log E_1 / E_2$$

k = Geschwindigkeitskonstante der Gesamtreaktion [s⁻¹]

t = Messzeit [s]

E_1 = Extinktion des Probenleerwerts (Zeitpunkt 0)

E_2 = Extinktion nach 30 Sekunden

Für das daraus erhaltene Ergebnis muss noch die Hämoglobin-Konzentration berücksichtigt werden. Man bekommt als Messgröße die Enzymaktivität in k/g Hb bzw I.U./g Hb.

3.4.3.4. Überprüfung der Analysengenauigkeit

Der Intra-VK der Methode ist 4,98 % und der Inter-VK aller Referenzproben beträgt 1,46 %.

3.5. Bestimmung der Hämoglobin-Konzentration

Für die finale Bestimmung der drei Enzyme SOD, Katalase und GSH-Px benötigt man die Hämoglobinkonzentration, da die Konzentration der Enzyme auf diese bezogen wird.

3.5.1. Materialien und Geräte

Folgende Reagenzien werden zur Herstellung des Hämoglobinreagenz benötigt:

Tabelle 10: Reagenzien für die Hämoglobinbestimmung

Reagenzien	Firma	Nummer
Kaliumhexacyanoferrat	Merck	4973
Kaliumcyanid	Aldrich	20781-0
Aqua dest.		

Lösungen:

Hämoglobinreagenz: 198 mg Kaliumhexacyanoferrat + 49 mg Kaliumcyanid werden in destilliertem Wasser aufgelöst und auf 1000 ml aufgefüllt.

Geräte:

UV/VIS Photometer ATI Unicam UV 4

3.5.2. Durchführung

Es werden 100 µl des Erythrozytenhämolysat mit 5 ml Hämoglobinreagenz gemischt. Diese Lösung lässt man mindestens 30 Minuten stehen, danach erfolgt die photometrische Messung bei 546 nm.

3.5.3. Auswertung

Um den Hämoglobingehalt zu berechnen wird bei einem eingesetzten Probenvolumen von 100 µl Erythrozytensuspension die erhaltene Extinktion auf den Faktor 7,354 bezogen. Das ist ein Fünftel des in der Literatur für ein Probenvolumen von 20 µl angegebenen Verdünnungsfaktors 36,77.

$$c \text{ [g/dl]} = E \cdot 7,354$$

$c \text{ [g/dl]}$ = Hämoglobin-Konzentration

E = Extinktion (gegen destilliertes Wasser gemessen)

3.5.4. Überprüfung der Analysengenauigkeit

Der Intra-VK dieser Methode beträgt 5,07%

Um die Analysengenauigkeit zu sichern wurden einzelne Proben im Doppelansatz analysiert. Dafür ist jede fünfte Probe zwei Mal gemessen worden. Für die hier angewendete Methode erhält man einen mittleren VK von 1,46%.

3.6. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe von SPSS für Windows Version 17.0. durchgeführt. Die Normalverteilung der Werte wurde mit dem

Kolgomorov-Smirnov-Test bestätigt. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem T-Test für unabhängige Stichproben geprüft.

Für Unterschiede zwischen drei oder mehr Gruppen wurde die oneway ANOVA verwendet und post hoc Unterschiede innerhalb der Gruppen wurden mit Bonferroni überprüft. Zusammenhänge zwischen zwei Variablen wurden mit dem Pearson Korrelationskoeffizient getestet und die Multiple lineare Regression (stepwise, forward) diente zur Überprüfung von Einflüssen unabhängiger Variablen auf die abhängige Variable.

Im Ergebnisteil sind alle Resultate als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung (SD) angegeben. Korrelationen wurden bei einem p-Wert <0.05 als signifikant eingestuft, und sind nachfolgen mit einem * (<0.05) oder ** (<0.001) markiert.

4. Ergebnisse

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung des Einfluss von moderat erhöhtem Bilirubins auf die Aktivitäten der antioxidativ wirkenden Enzyme SOD, KAT und GSH-Px. Es sollen mögliche Unterschiede der Enzymaktivitäten zwischen Gilbert's Syndrom und der Kontrollgruppe aufgezeigt werden. Dabei soll die Hypothese untersucht werden, ob erhöhte Serum Bilirubinwerte Einfluss auf Vorgänge des oxidativen Stresses in Zusammenhang mit den genannten Enzymen haben.

Die Aktivitätsmessung aller drei Enzyme erfolgte mittels photometrischer Messung durch Farbumschlag.

GSH-Px katalysiert in Anwesenheit von Hydroperoxiden die Reaktion von reduziertem zu oxidiertem Glutathion. Dieses wird mit der Glutathionreduktase in reduziertem Glutathion mit NADPH als Reduktionsäquivalent verstoffwechselt. Gemessen wird die Abnahme von NADPH, die der GSH-Px Aktivität proportional ist.

SOD kann die Autoxidation von Pyrogallol hemmen. Diese Eigenschaft wird bei der Analyse genutzt, indem eine durch Pyrogallol autoxidierende Lösung mit steigenden Mengen SOD-haltiger Proben versetzt wird. Man ermittelt jene Probenkonzentration, bei der die Pyrogallolautoxidation zu 50% gehemmt wird.

Die Katalase baut Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff ab. Bei der Bestimmung von KAT wird die H_2O_2 -Abnahme gemessen, die proportional zur Reaktionsgeschwindigkeit ist.

4.1. Studiencharakteristik

Nach Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien wurden 101 Personen in die Studienpopulation aufgenommen.

Tabelle 11: Studiencharakteristik bei GS und Kontrolle, (MW $\pm$ SD)

	GS	Kontrolle
Anzahl	45	39
Alter (Jahre)	33 $\pm$ 13	32 $\pm$ 12
Frauen	10	16
Männer	35	23
UCB ($\mu\text{mol/l}$)	1,9 $\pm$ 0,83	0,5 $\pm$ 0,19

Tabelle 12: Enzymaktivitäten, Alter und UCB bei Frauen und Männern, (MW $\pm$ SD)

	Männer (n=70)	Frauen (n=30)	p-Wert
GSH-Px (U/g)	24,3 $\pm$ 7,5	25,4 $\pm$ 6,1	0,460
KAT (U/g)	161,8 $\pm$ 33,4	168,5 $\pm$ 32	0,345
SOD (U/g)	2053 $\pm$ 229,7	2090 $\pm$ 254,4	0,509
Alter (Jahre)	31,1 $\pm$ 12	32,8 $\pm$ 12	0,517
UCB (μmol/l)	23,1 $\pm$ 16,1	14,3 $\pm$ 10,6	0,008**

Keines der drei Enzyme zeigt einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Geschlechts. Hingegen wurden geschlechterspezifische Unterschiede bei UCB gefunden, wobei das männliche Studienkollektiv signifikant höhere Werte (23,05 $\pm$ 16,07) als das weibliche (14,34 $\pm$ 10,65) zeigt. Auch Ergebnisse einer amerikanischen Studie zeigten signifikant höhere Serum Bilirubin Level beim männlichen Studienkollektiv als bei den Frauen [ZUCKER et al., 2004].

4.2. Unterschiede zwischen GS und Kontrolle

Tabelle 13: Enzymaktivitäten bei GS und Kontrolle, (MW $\pm$ SD)

	GS (45)	Kontrolle (39)	p-Wert
GSH-Px (U/g)	24,9 $\pm$ 7,8	24,3 $\pm$ 6,4	0,715
KAT (U/g)	160,8 $\pm$ 36,4	165,6 $\pm$ 29,6	0,505
SOD (U/g)	2042 $\pm$ 230,7	2104 $\pm$ 253,2	0,249

Zwischen GS und der Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auch in einer Studie von Bulmer et al. wurden die Enzymaktivitäten bei GS und einer Kontrollgruppe gemessen, allerdings konnte auch dort kein Unterschied gezeigt werden [BULMER et al. 2008].

Der Vergleich der Aktivitäten der GSH-Px ($24,6 \pm 7,1$ U/g) und Katalase ($163,8 \pm 33$ U/g) mit den Referenzbereichen (GSH-PX: $28,1 \pm 74,9$ U/g), (KAT: $147 \pm 18,1$ U/g) zeigt, dass die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den Referenzwerten zusammenpassen. Die SOD-Aktivität ($2064 \pm 236,3$ U/g) liegt leicht über dem Referenzbereich ($884,2 \pm 2119$ U/g) [BOGDANSKA et al., 2003].

Ursache könnte die Empfindlichkeit der Enzyme bei der Analyse aber auch andere Faktoren sein. Neben individuellen Differenzen bei der Genexpression hängt die Höhe der Enzymaktivitäten von Alter, Geschlecht, Lebensstil wie z.B. Rauchen, Stress, Ernährungsweise und Umweltfaktoren wie z.B. Autoabgase ab [ANDERSEN et al., 1997].

4.3. Einfluss von Alter und Geschlecht

Besonders Alter und Geschlecht können Einflüsse auf Studienergebnisse haben. Aufgrund unseres Alterspektrums von 20 bis 65 Jahren, wurden 2 Altersgruppen (<30 Jahre; ≥ 30 Jahre) gebildet. Eventuelle Geschlechtsunterschiede wurden ebenfalls überprüft.

Tabelle 14: Enzymaktivitätsvergleiche zwischen <30 Jährigen (n=61) und ≥ 30 Jährigen (n=39) Studienteilnehmern, (MW $\pm$ SD)

	<30 Jahre	≥ 30 Jahre	p-Wert
GSH-Px (U/g)	$24,5 \pm 6,1$	$24,8 \pm 8,6$	0,876
KAT (U/g)	$159,9 \pm 34$	$169,9 \pm 31$	0,135
SOD (U/g)	2042 ± 204	2099 ± 281	0,247

Die beiden Altersgruppen zeigen keine signifikanten Unterschiede der gesamten Enzymaktivitäten. Man kann daher annehmen, dass die Enzymaktivität im Alter für die Studienpopulation weder erhöht noch erniedrigt ist (Tabelle 15).

In der vorliegenden Arbeit partizipierten hauptsächlich Probanden im Alter von 20-40, was Einfluss auf die Höhe der Aktivität übt, da die Enzymaktivitäten mit dem Alter abnehmen können. Laut einer französischen Studie beginnt besonders ab dem 65. Lebensjahr die Abnahme der Konzentrationen der Enzyme [GUEMOURI et al., 1991]. In der vorliegenden Arbeit nahmen wenige Studienteilnehmer über 60 Jahre teil. Daher zeigt sich kaum ein Unterschied bei der Enzymaktivität zwischen den beiden Altersgruppen.

