

## DIPLOMARBEIT

# GALLENFARBSTOFFE UND IHR ANTIOXIDATIVES POTENTIAL

*Die Bedeutung von Bilirubin und seinen Metaboliten  
für enzymatische Schutzmechanismen des menschlichen Organismus*

Angestrebter akademischer Grad

**MAGISTRA DER NATURWISSENSCHAFTEN (Mag.rer.nat.)**

Verfasserin  
Matrikel-Nummer  
Studienrichtung  
Betreuer

Mag. Katharina Theiler  
0200703  
Ernährungswissenschaften  
A.o. Univ.-Prof. Dr. Mag. Karl-Heinz Wagner

Wien, im November 2009

Ich danke allen, die mir beim Verfassen dieser Arbeit mit Rat und/oder Tat zur Seite standen!

## **INHALTSVERZEICHNIS I**

---

1.	EINLEITUNG .....	7
2.	EIN KURZER HISTORISCHER RÜCKBLICK .....	8
3.	ANTIOXIDATIVE VORGÄNGE IM MENSCHLICHEN ORGANISMUS.....	9
4.	DIE PHYSIOLOGIE DER GALLENFARBSTOFFE .....	16
5.	DAS ANTIOXIDATIVE POTENTIAL DER GALLENFARBSTOFFE UND IHRER ENZYME .....	33
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	63
7.	QUELLENVERZEICHNIS .....	65
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	75
9.	TABELLENVERZEICHNIS.....	75
10.	CURRICULUM VITAE .....	76

---

## INHALTSVERZEICHNIS II

---

1.	EINLEITUNG.....	7
2.	EIN KURZER HISTORISCHER RÜCKBLICK .....	8
3.	ANTIOXIDATIVE VORGÄNGE IM MENSCHLICHEN ORGANISMUS.....	9
3.1.	Biologische Bedeutung von oxidativem Stress .....	9
3.2.	Reaktionen des Sauerstoffs .....	10
3.3.	Antioxidantien.....	11
3.4.	Antioxidative Vertreter .....	12
3.4.1.	Endogene Antioxidantien .....	12
3.4.1.1.	Glutathion.....	12
3.4.1.2.	Bilirubin .....	12
3.4.2.	Exogene Antioxidantien.....	13
3.4.2.1.	Ascorbinsäure (Vitamin C).....	13
3.4.2.2.	Tocopherole und Tocotrienole (Vitamin E) .....	13
3.5.	Messung des anti-oxidativen Potentials .....	15
4.	DIE PHYSIOLOGIE DER GALLENFARBSTOFFE.....	16
4.1.	Chemische Grundlagen .....	16
4.2.	Plasma-Konzentration und Bioverfügbarkeit .....	18
4.2.1.	Die physiologische Bilirubin-Konzentration .....	18
4.2.2.	Regulation der Bilirubin-Konzentration .....	18
4.3.	Synthese von Bilirubin und Biliverdin.....	20
4.4.	Exkretion der Gallenpigmente beim Menschen .....	22
4.5.	Nachweis- und Analysemethoden von Gallenpigmenten im Vergleich.....	24
4.5.1.	Diazoreaktion.....	24
4.5.2.	AMES-Test .....	24
4.5.3.	Caco-2 Zellpermeabilitätstest.....	25
4.5.4.	Differenzierung mittels Cyclodextrinen .....	25
4.5.5.	Spektrometrische Bestimmung des Bilirubin .....	26
4.5.6.	Quantitative Bilirubinbestimmung mittels HPLC .....	26

---

4.6. Störungen des Bilirubin-Metabolismus.....	27
4.6.1. Erworbene Hyperbilirubinämien.....	27
4.6.1.1. Prähepatischer/Hämolytischer Ikterus.....	27
4.6.1.2. Intrahepatischer/Hepatozellulärer Ikterus.....	28
4.6.1.3. Posthepatischer Ikterus/Cholestase.....	28
4.6.1.4. Physiologischer Neugeborenenikterus.....	28
4.6.1.5. Pathologischer Neugeborenenikterus .....	29
4.6.2. Angeborene Hyperbilirubinämien.....	30
4.6.2.1. Gilbert Syndrom .....	30
4.6.2.2. Crigler-Najjar-Syndrom.....	30
4.6.2.3. Dubin-Johnson.....	31
4.6.2.4. Rotor-Syndrom.....	32
5. DAS ANTIOXIDATIVE POTENTIAL DER GALLENFARBSTOFFE UND IHRER ENZYME .....	33
5.1. Wirkmechanismen im physiologischen Normalzustand.....	33
5.1.1. Häm-Oxygenasen .....	33
5.1.1.1. Biochemische Grundlagen.....	33
5.1.1.2. Cytoprotektive Wirkungen der Häm-Oxygenase-1.....	35
5.1.1.3. Cytoprotektive Wirkungen der Häm-Oxygenase-2 .....	36
5.1.2. Schutzwirkungen des Biliverdin.....	36
5.1.3. Biliverdin Reduktase .....	37
5.1.4. Schutzwirkungen des Bilirubins.....	37
5.1.4.1. Bilirubin in seinen antioxidativ wirksamen Formen.....	38
5.1.5. Basale cytoprotektive Wirkungen der Gallenpigmente.....	40
5.1.5.1. Biliverdin und Bilirubin als generelle Cytoprotektoren .....	40
5.1.5.2. Wirkungen auf das Komplement-System .....	40
5.1.6. Protektion des Blutplasmas.....	41
5.2. Wirkmechanismen der Gallenpigmente unter pathologischen Bedingungen .....	43
5.2.1. Gallenfarbstoffe und Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	43
5.2.1.1. Basiswissen und Ätiologie .....	43
5.2.1.2. Therapeutische Bedeutung von Aspirin .....	46
5.2.1.3. Medizinisch-therapeutische Aspekte des Häm-Katabolismus.....	46
5.2.1.4. Bluthochdruck.....	51
5.2.1.5. Diabetes mellitus.....	53
5.2.1.6. Ischämie und Herzinfarkt .....	55
5.2.2. Gallenfarbstoffe und Krebs .....	56
5.2.3. Gallenfarbstoffe und Erkrankungen des Zentralen Nervensystems .....	56

5.2.3.1. <i>Plasmapherese als Therapiebestandteil</i> .....	56
5.2.3.2. <i>Pathologien des zentralen Nervensystems im Kontext mit erhöhten Gallenpigmentkonzentrationen</i> .....	58
6. ZUSAMMENFASSUNG .....	63
7. QUELLENVERZEICHNIS .....	65
8. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	75
9. TABELLENVERZEICHNIS.....	75
10. CURRICULUM VITAE .....	76

## 1. EINLEITUNG

---

Koronare Herzerkrankungen und Krebs stellen laut Todesursachenstatistik die beiden häufigsten Todesursachen in Österreich dar. Allein im Jahr 2008 waren 25% der Todesfälle auf Krebs und 44% auf koronare Herzerkrankungen zurückzuführen [Statistik Austria, 2008]. In Anbetracht dessen, dass diese beiden Erkrankungen mit oxidativen Stress im Organismus assoziiert werden, ist die Suche nach einem körpereigenen Schutzmechanismus oder zumindest einer erleichterten Prävention, sowie einivesser potentiellen Möglichkeit zur Frühprognose unabdingbar. Die ökonomischen Kosteneinsparungen im Gesundheitssystem könnten bei einer immer älter werdenden Gesellschaft enorme Ausmaße annehmen.