Tabelle 15: Enzymaktivitätsunterschiede zwischen männlichen und weiblichen Studienteilnehmern, (MW $\pm$ SD)

	Männer	Frauen	p-Wert
GSH-Px (U/g)	24,3 $\pm$ 7,5	25,4 $\pm$ 6,1	0,460
KAT (U/g)	161,8 $\pm$ 33,4	168,5 $\pm$ 32	0,345
SOD (U/g)	2053 $\pm$ 229,8	2090 $\pm$ 254,4	0,509

Beim Geschlechtervergleich konnten keine signifikanten Unterschiede der Enzymaktivitäten festgestellt werden.

In einer französischen Studie konnte eine signifikant höhere Aktivität der GSH-Px bei Frauen im Vergleich zu den Männern gefunden werden. Jedoch nicht bei den anderen beiden Enzymen [GUEMOURI et al., 1991]. Leicht höhere Werte konnten bei der weiblichen Studienpopulation in einer dänischen Forschungsarbeit entdeckt werden. Es wird angenommen, dass die geschlechterspezifischen Differenzen durch den gesünderen Lebenswandel der Frauen wie z.B. niedrigerer Alkoholkonsum, weniger Rauchen, gesunde Ernährung begründet ist [ANDERSEN et al., 1997]. Die Resultate lassen vermuten, dass die in dieser Arbeit vorliegenden leicht höheren, aber nicht signifikanten Enzymaktivitäten bei den Frauen einen Hinweis in diese Richtung geben.

4.4. Enzymaktivitäten bei den verschiedenen Bilirubin Tertilen

Das gesamte Studienkollektiv ist in Bilirubin-Tertilen eingeteilt worden, um Einflüsse unterschiedlicher UCB-Bereiche zu testen. Tertile 1 mit niedrigen Bilirubinwerten 0,24-0,65 mg/dl, Tertile 2 mit mittleren Bilirubinwerten 0,66-1,21 mg/dl und Tertile 3 mit hohen Bilirubinwerten 1,22-4,3 mg/dl.

Tabelle 16: Enzymaktivitäten von SOD, KAT und GSH-Px, Alter und UCB bei Bilirubin Tertilen, (MW $\pm$ SD)

	Tertile 1: 0,24-0,65 mg/dl	Tertile 2: 0,66-1,21 mg/dl	Tertile 3: 1,22-4,3 mg/dl	p-Wert (ANOVA)
UCB (μmol/l)	7,6 $\pm$ 2,0	15,4 $\pm$ 3,2	38,5 $\pm$ 12,7	0,001
Alter (Jahre)	30,6 $\pm$ 11,3	30 $\pm$ 10,5	34,4 $\pm$ 13,3	0,256
GSH-Px (U/g)	24,2 $\pm$ 6,1	25,1 $\pm$ 7,5	24,6 $\pm$ 7,1	0,859
KAT (U/g)	169 $\pm$ 29,7	161,3 $\pm$ 37	161,4 $\pm$ 32,3	0,565
SOD (U/g)	2066 $\pm$ 237,4	2082 $\pm$ 231	2042 $\pm$ 246,4	0,781

Die GSH-Px, KAT und SOD-Aktivität zeigen keine signifikanten Differenzen bei den drei Bilirubin Tertilen. Die vorliegenden Ergebnisse weisen darauf hin, dass unkonjugiertes Bilirubin wahrscheinlich keinen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Enzyme ausübt.

4.5. Unterschiede GS/K <30 mit GS/K $\geq$ 30

In diesem Kapitel werden die Unterschiede der Enzyme zwischen GS und der Kontrollgruppe bei den <30 und $\geq$ 30 jährigen Studienteilnehmern gezeigt. Es wird ein möglicher Einfluss des Alters auf die Enzymaktivitäten bei GS und Kontrolle diskutiert.

Tabelle 17: Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von Alter und Bilirubinlevel (MW $\pm$ SD)

	GS<30	K<30	GS $\geq$30	K$\geq$30	p-Wert (anova)
UCB (μmol/l)	31,7 $\pm$ 13,9	8,8 $\pm$ 3,4	34,9 $\pm$ 14,8	9,4 $\pm$ 3,1	0,00
Alter (Jahre)	24,6 $\pm$ 2,6	24,5 $\pm$ 2,2	44,8 $\pm$ 12,5	43,6 $\pm$ 10,2	0,00
GSH-Px (U/g)	24,7 $\pm$ 6,8	24,9 $\pm$ 4,8	25,2 $\pm$ 9,2	23,5 $\pm$ 8,3	0,915
KAT (U/g)	147,2 $\pm$ 3	168,5 $\pm$ 31,3	179,5 $\pm$ 33,1	161,5 $\pm$ 27,5	0,009**
SOD (U/g)	2032 $\pm$ 200	2083 $\pm$ 220	2056 $\pm$ 276	2137 $\pm$ 303	0,599

Tabelle 18: Posthoc-test der Katalase (KAT)

p-Wert (posthoc)	GS<30 Kontrolle <30	GS<30 GS $\geq$30	Kontrolle<30 Kontrolle $\geq$30	GS$\geq$30 Kontrolle $\geq$30
KAT	0,125	0,007	1,000	0,588

Die GSH-Px Aktivität zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Bei den <30 Jährigen konnte zwischen GS und Kontrolle kein Unterschied festgestellt werden, allerdings weist die GS Gruppe $\geq$ 30 Jahre eine leicht höhere (n.s.) GSH-Px Aktivität (25,2 $\pm$ 9,2) auf, als die entsprechende Kontrollgruppe (23,5 $\pm$ 8,3). Die ältere GS Gruppe (n.s.) zeigt auch gegenüber beiden jüngeren (GS und Kontrolle) die höchsten Werte. Das könnte darauf hinweisen, dass Personen mit chronisch erhöhtem Bilirubin (GS $\geq$ 30 Jahre) in der Lage sind die GSH-Px Aktivität zu erhöhen. Ob die Ursache dafür erhöhtes Bilirubin ist, müsste in weiteren Studien geklärt werden.

In einer Studie von Noriega et al. konnte der Einfluss von Bilirubin auf GSH-Px, KAT und SOD gezeigt werden. Dabei wurde eine Gruppe von Ratten mit Bilirubin supplementiert (5 mmol/kg Körpergewicht), eine andere mit 5-

Aminolävulinsäure-gruppe (ALA) und weiters gab es eine kombinierte Gruppe, der sowohl ALA als auch Bilirubin verabreicht wurde, ebenfalls wurde eine Kontrollgruppe verwendet. ALA führt im Körper zu erhöhten oxidativen Stress, wobei man testen wollte, ob Bilirubin in der Lage ist vor Oxidationsprozessen zu schützen. Die Bilirubingruppe zeigte die höchsten Enzymaktivitäten im Vergleich zu den anderen Gruppen. In der ALA-Gruppe waren die Werte signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. In der Bilirubin und ALA-Gruppe waren die Enzymaktivitäten etwas niedriger als die der Kontrollgruppe. Die Forscher ziehen aus diesen Resultaten den Schluss, dass Bilirubin vor oxidativen Schäden schützen könnte [NORIEGA G.O et al., 2003]. Die Studie zeigt den antioxidativen Einfluss von Bilirubin auf die Enzymaktivität und bestätigt das Ergebnis der vorliegenden Arbeit.

Die Enzymaktivitäten von SOD weisen keine signifikanten Unterschiede auf. Andersen et al. untersuchten 220 Personen zwischen 20 und 89 Jahren und erhielten eine Abnahme der Cu-Zn SOD einhergehend mit dem Alter. Ein Tierversuch zeigte eine hohe Konzentration an Superoxidradikalen in Rattengehirnen mit steigenden Alter, was die niedrigen Aktivitäten im Alter begründet könnte [TSAY et al., 2000]. Die genannten Studienergebnisse können in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Möglicherweise aufgrund der niedrigeren Teilnehmerzahl von älteren Personen.

Die Aktivitäten der Katalase zeigen zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede. Die ≥ 30 Jährigen der Kontrollgruppe haben einen Mittelwert von 161,51 I.U./g Hb, während die ≥ 30 Jährigen der GS-Gruppe eine Aktivität von 179,46 I. U./g Hb aufweisen, was der höchsten KAT Aktivität von allen Gruppen entspricht. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nur zwischen den GS-Gruppen < 30 und ≥ 30 Jahre gezeigt werden. Diese Unterschiede sind in Abb. 8 zu sehen. Die erhaltenen Werte für das Kontrollkollektiv ≥ 30 Jahre können durch andere Studien bestätigt werden, allerdings wurden widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur gefunden.

Im Gegensatz zu den erhaltenen Ergebnissen zeigen Studienresultate von Goth et al. einen Rückgang der Aktivität mit zunehmenden Alter, jedoch nur bei dem

männlichen Studienkollektiv und bei Messung der KAT im Serum [GOTH 1989]. Dieses Studienresultat bestätigt das in dieser Arbeit erhaltene Ergebnis der Kontrollgruppe.

In einer türkischen Forschungsarbeit sind 176 gesunde Personen zu altersbezogenen Veränderungen der Enzymaktivitäten und der Lipidperoxidation untersucht worden. Das gesamte Studienkollektiv ist in fünf Altersgruppen geteilt worden. Die älteste Gruppe (41-69 Jährigen) zeigte signifikant höhere Katalase Aktivitäten als die anderen Gruppen [INAL et al., 2001].

Im Tierversuch wurden höhere Konzentrationen an Superoxidradikalen in Rattengehirnen mit steigendem Alter festgestellt. Möglicherweise führt das zu den niedrigeren KAT und SOD Konzentrationen, die bei den ältesten Ratten gefunden wurden [TSAY et al., 2000].

Eine französische Studie mit 1782 gesunden Probanden hat bei der Altersgruppe der 65-97 Jährigen festgestellt, dass die Aktivität von KAT mit voranschreitendem Alter sank, speziell ab dem 65. Lebensjahr [GUEMOURI et al., 1991].

Andersen et al. untersuchten 220 gesunde Personen zwischen 20 und 89 Jahren und konnte keine Änderungen bei der Katalase Konzentration mit steigendem Alter feststellen.

Die Änderung der Enzymaktivitäten vor allem für KAT, aber auch für GSH-Px und SOD im Alter hängt vermutlich mit Änderungen des Stoffwechsels im Alter und mit vermehrten Oxidationsvorgängen zusammen. Die unterschiedlichen Studienergebnisse unterstreichen die Empfindlichkeit der Enzyme. [ANDERSEN et al., 1997].