Gallenpigmente sind in diesem Kontext schon seit ein paar Jahren in Diskussion. Ihr mögliches antioxidatives Potential wurde schon mehrfach in diversen Studien unterschiedlicher Autoren bearbeitet, wobei sich diese Untersuchungen vor allem im Bereich der angeborenen Bilirubin-Stoffwechselstörungen bewegen [Löffler & Petrides, 2007; Roche, 1999; Kamisako & Leier, 2001; Fretzayas *et al*, 2007; Lee *et al*, 2001]. Hierbei wurde unter anderem festgestellt, dass Personen, die das Gilbert-Syndrom aufweisen, gleichzeitig auch über einen erhöhten Schutz vor Herz- und Krebserkrankungen verfügen. Des Weiteren gibt es Belege für entzündungshemmende, DNA-schützende und auch selektiv zellschützende Wirkungen von Bilirubin. Sogar die gezielte Abtötung von Krebszellen wird proklamiert [Löffler & Petrides, 2007; Hunt *et al*, 2001; Vitek *et al*, 2002].

So betrachtet, gewinnt die detaillierte Untersuchung des Bilirubin-Stoffwechsels immer mehr an Bedeutung, weshalb diese Arbeit dem Ziel gewidmet ist, die aktuellsten wissenschaftlichen Erkenntnisse auf diesem Gebiet übersichtlich zusammenzufassen.

Der erste Teil ist dabei einer einleitenden kurzen Übersicht antioxidativer Vorgänge sowie der wichtigsten daran beteiligten Substanzen gewidmet, wobei besonders die Stichworte „oxidativer Stress“ und „Antioxidantien“ im Vordergrund stehen. Der zweite große Abschnitt beschäftigt sich mit den physiologischen Grundlagen des Häm-Katabolismus bzw. dem damit verbundenen Bilirubin-Stoffwechsel. Im Zuge dessen kommt es auch zur Beschreibung diverser Nachweismethoden. Den Kern der Arbeit bildet das dritte Großkapitel, das die Diskussion des antioxidativen Potentials der Gallenfarbstoffe zum Thema hat.

## **1. EIN KURZER HISTORISCHER RÜCKBLICK**

---

Wie sehr sich Ansichten und Erkenntnisse über die Zeit hinweg verändern können, kann anhand der Bedeutung der Gallenpigmente sehr deutlich veranschaulicht werden. Während Bilirubin in traditionellen Formen der Medizin, wie etwa der Chinesischen Medizin oder der Indischen Medizin stets Heilkraft zugesprochen und demnach auch für therapeutische Zwecke eingesetzt wurde, verstand die westliche Medizin lange Zeit darunter nur ein toxisches Abfallprodukt. In den letzten 20 Jahren jedoch wurde das medizinisch-therapeutische Potential des Bilirubins immer interessanter, sodass es diesbezüglich zu einer stetig ansteigenden Zahl wissenschaftlicher Forschungsergebnisse kam [Liu et al, 2006].

In der traditionellen chinesischen Medizin reichte das Heilspektrum des Bilirubins sehr weit, wobei unterschiedliche Körpersysteme von der Verabreichung von Tiergalle profitiert haben sollen. So etwa wurden Gallenpigmente zum Beispiel bei Epilepsie, Tetanus oder Fieber eingesetzt, sowie auch als Abtreibungsmittel bzw. zur Potenzsteigerung. Bei regelmäßiger Einnahme wurden ihnen sogar lebensverlängernde und gedächtnissteigernde Wirkungen zugesprochen. Ob und inwieweit diese Auswirkungen tatsächlich durch Bilirubin allein erreicht werden konnten, ist heutzutage nicht feststellbar [Bulmer, 2008]. Jedoch ergibt sich dadurch ein äußerst interessantes Untersuchungsfeld, indem Bilirubin eine zentrale Rolle einnimmt. Besonders das Gefäßsystem und das zentrale Nervensystem stehen nachweislich unter dem positiven Einfluss der Gallenpigmente.