Der Großteil der oben genannten Studien zeigt, dass im Laufe des Alters die Katalase Aktivität abnimmt. Diese Ergebnisse stimmen mit jenen der Kontrollgruppe überein und lassen den Schluss zu, dass erhöhtes Bilirubin zu einem Anstieg der Katalase Aktivität führen kann, da diese beim Studienkollektiv mit GS höher ist. Möglicherweise sind Personen mit Gilbert's

Syndrom besser vor oxidativer Schädigung geschützt. Der genaue Mechanismus müsste aber erst geklärt werden.

4.6. Korrelationen

4.6.1. Korrelationen mit der Glutathion-Peroxidase

4.6.1.1. GSH-Px und UCB

Die GSH-Px zeigt keine Korrelationen mit UCB bei der gesamten Studienpopulation ($r=0,013$, $p=0,902$).

4.6.1.2. GSH-Px und Triglyzeride

Tabelle 19: Korrelationen der GSH-Px mit Triglyzeriden bei GS, Kontrolle, Alter, Geschlecht, gesamter Studienpopulation (g. SP) * ($p<0,05$); ** ($p<0,01$)

	Triglyzeride	p-Wert
g. SP	-0,299**	0,003
GS	-0,304*	0,045
Kontrolle	-0,496**	0,002
<30	-0,203	0,123
≥30	-0,419**	0,009

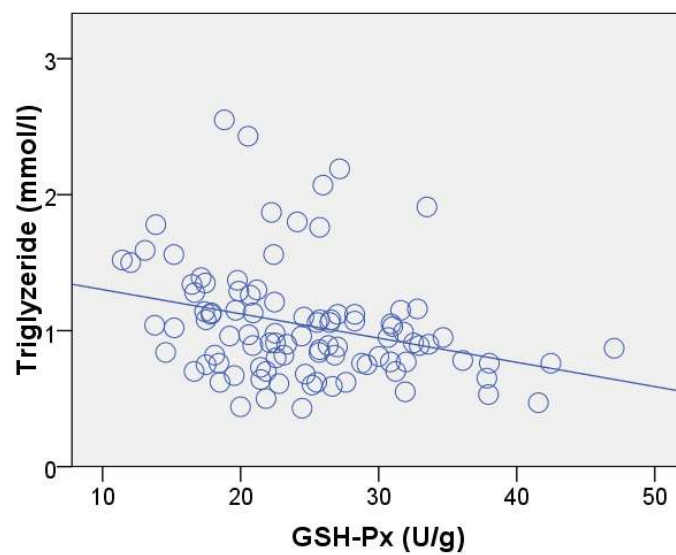


Abbildung 8: Korrelation der GSH-Px von Triglyzeriden (gesamte Studienpopulation) ($r=-0,299^{**}$, $p=0,003$)

In der vorliegenden Arbeit konnte bei der gesamten Studienpopulation, als auch bei den Subgruppen eine signifikant negative Korrelation zwischen TG und der GSH-Px beobachtet werden. Daraus kann geschlossen werden, dass bei einer Steigerung der GSH-Px Aktivität die Serumkonzentration an TG sinkt (Tabelle 19)

Mezzetti et al. konnte einen signifikanten positiven Zusammenhang zwischen der GSH-Px Aktivität und Triglyzeriden bei 40 männlichen Probanden finden. Die Verfasser vermuten, dass die erhaltene Korrelation mit der Lipidperoxidation zusammenhängt, da in anderen Studienergebnissen Zusammenhänge zwischen Lipidperoxiden, Triglyzeriden und Cholesterin gefunden werden konnte [MEZETTI et al., 1992].

Es ist daher anzunehmen, dass die GSH-Px an der Lipidperoxidation beteiligt ist um TG vor Oxidation zu schützen.

Tabelle 20: Korrelationen mit GSH-Px des gesamten Studienkollektivs (g. SP), bei GS und Kontrolle, * (p<0,05); ** (p<0,01)

	g. SP	p-Wert	GS	p-Wert	Kontrolle	p-Wert
Triglyzeride (mmol/l)	-0,299*	0,003	-0,304*	0,045	-0,496**	0,002
Chol/HDL	-0,048	0,637	0,137	0,369	-0,320*	0,050
HDL (mmol/l)	0,106	0,295	-0,011	0,944	0,358*	0,027
ox. LDL (U/l)	0,088	0,388	0,177	0,246	0,061	0,714
ox.LDL/LDL	0,157	0,121	0,084	0,583	0,306	0,062
Apolipoprotein A₁ (mg/dl)	0,086	0,397	-0,039	0,802	0,312	0,056

4.6.1.3. GSH-Px und Cholesterin/HDL-C und HDL-C

Einen signifikant negativen Zusammenhang mit dem Verhältnis aus Cholesterin/HDL-C weist die Kontrollgruppe auf, während für die GS-Gruppe keiner besteht. Der Quotient gibt Auskunft über das Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten. Je höher der Wert ist, desto eher ist die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung gegeben. High Density Lipoproteine bestehen aus einem hohen Protein- und einem geringen Cholesterinanteil. HDL-C besitzt antiatherogenes Potential und steigende Werte sind somit als positiv zu betrachten [THEWS et al., 1999].

Eine signifikant positive Korrelation der GSH-Px mit Gesamtcholesterin und LDL-C konnte in einer Studie mit 40 männlichen Probanden, die sich einer koronaren Revaskularisierung unterzogen, entdeckt werden. Weiters ist eine signifikant positive Korrelation mit HDL-C bei Messung des Blutes von der Hauptschlagader und signifikant negative nach Messung der Arterie festgestellt worden. Die Verfasser vermuten, dass der Zusammenhang der GSH-Px mit Gesamtcholesterin und LDL-C durch die Aktivität der GSH-Px gegen

Abfallprodukte der Lipidperoxidation wie organische Hydroperoxide und Hydroxyalkenale besteht. Ein möglicher Grund für die Korrelationen mit HDL-C könnte die kompensatorische Wirkung einer höheren Aktivität der GSH-Px in der Anwesenheit von geringeren HDL-Konzentrationen sein [MEZETTI et al., 1992]. Ergebnisse einer anderen Humanstudie mit 23 gesunden Personen zeigten, dass hohe Konzentrationen der GSH-Px mit niedrigeren Konzentrationen an LDL Cholesterol assoziiert sind [LUOMA et al., 1990].

Die angeführten Studien bekräftigen die Annahme, dass die GSH-Px bei der Lipidperoxidation eine wesentliche Rolle spielt. Zusammenfassend kann angenommen werden, dass die GSH-Px für die Detoxifikation der Abfallprodukte der Lipidperoxidation wie organische Hydroperoxide und Hydroxyradialkenale zuständig ist. Diese Verbindungen haben ihren Ursprung beim peroxidativen Abbau mehrfach ungesättigter Fettsäuren, wie Archidonsäure oder Linolsäure [THOMAS et al., 1990]. Vermutlich ist aufgrund der Aktivität der GSH-Px gegen diese Verbindungen eine Korrelation mit Chol/HDL-C gesehen worden. Die GSH-Px korreliert möglicherweise mit HDL-C, da die GSH-Px kompensatorisch zu HDL-C wirkt.

4.6.1.4. GSH-Px und ox LDL/LDL-C

Die GSH-Px weist keine Korrelationen mit oxidiertem LDL-C auf, jedoch eine positive Korrelation mit dem Ratio von oxidiertem LDL/LDL-C bei der Kontrollgruppe, die nicht signifikant ist.

Oxidiertes LDL-C entsteht aus LDL-C durch oxidative Veränderungen von LDL-C und ist hauptsächlich für den Transport von Cholesterin und der Cholesterinester zuständig [THEWS et al. 1999]. Oxidiertes LDL-C ist einer der Risikofaktoren für Arteriosklerose und Gefäßwandveränderungen [ASSADPOOR-PIRANFAR et al., 2009].

In einer brasilianischen Querschnittstudie mit 160 gesunden Probanden zeigten jene Personen mit hohen Konzentrationen an oxidiertem LDL-C gleichzeitig

signifikant höheren Aktivitäten der GSH-Px. Die GSH-Px war ein positiver Prädiktor für zirkulierende Konzentrationen von ox. LDL-C. Die Verfasser vermuten, dass diese Korrelation aufgrund der antioxidativen Eigenschaften der GSH-Px besteht, da es durch das oxidierte LDL-C zu einer erhöhten Bildung von ROS kommt und dadurch ein Anstieg der GSH-Px erfolgt [BARBOSA et al., 2011].

Ein Anstieg der Aktivität der GSH-Px bei Vorhandensein von ox. LDL-C in Makrophagen konnte in einer experimentellen Studie ermittelt werden. Jedoch gab es keine Änderung der Aktivität der GSH-Px bei mit LDL behandelten Makrophagen. Die Forscher erklären dieses Resultat damit, dass die Basiskonzentrationen der GSH-Px und KAT ausreichend sind um Oxidationsprodukte von LDL zu beseitigen und die erhöhten GSH-Px- und KAT-Aktivitäten durch das oxidierte LDL induziert werden, bei erhöhtem oxidativen Stress der Makrophagen [HULTÉN et al., 2005].

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich ein Anstieg der GSH-Px Aktivität, die mit einer Abnahme des Verhältnisses ox. LDL/LDL-C einhergeht. Schlussfolgernd kann durch die Resultate der Studien von Barbosa et al. und Hultén et al. die Hypothese aufgestellt werden, dass die GSH-Px beim Abbau von ox. LDL-C und dessen Oxidationsprodukten beteiligt ist. Der genaue Ablauf ist jedoch noch nicht erforscht worden.

4.6.1.5. GSH-Px und Apolipoprotein A₁

Die Kontrollgruppe zeigt einen positiven Zusammenhang mit Apolipoprotein A₁. Jeglicher Anstieg der GSH-Px führt zu einer Erhöhung der Konzentration an Apolipoprotein A₁. Bei der GS-Gruppe konnte keine signifikante Korrelation gefunden werden. Eine Zunahme der GSH-Px führt zu einer Abnahme der Apolipoproteine A₁ bei GS.

Apolipoproteine sind Proteine, die in den Lipoproteinen enthalten sind. Apolipoprotein A₁ findet man vor allem in den HDL, weshalb hohe Apolipoprotein A₁ - Werte für ein niedriges Arterienverkalkungsrisiko stehen

[KASPER et al., 2009]. In einer Humanstudie mit 23 gesunden Probanden konnten bei hohen Konzentrationen an GSH-Px niedrige Levels an Apolipoprotein B und Apolipoprotein B/A-I Ratio gefunden werden [LUOMA et al., 1990]. Die Resultate der Studie von KASPER et al. sind zu denen der Kontrollgruppe konträr.

Die GSH-Px ist stark mit der Lipidperoxidation vernetzt. Daher korreliert GSH-Px auch mit Apolipoprotein A₁. Möglicherweise hat dieser Zusammenhang auch eine Verbindung zu der Korrelation der GSH-Px mit HDL-C, da dieses aus Apolipoprotein A₁ besteht.

4.6.2. Korrelationen mit der Katalase

4.6.2.1. Katalase und UCB

Die Katalase zeigt keine Korrelation mit UCB ($r=-0,123$, $p=0,224$) beim gesamten Studienkollektiv. Jedoch herrscht bei den <30 Jährigen ein signifikant negativer Zusammenhang ($r=-0,257^*$, $p=0,046$) vor, der bei den ≥ 30 Jährigen ($r=0,039$, $p=0,814$) nicht zu finden ist.

4.6.2.2. Katalase mit Albumin und Eisen

Tabelle 21: Korrelationen von KAT mit Albumin und Eisen in allen Gruppen, * ($p<0,05$); ** ($p<0,01$)

	Albumin		Eisen	
	Signifikanz	p-Wert	Signifikanz	p-Wert
g. SP	-0,271**	0,006	-0,220*	0,029
GS	-0,365*	0,014	-0,321*	0,034

Kontrolle	-0,089	0,592	-0,095	0,566
<30 Jahre	-0,169	0,193	-0,217	0,093
≥30 Jahre	-0,363*	0,023	-0,186	0,264
Männer	-0,304*	0,010	-0,111	0,364
Frauen	-0,167	0,378	-0,431*	0,017

Die Katalase korreliert signifikant negativ mit Albumin bei GS und hoch signifikant negativ ($r=-0,486^{**}$, $p=0,004$) bei der 3. UCB Tertile. Somit ist eine Zunahme der Katalase Aktivität mit einer Abnahme der Konzentration von Albumin assoziiert, dies gilt nur für Personen mit UCB-Spiegeln $>1,22$ mg/d.

Albumin zählt zu den globulären Proteinen und kommt im Blut vor. Neben der Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks ist der Transport hydrophober Stoffe wie z.B. von Bilirubin und Hormonen die Hauptaufgabe von Albumin [THEWS et al., 1999]. Albumin besitzt selbst antioxidative Eigenschaften.

Mögliche Ursachen für den Zusammenhang der KAT mit Albumin bei Personen mit moderat erhöhtem Bilirubin sind fraglich. Fakt ist, das Albumin und KAT antioxidative Eigenschaften besitzen.

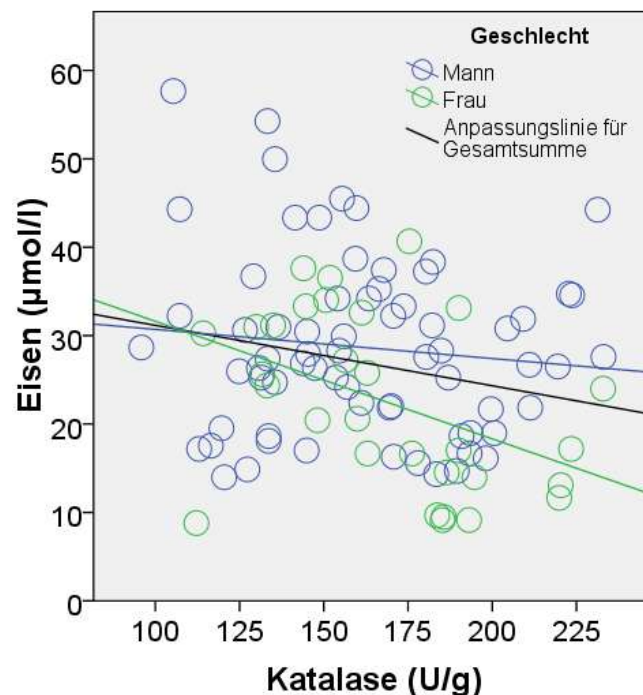


Abbildung 9: Korrelation der Katalase mit Eisen bei Männern ($r=-0,111$, $p=0,364$) und Frauen ($r=-0,431^*$, $p=0,017$).

Der Zusammenhang der KAT mit Eisen bei der weiblichen Studienpopulation kann möglicherweise durch den Mehrbedarf an Eisen in Folge der monatlichen Blutung und der niedrigeren Eisenwerte sein [COAD und CONLON, 2011]. Die Katalase ist ein eisenhaltiges Hämprotein, das aus 4 Protein-Untereinheiten besteht [VALKO et al., 2006].

Die Katalase korreliert hoch signifikant negativ mit Eisen ($r=-0,486^{**}$, $p=0,005$) bei der 3. UCB Tertile. Die Korrelation der KAT mit Eisen bei Personen mit UCB-Spiegeln $> 1,22$ mg/dl besteht vermutlich, da die Fe - Werte bei Personen mit GS erhöht sind und Eisen auch beim Katalaseaufbau beteiligt ist (siehe 2.3.3.). Alle in Tabelle 21 angeführten Korrelationen mit Eisen sind negativ, was bei einer Vermehrung der KAT zu einer Verminderung des Eisens führt. Daher ist der Schluss naheliegend, dass die Katalase das Eisen für den eigenen Aufbau benötigt und es daher bei Anstieg der Katalase sinkt.

In einer Studie von Fisher et al. konnte ein Zusammenhang zwischen Eisen und der Katalase ermittelt werden. Die Katalase-Aktivität stieg mit ansteigender Eisensupplementierung [FISHER und SCOTT 1999]. Diese Studie zeigt die Abhängigkeit der KAT-Aktivität von Eisen.

Eine türkische Fall-Kontrollstudie mit 38 gesunden und 42 Probanden mit kutaner Leishmaniose zeigt bei den Betroffenen verminderte Konzentrationen an Se, Zn, Cu und Fe. Die Aktivität der KAT war aufgrund der gesunkenen Verfügbarkeit von Eisen niedriger. Die Forscher folgern, dass ein Mangel an Fe zu einer verminderten Konzentration der Katalase führt [KOCYIGIT et al., 1998]. Einen Anstieg der SOD- und KAT-Aktivitäten bei Supplementierung mit Eisen konnte eine Forschergruppe bei *Listeria monocytogenes* ermitteln. Diese Studie untermauert die Abhängigkeit der Katalase von Eisen [FISHER et al. 1999].

In einem Tierversuch mit 40 Ratten ist die Wirkung erhöhter Konzentrationen von Eisen auf den antioxidativen Status bei Ratten untersucht worden. Die Versuchstiere sind mit zwei verschiedenen Ölen gefüttert worden. Die Aktivität der Katalase war bei jenen Tieren höher, die höhere Konzentrationen an Eisen erhielten unabhängig vom verabreichten Fett. Die Forscher vermuten, dass der Anstieg der KAT-Konzentration durch die Abhängigkeit der KAT von Eisen-Status verursacht wird [BRANDSCH et al., 2002].

Die genannten Studien untermauern den Zusammenhang der Katalase mit Eisen. Personen mit GS haben höhere Eisenkonzentrationen als die Kontrollgruppe, da das Fe beim Abbau von Hämoglobin frei wird. Möglicherweise kann das vermehrte Eisen bei Personen mit höheren UCB Spiegeln dazu dienen die Katalase-Aktivität zu erhöhen, was eine wichtige Verwertung des freiwerdenden Eisens beim Hämabbau darstellen würde.

4.6.2.3.Katalase und Folsäure

Tabelle 22: Korrelationen der Katalase mit Folsäure (Erythrozyten=Ery) der gesamten Studienpopulation (g. SP) bei den Subgruppen, * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$)

	Folsäure (Ery, ng/ml)	p-Wert
g. SP	-0,286**	0,005
GS	-0,360*	0,016
Kontrolle	-0,166	0,340
<30 Jahre	-0,320*	0,013
≥30 Jahre	0,062	0,725
Männer	-0,240	0,052
Frauen	-0,444*	0,018

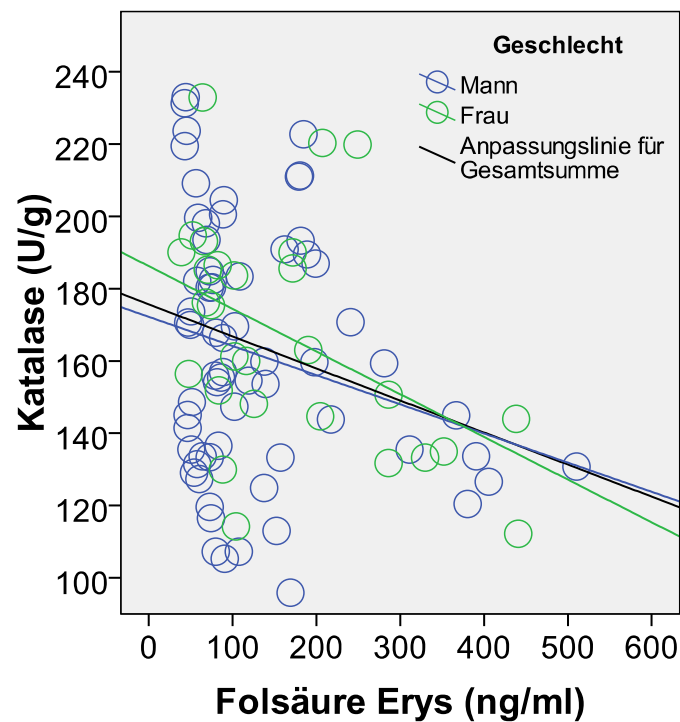


Abbildung 10: Korrelation der Katalase mit Folsäure (Erys) bei Männern ($r = -0,240$, $p = 0,052$) und Frauen ($r = -0,444^*$, $p = 0,018$)

Folsäure zählt zu den wasserlöslichen Vitaminen und ist chemisch als freie Form ein Pteroylmonoglutamat und als Nahrungsfolat ein Pteroylpolyglutamat. Sie kommt vor allem in Hülsenfrüchten, Spargel, Leber und grünem Blattgemüse vor [ELMADFA I 2003].

Die GS-Gruppe zeigt einen signifikanten negativen Zusammenhang mit Folsäure. Alle in Tabelle 22 angeführten Korrelationen der Katalase mit Folsäure sind negativ und signifikant. Das bedeutet, dass bei einer Zunahme der Folsäure gleichzeitig eine Abnahme der KAT beobachtet werden kann.

SINGH et al. beobachteten im Tierversuch einen Anstieg der KAT- und SOD-Aktivität bei jener Gruppe von Ratten die Folsäuresupplemente erhielt.

Die genannte Studie ist konträr zu den Resultaten der vorliegenden Arbeit. Eine eindeutige Erklärung für den Zusammenhang gibt es noch nicht dazu fehlen Studien.