## **2. ANTIOXIDATIVE VORGÄNGE IM MENSCHLICHEN ORGANISMUS**

---

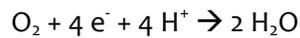
### **3.1. BIOLOGISCHE BEDEUTUNG VON OXIDATIVEM STRESS**

Oxidativer Stress ist Bestandteil aller lebenswichtigen Prozesse, wobei die Balance zwischen prooxidativen und antioxidativen Vorgängen von zentraler Bedeutung ist. Eine Imbalance führt langfristig zu Erkrankungserscheinungen, die auf Schädigungen der Zellen bzw. Gewebe basiert, wie es besonders bei kardiovaskulären Erkrankungen, Diabetes oder Krebs der Fall ist. Grundlegend kommt es durch einen solchen Stresszustand zu einem verstärkten Zelltod und Oxidationsvorgängen diverser Makromoleküle, deren Schädigung die jeweilige Krankheit und deren Ausprägung bestimmt. Insbesondere ungesättigte Fettsäuren sind hierbei gefährdet.

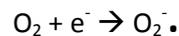
Sauerstoff spielt in diesem Zusammenhang die wesentlichste Rolle, da dieser nahezu alle Stoffwechselfvorgänge beeinflusst. Gleichzeitig handelt es sich dabei um die größte Quelle reaktiver Moleküle, die zu eben erwähnten Schäden führen können. Deshalb entwickelten sich diverse endogene Schutzsysteme, die zu einer Reduktion des oxidativen Stresses führen sollen. Zu diesen zählen Vitamine, Enzyme, Minerale wie Kupfer, Zink oder Selen, mitochondriale Proteine, sowie diverse Nahrungsmittelbestandteile (z.B. Bioflavonoide oder Carotenoide) [Stephens *et al*, 2009].

### 3.2. REAKTIONEN DES SAUERSTOFFS

Sauerstoffverbindungen weisen eine große Bandbreite an Funktionen im menschlichen Organismus auf. Eine der bedeutendsten ist jene des Sauerstoffs als ideale Elektronenfaller als Basis für die Energieerzeugung. Dies ist auf seine Position in der Redox-Skala zurückzuführen. Obwohl  $O_2$  selbst nur geringe Reaktivität zeigt und  $H_2O$  selber vollkommen inaktiv ist, sind diese beiden Moleküle an der Elektronentransportkette beteiligt:



Andererseits birgt dieses energiegenerierende System erhebliche Gefahren für den Organismus, wie zum Beispiel an der Bildung des Superoxid-Anions gezeigt werden kann. Dabei handelt es sich um eine extrem reaktive und aggressive chemische Verbindung, die immer dann auftritt, wenn ein  $O_2$ -Molekül ein einzelnes Elektron erzeugt. Das dadurch entstehende ungepaarte Elektron beschafft sich den benötigten Partner durch Angriff auf kovalente Bindungen anderer Moleküle, was in Folge zur Bildung freier Radikale führt:



In diesem Kontext sei des weiteren erwähnt, dass es mehrere mögliche Entstehungsarten des Superoxid-Anions gibt, wie etwa die Mutation der mitochondrialen DNA, die eben beschriebene Oxidation von Metaboliten mittels  $O_2$  oder aber auch durch spontane Oxidation des Hämoglobins zu Methämoglobin [Elliott & Elliott, 2001].

### 3.3. ANTIOXIDANTIEN

Antioxidantien nehmen in allen Organismen eine zentrale Rolle ein, da es sich bei ihnen um Verbindungen handelt, die den Körper gegen reaktive Sauerstoff-Moleküle schützen. Dies funktioniert, indem sie selbst oxidiert werden anstelle von funktionstüchtigen körpereigenen Stoffen [Elliott & Elliott, 2001].

Grundlegend können verschiedene Formen von Antioxidantien unterschieden werden, je nachdem, ob sie biologischen oder synthetischen Ursprungs sind bzw. ob sie hydrophile oder hydrophobe Eigenschaften aufweisen. Die Hauptaufgabe der hydrophilen Vertreter besteht darin, das Cytoplasma jeder Zelle, sowie das Blutplasma vor Oxidation zu schützen, während lipophile (d.s. hydrophobe) Antioxidantien vor allem der Inhibition von Lipidperoxidation in den Zellmembranen dienen [Sies, 1997].

Außerdem spielt die Aufnahme dieser Schutzstoffe in den Organismus eine große Rolle, da sowohl antioxidative Vertreter existieren, die mit der Nahrung aufgenommen werden müssen, als auch solche die endogen synthetisiert (d.h. nahrungs-unabhängig) werden [Vertuani *et al*, 2004].