Tabelle 23: Korrelationen von der KAT bei der gesamten Studienpopulation (g. SP), GS und Kontrolle, * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$)

	g. SP	p-Wert	GS	p-Wert	Kontrolle	p-Wert
Glutathion (mg/dl)	0,080	0,434	0,326*	0,029	-0,158	0,344

Es zeigt sich ein signifikant positiver Zusammenhang von Glutathion mit der Katalase ($r=0,326^*$, $p=0,029$). Die Katalase korreliert positiv mit Glutathion bei Personen mit Gilbert's Syndrom, die Korrelation ist in der 3 UCB Tertile am stärksten ($r=0,466^*$, $p=0,006$).

Die Korrelationen mit der Katalase und den unterschiedlichen Parametern im Plasma oder Erythrozyten können vor allem mit der GS-Gruppe in Verbindung gebracht werden, nicht aber mit der Kontrollgruppe, was möglicherweise auf die Stoffwechselunterschiede bei Personen mit GS hinweisen könnte. Die exakten Regulationsmechanismen im Stoffwechsel von Gilbert's Syndrom sind allerdings noch zu wenig erforscht.

4.6.3. Korrelationen mit der Superoxiddismutase

4.6.3.1. SOD und UCB

SOD zeigt mit UCB beim gesamten Studienkollektiv keine Korrelation ($r=-0,097$, $p=0,343$). Ein signifikant positiver Zusammenhang von SOD mit UCB zeigt sich bei der Kontrollgruppe ($r=0,354^*$, $p=0,029$). Die GS-Gruppe weist keine Korrelation auf ($r=-0,124$, $p=0,422$).

4.6.3.2. SOD und Ratio ox LDL/LDL-C

Tabelle 24: Korrelationen von SOD mit ox LDL/LDL-C, * ($p<0,05$); ** ($p<0,01$) bei der gesamten Studienpopulation (g. SP) und den Subgruppen

	Korrelation	p-Wert
g. SP	-0,324**	0,001
GS	-0,338*	0,025
Kontrolle	-0,349*	0,032
<30 Jahre	-0,172	0,186
≥30 Jahre	-0,465**	0,004
Männer	-0,374**	0,001
Frauen	-0,243	0,213

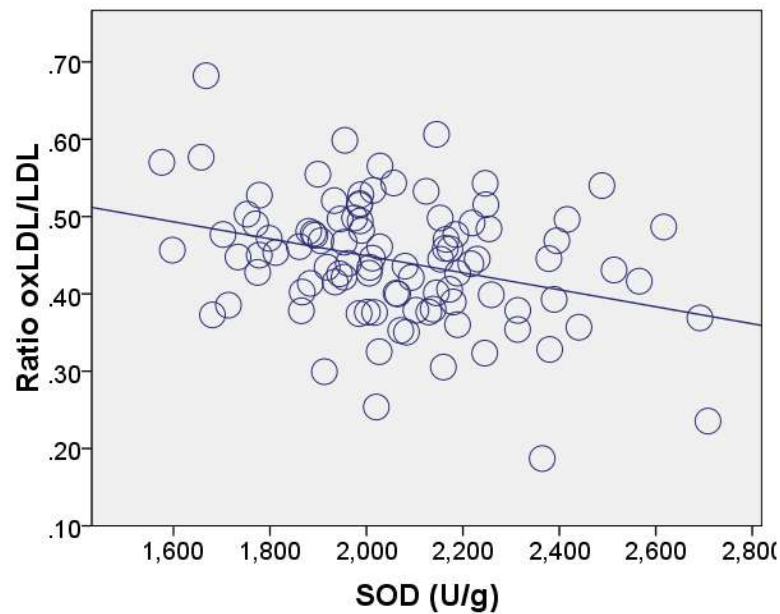


Abbildung 11: Korrelation von SOD mit ox LDL/LDL-C ($r=-0,324^{**}$, $p=0,001$)

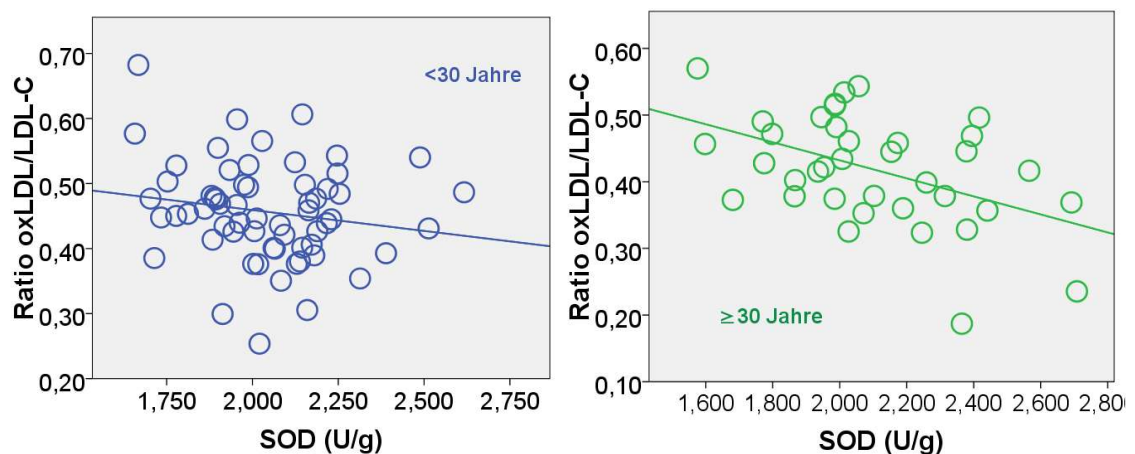


Abbildung 12: Korrelation von SOD bei den <30 ($r=-0,172$, $p=0,186$) und ≥ 30 ($r=-0,465^{**}$, $p=0,004$) Jährigen

SOD korreliert bei der 2. UCB Tertile hoch signifikant negativ ($r=-0,466^{**}$, $p=0,006$) und bei der 3. Tertile negativ ($r=-0,349^{*}$, $p=0,050$) mit dem Verhältnis von oxidierten LDL/LDL-C.

In einer iranischen Fall-Kontrollstudie ist bei 70 Probanden mit Bluthochdruck und 70 gesunden Kontrollen der Level an oxidiertem LDL-C und die Aktivität von SOD untersucht worden. Die Konzentration von SOD im Serum war in der

Kontrollgruppe höher als bei den Fällen. Die Forscher vermuten, dass aufgrund des erhöhten oxidativen Stresses bei den Fällen die Aktivität von SOD verringert ist, da SOD die erste enzymatische antioxidative Abwehr gegen oxidativen Stress und ox. LDL-C ist [ASSADPOOR-PIRANFAR et al., 2009].

In der vorliegenden Arbeit sind alle Korrelationen mit ox. LDL/LDL-C negativ assoziiert. Daraus lässt sich schließen, dass ein Anstieg von SOD gleichzeitig eine Abnahme des Verhältnisses von oxidierten LDL/LDL-C führt. Mit oxidiertem LDL-C bzw. LDL-C alleine konnten keine Zusammenhänge gefunden werden. Der Zusammenhang besteht für die gesamte Studienpopulation und ist gleichermaßen auch in GS und Kontrolle wiederzufinden. Die beiden Gruppen zeigen daher keinen Unterschied bei der Korrelation von SOD mit ox. LDL/LDL-C.

Dieses Resultat und die Folgerung von Assadpoor-Piranfar weisen darauf hin, dass SOD möglicherweise bei der Detoxifikation von oxidiertem LDL-C eine Rolle spielt. Dieser Regelkreis ist aber noch kaum erforscht und es fehlen noch aussagekräftige Humanstudien.

4.6.3.3. SOD und Lipoprotein (a)

Tabelle 25: Korrelation von SOD mit Lipoprotein (a) bei der gesamten Studienpopulation (g. SP) und den Subgruppen, * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$)

Lipoprotein (a)		
	Korrelation (r-Wert)	p-Wert
g. SP	0,237*	0,019
GS	0,335*	0,028
Kontrolle	0,136	0,415
Männer	0,369**	0,002
Frauen	-0,045	0,821

Lipoprotein (a) wird in der Leber gebildet. Es setzt sich aus LDL, welches als Proteinkomponenten Apo- (a) und Apo-B-100 enthält, zusammen. Lipoprotein (a) ist das Lipoprotein mit dem höchsten Atherosklerosepotential [THEWS et al., 1999]. Die physiologische Wirkweise von Lipoprotein (a) ist weitgehend ungeklärt. Hohe Konzentrationen von Lipoprotein (a) hängen mit einem hohen kardiovaskulären Risiko zusammen [KASPER et al., 2009].

Die Gilbert's Syndrom Gruppe zeigt einen signifikant positiven Zusammenhang mit Lipoprotein (a) ($r=0,335^*$, $p=0,028$). Dieser Zusammenhang ist stärker für Männer in der gesamten Studienpopulation ($r=0,369^{**}$, $p=0,002$). Vor allem zeigt die 3. UCB Tertile eine mittelstarke positive Korrelation von SOD mit Lipoprotein (a) ($r=0,505^{**}$, $p=0,004$).

Die Korrelationen zeigen einen Anstieg von SOD Konzentrationen bei steigenden Lipoprotein (a) Leveln, was einen Regulationsmechanismus vor allem in Personen mit erhöhten UCB Spiegeln und beim männlichen Geschlecht bedeuten kann. SOD wird aufreguliert um gegen das atherogene Potential von Lipoprotein (a) zu wirken. Möglicherweise ist der Stoffwechsel im GS eher in der Lage gegen atherosklerotische Veränderungen zu wirken, dazu bedarf es aber noch weitere Forschung, die vor allem den Mechanismus solcher Regulationssysteme im GS klärt.

Die Zusammenhänge mit den Fettstoffwechselparametern könnten durch die starke Vernetzung von SOD mit oxidativen Vorgängen im Körper, besonders bei Betrachtung der Lipide begründet sein.

Bei vorherrschender steigender Lipidperoxidation kommt es laut einer iranischen Studie zu einer verminderten SOD-Aktivität gemessen in den Erythrozyten. Dieses Ergebnis konnte bei 71 mit kardiovaskulären Krankheiten diagnostizierten und 63 gesunden Probanden gezeigt werden. Die Forscher nehmen an, dass die Abnahme der SOD Aktivität durch die steigende Anzahl an O_2^- Konzentrationen verursacht ist [KARAJIBANI et al., 2009].

Ähnliche Resultate erhielten Forscher einer türkischen Humanstudie mit 47 Probanden, von denen 13 an koronaren Herzerkrankungen (Gruppe 1) litten, 18

Bluthochdruck (Gruppe 2) hatten und 16 gesunde (Gruppe 3) Kontrollen waren. Die SOD Aktivität war bei Gruppe 1 und 2 niedriger im Vergleich zu Gruppe 3. Gruppe 2 zeigte verminderte SOD-Werte bei steigendem Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyzeriden. Es wird vermutet, dass die SOD-Aktivität durch die erhöhten Konzentrationen von O_2^- durch den vermehrten oxidativen Stress bei Gruppe 1 und 2 verursacht ist [SÖZMEN et al., 1998].

Der genaue Vorgang von SOD bei der Lipidperoxidation ist noch nicht vollständig geklärt. Man kann davon ausgehen, dass SOD eine wichtige Rolle beim Abbau von O_2^- spielt und daher bei allen oxidativen Vorgängen im Körper beteiligt ist.

4.6.3.4. SOD und MPO

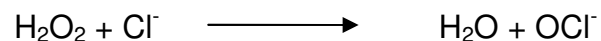
Tabelle 26: Korrelation von SOD mit MPO bei der gesamten Studienpopulation (g. SP) und den Subgruppen, * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$)

	Korrelation	p-Wert
gesamte SP	-0,250*	0,016
GS	-0,307	0,051
Kontrolle	-0,247	0,153
<30 Jahre	-0,127	0,339
≥30 Jahre	-0,394*	0,023
Männer	-0,279*	0,024
Frauen	-0,159	0,429

SOD korreliert signifikant negativ mit MPO beim gesamten Studienkollektiv ($r = -0,250^*$, $p = 0,016$), bei den ≥ 30 Jährigen ($r = -0,394^*$, $p = 0,023$), bei den Männern ($r = -0,279^*$, $p = 0,024$) und negativ bei der Studienpopulation mit GS ($r = -0,307$, $p = 0,051$).

In einer türkischen Studie mit 109 gesunden Probanden konnte ein negativer Zusammenhang von SOD und KAT mit MPO und eine signifikant positive Korrelation von MPO mit GSH-Px bei der gesamten Studienpopulation festgestellt werden. Die Forscher begründen diesen Zusammenhang damit, dass sowohl die GSH-Px, als auch MPO H_2O_2 katalysieren. Sie nehmen an, dass die Enzymaktivitäten von SOD, MPO, GSH-Px und KAT durch Hormone, Gewicht, Blutdruck beeinflusst werden. Der Grund für die Korrelation von SOD mit MPO wird nicht diskutiert [SARAYMEN et al., 2003].

Die Myeloperoxidase ist ein Enzym, das im menschlichen Körper in neutrophilen Granulozyten und Monozyten vorkommt. Es baut Wasserstoffperoxid ab z.B. mit Chlorid.



Die Superoxiddismutase katalysiert die Umwandlung des Superoxidradikals zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff [SARAYMEN et al., 2003]. Möglicherweise korreliert SOD mit MPO, da SOD die Umwandlung zu H_2O_2 katalysiert und diese Verbindung von MPO abgebaut wird.

5. Schlussbetrachtung

Zahlreiche Forschungsergebnisse belegen, dass erhöhtes Bilirubin protektiv bei Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen wirkt. Die Vermutung liegt daher nahe, dass Bilirubin als endogenes AO im Körper gegen oxidativen Stress wirkt. Die Untersuchung der antioxidativen Enzyme GSH-Px, KAT und SOD im Zusammenhang mit erhöhtem Bilirubin ist notwendig, da diese großen Einfluss auf Vorgänge des oxidativen Stresses haben.

Zwischen GS und der Kontrollgruppe gibt es keinen signifikanten Unterschied der Enzymaktivitäten von GSH-Px, KAT und SOD. Erst nach Unterteilung in die altersabhängigen Subgruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit niedrigeren Katalase Aktivitäten in der Kontrollgruppe. Die erhöhte Katalase Aktivität bei Personen mit GS deutet darauf hin, dass die Abwehrreaktion im Alter verbessert wird, wenn chronisch moderat erhöhte UCB Levels vorhanden sind.

Es konnte kein Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Aktivität der antioxidativen Enzyme GSH-Px und SOD gefunden werden.

GSH-Px zeigt negative Korrelationen mit Fettstoffwechselfparametern. Je höher die Triglyzerid Level im Serum, desto niedriger ist die Aktivität der GSH-Px, was auf einen Verbrauch der GSH-Px bei der Verhinderung der Bildung von Lipidperoxidation hinweisen könnte. Ebenso zeigt die Korrelation bei der Kontrollgruppe mit HDL-C, ox. LDL/LDL-C und Chol/HDL-C den Einfluss GSH-Px auf Fettstoffwechselfparameter, der möglicherweise durch die Aktivität des Enzyms gegen Produkte der Lipidperoxidation wie organische Hydroperoxide und Hydroxyradikale erklärt werden kann.

Bei der Katalase zeigen sich Korrelationen mit Eisen, Folsäure, Glutathion und Albumin in der GS-Gruppe. Bilirubin steht in Zusammenhang mit Eisen und Albumin im Blut, was die Korrelation gerade für GS erklären kann, da Albumin Bilirubin transportiert und Eisen beim Häm-Abbau frei wird, also vermehrt bei GS.

Ein möglicher Einfluss Bilirubins zeigt sich bei SOD aufgrund der positiven Korrelation mit Lipoprotein (a) in der GS-Gruppe und der ebenfalls positiven bei der höchsten UCB Tertile. Je höher Lipoprotein (a) desto mehr SOD-Aktivität ist zu verzeichnen. SOD korreliert mit ox. LDL/LDL-C bei der gesamten Studienpopulation, GS, Kontrolle, Männern und ≥ 30 Jährigen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass UCB und das Geschlecht keinen direkten Einfluss auf die Enzymaktivitäten haben. Allerdings konnte ein Einfluss von Bilirubin auf die Enzymaktivitäten bei den ≥ 30 Jährigen mit GS gezeigt werden.

6. Zusammenfassung

Die Durchführung der Laborarbeit erfolgte im Zuge des Projekts „Physiological relevance of Bilirubin“ am Department für Ernährungswissenschaften an der Universität Wien. Ziel dieser Arbeit war zu erforschen, ob mäßig erhöhte Serumbilirubinspiegel bei Personen mit Gilbert Syndrom verminderten oxidativen Stress, Entzündungsmarker und oxidative Schäden im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen. Diese Hypothese wurde aufgestellt, da bereits epidemiologische Studien zeigen, dass Bilirubin antioxidative Eigenschaften besitzt und vor kardiovaskulären Erkrankungen und Krebs schützen kann.

Die Studie war eine Fall-Kontroll Studie im Querschnittsdesign, die durch die Ethikkommission des Allgemeinen Krankenhauses Wien (Nr. 274/2010) genehmigt worden ist. Nach Überprüfung der Ein- und Ausschlusskriterien mittels Blutproben und Fragebögen wurden die verbleibenden Studienteilnehmer in zwei Gruppen geteilt. Die Gilbert's Syndrom-Gruppe, bestehend aus Personen mit leicht erhöhtem unkonjugierten Bilirubin ($>1\text{mg/dl}$) und die Kontrollgruppe mit Personen ohne Erkrankungen und Leberenzymen im Normalbereich.

Zur Analyse der Aktivität der antioxidativen Enzyme GSH-Px, KAT und SOD wurde eine photometrische Messung verwendet.

Die aufgestellte Hypothese, dass mäßig erhöhtes UCB generell zu einer Verbesserung der antioxidativen Enzymaktivitäten führt, konnte nicht bestätigt werden.

Allerdings konnte gezeigt werden, dass Bilirubin zu einem Anstieg der Katalase-Aktivität bei den ≥ 30 Jährigen führt. Was bedeutet, dass chronisch erhöhte UCB-Level zu einer Verbesserung der AO-Aktivität im Körper führen. Die Zusammenhänge der KAT mit Eisen, Albumin, Folsäure und Glutathion bei der GS-Gruppe zeigt, dass möglicherweise chronisch moderat erhöhtes Bilirubin eine Wirkung auf diese hat.

Auffallend bei der GSH-Px sind die Korrelationen mit den Fettstoffwechselparametern HDL-C, Chol/HDL-C, ox.LDL/LDL-C, Apolipoprotein A₁ und den Triglyzeriden. Möglicherweise bestehen diese Zusammenhänge durch die Aktivität des Enzyms gegen Produkte der Lipidperoxidation.

Der Zusammenhang von SOD mit ox.LDL/LDL-C beim gesamten Studienkollektiv, GS, der Kontrollgruppe, der männlichen Studienpopulation und den ≥ 30 Jährigen lässt den Schluss zu, dass SOD beim Abbau von oxidiertem LDL-C eine wesentliche Rolle spielt.

Ein möglicher Einfluss moderat erhöhten Bilirubins konnte bei SOD aufgrund der positiven Korrelation mit Lipoprotein (a) in der GS-Gruppe und der 3. UCB Tertile gezeigt werden. Der Schluss ist nahe liegend, dass SOD aufreguliert wird um gegen das atherogene Potential von Lipoprotein (a) zu wirken.

Eine positive Korrelation von SOD mit MPO beim gesamten Studienkollektiv und eine negative Korrelation bei den < 30 Jährigen wurde beobachtet. Möglicherweise da SOD die Verstoffwechselung zu H₂O₂ katalysiert und dieses von MPO abgebaut wird.

Bis dato gibt es über den Einfluss von Bilirubin auf die antioxidativen Enzyme GSH-Px, KAT und SOD kaum Forschungsergebnisse. Weitere Studien, die einen möglichen Einfluss von Bilirubin auf die Aktivität der Enzyme zeigen, sind daher nötig. Die vorliegenden Ergebnisse haben bereits erhöhte Aktivität der Enzyme bei Personen mit GS ≥ 30 Jahre gezeigt. Daher wären vor allem Untersuchungen an älteren Personen notwendig, bei denen es altersbedingt zu erhöhtem oxidativen Stress kommen kann.

7. Summary

The thesis at hand was carried out in the course of the project “Physiological relevance of Bile Pigments” at the Department of Nutritional Sciences of the University of Vienna. The focus of this work was to evaluate if a moderately increased level of serum bilirubin from subjects with Gilbert’s Syndrom leads to less oxidative stress, inflammatory markers and oxidative stress in comparison to a control group. This hypothesis was established on the basis of existing epidemiological studies that show that bilirubin possesses antioxidative properties and can protect against cardiovascular diseases and cancer.