Nachdem der Organismus permanent von freien Radikalen angegriffen wird, haben sich natürliche Barrieren gegenüber solchen antioxidativen Schädigungen entwickelt, wobei die primäre enzymatische Abwehr vorwiegend intrazellulär erfolgt. Gallenpigmente, wie das unkonjugierte Bilirubin wirken neben anderen antioxidativ wirksamen Substraten (z. B. Transferrin, Ceruloplasmin, Albumin, Harnsäure) auf extrazellulärer Ebene [Vitek *et al*, 2002].

### 3.4. ANTIOXIDATIVE VERTRETER

Die Unterscheidung zwischen hydrophilen und hydrophoben Antioxidantien stimmt nicht automatisch mit jener der Zufuhr überein. Zum Beispiel unterscheiden sich die beiden Vitamine Tocopherol/Tocotrienol und Ascorbinsäure in ihrer Löslichkeit und damit auch in ihrer Resorption aber nicht in der Zufuhr. Dem liegt zugrunde, dass die Aufnahme von Tocopherolen/Tocotrienolen eng an die Fettaufnahme gekoppelt ist, während Ascorbinsäure zu den wasserlöslichen Vitaminen zählt. (siehe Kapitel 3.4.2).

#### 3.4.1. Endogene Antioxidantien

##### 3.4.1.1. Glutathion

Bei Glutathion handelt es sich um das wichtigste Antioxidans des menschlichen Organismus, das intrazellulär aus den Aminosäuren L-Glutaminsäure, L-Cystein und Glycin synthetisiert wird. Sein antioxidatives Potential beruht auf seinem chemischen Grundgerüst, d.h. im Detail auf der Thiol-Gruppe, die dieses Cystein-hältige Peptid auszeichnet (siehe Abbildung 1). Diese Thiol-Gruppe kann reversibel oxidiert und reduziert werden. [Elmadfa, 2004].

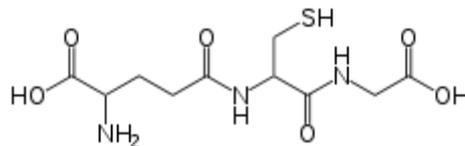


Abbildung 1 – Strukturformel von Glutathion

##### 3.4.1.2. Bilirubin

Bilirubin war ursprünglich als Abfallprodukt bekannt und wurde erst in den 1950er Jahren für wissenschaftliche Zwecke interessant. Damals wurde erstmals auf dessen antioxidative Eigenschaften aufmerksam gemacht, nachdem man seine Schutzwirkung auf Vitamin A und Carotinoide im Verdauungstrakt beobachtet hatte, sowie die Fähigkeit Bilirubins erkannte Sauerstoffradikale zu neutralisieren bzw. die Lipidperoxidation zu inhibieren [Stocker, 2004]. Im Laufe der Zeit erkannte man noch zahlreiche andere Mechanismen antioxidativer

Schutzwirkungen dieser Verbindung, auf die in den nachfolgenden Kapiteln detaillierter eingegangen wird.

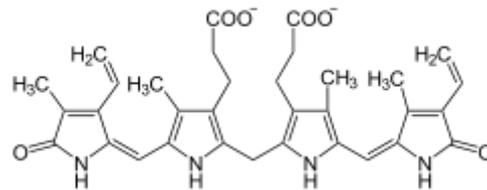


Abbildung 2 – Strukturformel von Bilirubin

### 3.4.2. Exogene Antioxidantien

#### 3.4.2.1. Ascorbinsäure (Vitamin C)

Bei Vitamin C handelt es sich um ein Monosaccharid, das sowohl pflanzlichen als auch tierischen Ursprungs sein kann, wobei der menschliche Organismus nicht in der Lage für eine Ascorbinsäure-Eigensynthese ist (chemische Struktur siehe Abbildung 3). Im Gegensatz dazu können viele Säugetiere dieses Vitamin selbst synthetisieren, sodass es nicht grundlegend als essentiell bezeichnet werden kann, sondern lediglich im Zusammenhang mit dem menschlichen Organismus [Smirnoff, 2001].