This study was a cross sectional case-control study, which was approved by the Ethics Committee of the Vienna General Hospital (Nr. 274/2010). After validation of the inclusion- and exclusion criteria based on blood samples and questionnaires the study participants were separated into two groups. The Gilbert’s Syndrom group, consisting of individuals with light increased unconjugated bilirubin ($>1\text{ mg/dl}$) and the control group with subjects of less than 1 mg/dl Bilirubin, no diseases and liver enzymes in the normal range.

The analysis of the activity of the antioxidative enzymes GSH-Px, CAT and SOD was carried out using photometric measurement.

The hypothesis that moderate increased UCB improve the antioxidative enzyme activity couldn’t be confirmed.

However, it could be proven that bilirubin is linked to increases catalase (CAT) activity in the group of the ≥ 30 years old participant’s. This means that chronic increased UCB-levels lead to an improved AO-activity. The link of CAT with iron, albumin, folic acid and glutathione show that possibly chronic moderate elevated bilirubin has an effect on these parameters.

Remarkable are the correlations of GSH-Px with the fat metabolism parameters HDL-C, Chol/HDL-C, ox.LDL/LDL-C, apolipoprotein A₁ and the triglycerides. It might be the case that these correlations exist due to a link with lipid oxidation products.

The link between SOD and the ratio of oxidized LDL/LDL-C of the whole population group, GS, the control group, the male and the ≥ 30 year old participants leads to the conclusion that SOD plays a crucial role during the detoxification of oxidized LDL.

A possible influence of moderate increased bilirubin could exist due to the positive correlation with lipoprotein (a) in the GS-group and the 3. UCB tertile. It could be concluded that increased SOD act against the atherogenic potential of lipoprotein (a).

Another positive correlation could be observed between SOD and MPO in the whole study population and a negative correlation of the < 30 years old participants. This might be due since SOD catalyses the formation of H_2O_2 , which is reduced by MPO.

There are almost no results in literature on the influence of bilirubin on the antioxidative enzymes GSH-PX, CAT and SOD. For that reason further studies in this field would be necessary. The present findings of this work show an increased activity of the enzymes of subjects with GS ≥ 30 years. Therefore further studied on elderly persons, which have an age related increase in oxidative stress are needed.

8. Literaturverzeichnis:

AEBI H (1974): Katalase. In Methoden der enzymatischen Analyse, Vol. I [Bergmeyer, editor]. Weinheim: VCH.

AGATI G, FUSI F, PRATESI S, GALVAN P, DONZELLI G.P. Bilirubin photoisomerization products in serum and urine from a Crigler-Najjar type I patient treated by phototherapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 1998; 47: 181-189.

AJEIGBE K.O, OLALEYE S.B, OLADEJO E.O, OLAYANJU A.O. Effect of folic acid supplementation on oxidative gastric mucosa damage and acid secretory response in the rat. *Indian Journal of Pharmacology* 2011.

ANDERSEN H.R, NIELSEN J.B, NIELSEN F, GRANDJEAN P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry* 1997; 43:4:562-568.

ASAD S F, SINGH S, AHMAD A, KAHN N U, HADI S M. Prooxidant and antioxidant activities of bilirubin and its metabolic precursor biliverdin: a structure–activity study. *Chemico-Biological Interactions* 137; 2001: 59–74.

ASSADPOOR-PIRANFAR M, AMIR-HAMZEH P, BEYRANVAND M-R. Measurement of Oxidized Low-Density Lipoprotein and Superoxide Dismutase Activity in Patients with Hypertension. *Arch Iranian Med* 2009; 12 (2): 116-120.

APEL K, HIRT H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004; 55:373–99.

BARBOSA K.B, VOLP A.C, HERMSDORFF H.H, NAVARRO-BLASCO I, ZULET M.A, MARTINEZ J.A, BRESSAN J. Relationship of oxidized low density lipoprotein with lipid profile and oxidative stress markers in healthy young adults: a translational study. *Lipids Health Dis* 2011; 10:61.

BERTRAM F. Felsher, M.D., David Rickard, Allan G. Redeker, M.D. The Reciprocal Relation between Caloric Intake and the Degree of

Hyperbilirubinemia in Gilbert's Syndrome The New England Journal of Medicine 1970; 283:170-172.

BEUTLER E. Glutathion peroxidase. In Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. New York: Grune and Stratton 1984.

BOGDANSKA J.J, KORNETI P, TODOROVA B. Erythrocyte superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in healthy male subjects in Republic of Macedonia. Bratisl Lek Listy 2003; 104(3): 108-114.

BRIGELIUS-FLOHÉ R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Radical Biology and Medicine 1999; 27, 9/10:951-965.

BRANDSCH C, RINGSEIS R, EDER K. High Dietary Iron Concentrations Enhance the Formation of Cholesterol Oxidation Products in the Liver of Adult Rats Fed Salmon Oil with Minimal Effects on Antioxidant Status. The Journal of Nutrition 2002; 132: 2263-2269.

OGNJANOVIC B.I, MARKOVIC S.D, DORDEVIC N.Z, TRBOJEVIC I.S, STAJN A.S, SAICIC Z.S. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. Reproductive Toxicology 29 2010; 191-197.

BURCHEL B, HUME R. Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome, Journal of Gastroenterology and Hepatology 1999; 14: 960-966.

BURCKHARD H. Neugeborenen-Ikterus und Stillen, 1330 -1335, 2002 URL:<http://www.frauenarzt.de/1/2002PDF/02-11-pdf/2002-11-przyrembel.pdf>, (06.09.2011).

BULMER A.C, RIED K, COOMBES J.S, BLANCHFIELD J.T, TOTH I, WAGNER K.H. The anti-mutagenic and antioxidant effects of bile pigments in the Ames Salmonella test. Mutation Research 2007; 629:122-132.

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: 390–396.

CHU F. F, DOROSHOW J. H, ESWORTHY R. S. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular seleniumdependent glutathione peroxidase, GSH-Px-GI. *J. Biol. Chem* 1993; 268: 2571–2576.

COAD J, CONLON C. Iron Deficiency in women: assessment, causes and consequences. *Clin Nutr Metab Care* 2011.

DACH (2000). Vitamin C. Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Frankfurt am Main: Umschau Braus Verlag 137,140.

DEL BOCCIO G, LAPENNA D, PORRECA E, PENNELLI A, SAVINI F, RICCI F, CUCCURULLO F. Aortic antioxidant defence mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1990; 81/2: 127-135.

ELMADFA I. u LEITZMANN C. Ernährung des Menschen, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 4.Auflage, 2004; 267,268, 301, 302, 306, 316, 411,412, 326-331.

ELMADFA I.: Ernährungslehre, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, 2.Auflage, 2009; 92, 175.

FISHER C. W, SCOTT E.M. E. Effects of Iron and Selenium on the Production of Catalase, Superoxide Dismutase, and Listeriolysin O in *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 1999; 62: 1206-1209.

FUCHS J, WEBER S, PODDA M, GROTH N, HERRLING T, PACKER L, KAUFMANN R. HPLC analysis of Vitamin E isoforms in human epidermis: correlation with minimal erythema dose and free radical scavenging activity. *Free Radic Biol Med* 2003; 34(3): 330-6.

GOTH L. Effect of age, sex, and smoking on serum catalase activity. *Acta Biol Hungarica* 1989; 40(4): 395.

Grimm P, Biesalski H.K. Vitamin A: Chemie. In: Taschenatlas der Ernährung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage, 2007; 134-139.

GUEMEUN L, ARTUR Y, HERBERTH B, JEANDEL C, CUNY G, SIEST G. Biological Variability of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase, and Catalase in Blood. Clin. Chem 1991; 37/11: 1932-1937.

GULLU H, ERDOGAN D, TOK D, TOPCU S, CALISKAN M, ULUS T, MUDERRISOGLU H. High Serum Bilirubin Concentrations Preserve Coronary Flow Reserve and Coronary Microvascular Functions. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; 25: 2289-2294.

HELMUT S. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. Experimental Physiology 1997; 82: 291-295.

HORSFALL L.J, RAIT G, WALTERS K, SWALLOW D.M, PEREIRA S.P, NAZARETH I, PETERSON I. Serum Bilirubin and Risk of Respiratory Disease and Death. Jama 2011; 305(7):691-697.

HOPKINS P.N, WU L.L, HUNT S.C, JAMES B.C, VINCENT M. WILLIAMS R.R. Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. Atherosclerosis 1996; 16:250-255.

HULTÉN L.M, ULLSTRÖM C, KRETTEK A, VAN REYK D, MARKLUND S.L, DAHLGREN C, WIKLUND O. Human macrophages limit oxidation products in low density lipoprotein. Lipids in health and disease 2005; 4:6: 1-11.

INAL E M, KANBAK G, SUNAL E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. Clinica Chimica Acta 2001; 305: 75-80.

ISHIZAKA N, ISHIZAKA Y, TAKAHASHI E, YAMAKADO M. High serum Bilirubin level is inversely associated with the presence of Carotid plaque. Stroke 2001; 32:580-583.

JACOBI G, BIESALSKI H.K, GOLA U, HUBER J, SOMMER F. Oxidativer Stress und Altern. In: Kursbuch Anti Aging. Tieme Verlag, Stuttgart, 2005; 82.

JANSEN P.L.M. Diagnosis and management of Crigler Najjar-Syndrom. *European Journal of Pediatrics* 1999; 158/2: 89-94.

KAMISKAO T. What is Gilbert's syndrome? Lesson from genetic polymorphisms of UGT1A1 in Gilbert's syndrome from Asia. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2004; 19: 955-957.

KASPER H, BURGHARDT W. *Ernährungsmedizin und Diätetik*. 11. Auflage, Urban u Fischer Verlag München, 2009; 331.

KARAJIBANI M, HASHEMI M, MONTAZERIFAR F, BOLOUR A, DIKSHIT M. The Status of Glutathion Peroxidase, Superoxide Dismutase, Vitamins A, C, E and Malondialdehyde in Patients with Cardiovascular Disease in Zahedan, Southeast Iran. *J.Nutr. Sci. Vitaminol* 2009; 55:309-316.

KAZMI S. M, PLANTE R. K, VISCONTI V, TAYLOR G. R, ZHOU L, LAU C. Y. Suppression of NF kappa B activation and NF kappa B-dependent gene expression by tepoxalin, a dual inhibitor of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. *J. Cell. Biochem* 1995; 57:299–310.

KHAN M. M, MUZAMMIL S, TAYYAB S. Role of salt bridge(s) in the binding and photoconversion of bilirubin bound to high affinity site on human serum albumin. *Biochimica et Biophysica acta* 2000; 1479: 103-113.

KLINKE R., SILBERNAGL S. *Lehrbuch der Physiologie* 4.Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003; 428.

KOCYIGIT A, EREL O, GUR S. Effects of tobacco smoking on plasma selenium, zinc, copper and iron concentrations and related antioxidative enzyme activities. *Clinical Biochemistry* 2001; 34:629-633.

KOCYIGIT A, EREL O, GUREL M.S, AVCI S, AKTEPE N. Alterations of Serum Selenium, Zinc, Copper, and Iron Concentrations and Some Related Antioxidant Enzyme Activities in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Biological Trace Element Research* 1998; 65: 271-281.

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

LATSCHA H.P, KAZMEIER U. Radikale, Radikalreaktion In: Chemie für Biologen. Springer Verlag, Berlin, 3. Auflage, 2008; 400, 403, 418, 419.

LIN J-P, O'DONNELL C, SCHWAIGER J.P, CUPPLES L.A, LINGENHEL A, HUNT S.C, YANG S, KRONENBERG F. Association Between the UGT1A1*28 Allele, Bilirubin Levels, and Coronary Heart Disease in the Framingham Heart Study. Circulation 2006; 114:1476-1481.

LÖFFLER G., PETRIDES P.H., HEINRICH P.C. Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, Springer Medizin Verlag, 2007; 465, 466, 509, 510, 621-627, 676, 955, 956.

LÖFFLER G. Die Erythrocyten. In: Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Springer Verlag, 6. Auflage, Heidelberg, 2004; 542, 543.

LUBERT S. Die oxidative Phosphorylierung. In: Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, 4. Auflage, 1995; 582, 583.

LUOMA P.V, STENGÅRD J, KORPELA H, RAUTIO A, SOTANIEMI E. A, SUVANTO E, MARNIEMI J. Lipid peroxides, glutathione peroxidase, high density lipoprotein subfractions and apolipoproteins in young adults. Journal of International Medicine 1990; 227/4: 287-289.

MARKLUND S and MARKLUND G (1974): Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European Journal of Biochemistry 47, 469-474.

MATÉS J.M., PÉREZ-GÓMEZ C., NÚÑEZ DE CASTRO I. Antioxidant enzymes and human diseases. Clinical Biochemistry 1999; 32,8 : 595-603.

MEZZETTI A, LAPENNA D, CALAIORE A.M, PROITTI-FRANCESCHILLI, PORRECA E, DE CESARE D, NERI M, DI ILIO C, CUCCURULLO F. Glutathione- related enzyme activities and lipoperoxide levels in human internal

mammary artery and ascending aorta. Relations with serum lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1992; 12: 92-98.

MILLER E.R, PASTOR-BARRILUSO R, DALAL D, RLEMERSMA R.A, APPEL L.J, GUALLAR E. Meta-Analysis_ High Dosage Vitamin E Supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med*. 2005; 142: 37-46.

NEUZIL J, STOCKER R. Free and Albumin-bound Bilirubin are Efficient Co-antioxidants for α -Tocopherol, Inhibiting Plasma and Low Density Lipoprotein Lipid Peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:16712-16719.

NIKOLIC M, VRANIC D, SPIRIC A, BATAS V, NIKOLIC-KOKIC A, RADETIC P, TURUBATOVIC L, BLAGOJEVIC D.P, JONES D.R, NIKETIC V, SPASIC M.B. Could Cholesterol bound to haemoglobin be a missing link for the occasional inverse relationship between superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 348: 265-270.

NORIEGA G.O, TOMARO M.T, DEL BATLLE A.M.C. Bilirubin is highly effective in preventing in vivo δ -aminolevulinic acid-induced oxidative cell damage. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 2003; 1638 173-178.

PASTOR M-C, SIERRA C, DOLADÉ M, NAVARRO E, BRANDI N, CABRÉ E, MIRA A, SERÉS A. Antioxidant enzymes and fatty acid status in erythrocytes of Down syndrome patients. *Clinical Chemistry* 1998; 44:5: 924-929.

PAULUSMA C.C., KOOL M., BOSMA P.J., SCHEFFER G.L., BORG F., SCHEPER R.J., TYTGAT G. N.J., BORST P., BAAS F., ELFERNIK O.; A Mutation in the Human Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter Gene Causes the Dubin-Johnson Syndrome, 1997; 113-119.

REZAIAN G.R, TAHERI M, MOZAFFARI B.E, MOSLEH A.A, GHALAMBOR M.A, The salutary effects of antioxidant vitamins on the plasma lipids of healthy middle aged-to-elderly individuals: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal Med Liban*. 2002; 50: 10-13.

SARAYMEN R, KILIC E, YAZAR S, CETIN M. Influence of sex and age on the activity of antioxidant enzymes of polymorphonuclear Leukocytes in healthy Subjects. *Yonsei Medical Journal* 2003; 44: 9-14.

SEDLAK T.W, SALEH M, HIGGINSON D.S, PAUL B.D, JULURI K.R, SNYDER S.H. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *PNAS* 2009; 106:5171-5176.

SHIDFAR F, KESHAVERZ A, JALLALI M, MIRI R, ESHRAGHIAN M. Comparison of the effects of simultaneous administration of vitamin C and omega-3 fatty acids on lipoproteins, apo A-I, apo B and malondialdehyde in hyperlipidemic patients. *Int Journal Vitam Nutr Res.* 2003;73: 163-170.

SIEMS W, KRÄMER K, GRUNE T. Die wichtigsten Radikalquellen im menschlichen Körper. In: *Oxidativer Stress und Pharmaka* (Krämer K. Hrsg). Govi Verlag, 2005; 44.

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

SILVA E.L, MORIEL P, CHANG Y.H, ABDALLA D.S. Plasma antioxidant enzymes and oxidized lipoproteins in hypercholesterolemic rabbits. *Biochem Mol Biol Int* 1995; 36(3): 679-687.

SINGH R, KANWAR S.S, SOOD P.K, NEHRU B. Beneficial effects of folic acid on enhancement of memory and antioxidant status in aged rat brain. *Cell Mol Neurobiol.* 2011; 32 (1): 83-91.

SÖZMEN B, KAZAZ C, TASKIRAN D, ASLAN L, AKYOL A, SÖZMEN E.Y. Plasma Antioxidant Status and Nitrate Levels in Patients with Hypertension and Coronary Heart Disease. *Tr.Journal of Medical Sciences* 1998; 28: 525-531.

SUZY A.A, ERZURUM C. and S.C. The Regulation and Role of Extracellular Glutathione Peroxidase. *Antioxidants and Redox Signaling* 2005; 7: 72-79.

TANVETYANON T, BEPLER G. Beta-carotene in multivitamins and the possible risk of lung cancer among smokers versus former smokers: a meta-analysis and evaluation of national brands. American Cancer Society 2008; 113: 150-7.

TEMME E.H.M, ZHANG J, SCHOUTEN E.G, KESTELOOT H. Serum Bilirubin and 10- years mortality in a Belgian population. Cancer Causes and Control 2001; 12:887-894.

THEWS G., MUTSCHLER E., VAUPEL P. Ikterus und Cholestase In: Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen, 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1999; 395,396.

THEWS G., MUTSCHLER E., VAUPEL P. Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 5. Auflage, 1999; 370, 395, 396, 769.

THOMAS J.P, MAIORINO M, URSINI F, GIROTTI A.W. Protective action of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase against Membrane-damaging Lipid Peroxidation. The Journal of Biological Chemistry 1990; 265: 454-461.

TREVISAN M, BROWNE R, RAM M, MUTI P, FREUDENHEIM J, CAROSELLA A. M, ARMSTRONG D. Correlates of Markers of Oxidative Status in the General Population. American Journal of Epidemiology 2001; 154, 4: 348-356.

TSAY H-J, WANG P, WANG S-L, KU HUNG-HAI. Age-Associated Changes of Superoxide Dismutase and Catalase Activities in the Rat Brain. Journal Biomed Sci 2000; 7: 466-474.

URBAN und FISCHER: Roche Lexikon Medizin, 5. Auflage, Roche Verlag, 2003, 372, 460,1617.

VALKO M., RHODES C.J., MONCOL J., IZAKOVIC M., MAZUR M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions 2006; 160: 1–40.

VINSON J.A, JANG J. In vitro and in vivo lipoprotein antioxidant effect of a citrus extract and ascorbic acid on normal and hypercholesterolemic human subjects. *Journal Med Food* 2001; 4: 187-192.

VITEK L, JIRSA M, BRODANOVÁ M, KALÁB M, MARECEK Z, DANZIG V, NOVOTNÝ L, KOTAL P. Gilbert Syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* 2002; 160: 449-456.

WITTING PK, WESTERLUND C, STOCKER R. A rapid and simple screening test for potential inhibitors of tocopherol-mediated peroxidation of LDL lipids. *Journal of Lipid Research* 1996; 37: 853-867.

ZOPPI C.C, HOHL R, SILVA F.C, LAZARIM F.L, NETO J.M.F.A, STANCANNELI M, MACEDO V.D. Vitamin C and E Supplementation Effects in Professional Soccer Players Under Regular Training. *Journal of the International Society of Sports Nutrition* 2006; 3: 37-44.

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: 827-835.

9. Curriculum Vitae:

Persönliche Daten:

Name: Alexandra Kauril

Geburtsdatum: 18.07.1985

Heimatstadt: Wien

Ausbildung:

2004 - 2011: Studium Ernährungswissenschaften, Universität Wien

2003 - 1999: Oberstufenrealgymnasium mit Informatikzweig, De La Salle Schule Strebersdorf, Matura

1994 - 1999: Hauptschule, De La Salle Schule Strebersdorf

1990 - 1994: Volksschule, De La Salle Schule Strebersdorf

Berufserfahrung und Praktika:

07/2004 – 11/2004: Servicemitarbeiterin bei Catering – Firma, GVO Wien

10/2005 – 12/2005,

11/2006 – 12/2006: Bürokraft, BÖV Wien

5/2006 – 2/2007: Kommissioniertätigkeit, Herba Chemosan Wien

2/2008 - 2/2008: Projektmitarbeit bei ÖSES Wien, Institut EW Wien

7/2008 – 7/2008: Ferialpraktikum, Stauds Wien

9/2008 – 6/2009: Büroarbeit SHT Haustechnik AG Wien

7/2009 – 8/2009: Ferialpraktikum, RWA Raiffeisen Ware Korneuburg

9/2009 – 9/2009: Ferialpraktikum, Jomo Zuckerbäckerei Leobendorf

3/2010 – 8/2010: Ferialpraktikum, Hanreich Verlag Wien

7/2010 – 9/2010: Projektmitarbeit Bilirubin, Institut EW Wien