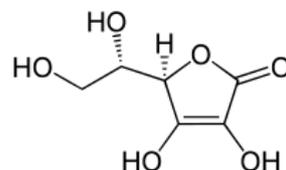


Abbildung 3 – Strukturformel der L-Ascorbinsäure

Chemisch gesehen ist Vitamin C aufgrund seiner reduzierenden Eigenschaften als Antioxidans aktiv. Es ist in der Lage reaktive Sauerstoffmoleküle zu neutralisieren, wie etwa das toxische Wasserstoffperoxid. Abgesehen davon kann es vor allem in Pflanzen die Stressresistenz erhöhen, indem Ascorbinsäure als Substrat für das Enzym Ascorbat-Peroxidase zur Verfügung steht [Padayatty *et al*, 2003].

#### 3.4.2.2. Tocopherole und Tocotrienole (Vitamin E)

Vitamin E bezeichnet streng genommen eine Gruppe von acht fettlöslichen Tocopherolen und Tocotrienolen, die über antioxidative Eigenschaften verfügen.  $\alpha$ -Tocopherol, das als eines der wichtigsten fettlöslichen Antioxidantien gilt, weist dabei die höchste Wirksamkeit

auf. Die Anzahl der Methylgruppen am Benzolring sind für die antioxidative Wirkungsweise ausschlaggebend, d.h. je mehr dieser CH<sub>3</sub>-Gruppen vorhanden sind, desto höher ist das antioxidative Potential des entsprechenden Tocopherols bzw. Tocotrienols (vergleiche Abbildung 4).

Name	Struktur der RRR-Isomere	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
α-Tocopherol		CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
β-Tocopherol		CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
γ-Tocopherol		H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
δ-Tocopherol		H	H	CH <sub>3</sub>
Name	Struktur des R-Isomers	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>
α-Tocotrienol		CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
β-Tocotrienol		CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
γ-Tocotrienol		H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
δ-Tocotrienol		H	H	CH <sub>3</sub>

Abbildung 4 – Strukturformeln der Tocopherole & Tocotrienole

Die wesentlichste Aufgabe von Vitamin E besteht im Oxidationsschutz der Zellmembranen, bei der es selbst zum α-Tocopheroxyl-Radikal oxidiert wird. Dieses wird anschließend durch andere Antioxidantien, wie Ascorbinsäure, Retinol oder Ubiquinole, wieder in seine aktive Form regeneriert [Elmadfa, 2004].

### 3.5. MESSUNG DES ANTI-OXIDATIVEN POTENTIALS

Antioxidantien befinden sich in allen Teilen des Körpers, d.h. sie können sowohl in Zellen, in Zellmembranen, als auch in extrazellulären Flüssigkeiten lokalisiert sein. Von zentraler Bedeutung ist ihre Verteilung im Organismus, sodass sie an den entsprechenden Stellen ihre Wirkung entfalten und der Bildung von Sauerstoffradikalen entgegen wirken können. Hierbei spielt vor allem Blutplasma als Transportmedium eine wesentliche Rolle [Stephens *et al*, 2009].

Die Messung einzelner Konzentrationen im Plasma oder Serum ist nur bedingt aufschlussreich, da synergistische Wirkungen zwischen Antioxidantien nicht erfasst werden. Solche Synergismen sind unter anderem Gluthation, das bei der Regeneration von Ascorbat mitwirkt oder aber auch  $\alpha$ -Tocopherol, das durch Ascorbat regeneriert wird. Demnach ist die Erfassung der gesamten antioxidativen Kapazität (TAOS) mehr aussagekräftig, wobei diese jedoch stark mit der  $F_2$ -Isoprostan-Konzentration korreliert, welches wiederum wesentlich einfacher, rascher und präziser mittels GC-MS bestimmt werden kann [Stephens *et al*, 2009]. Die Bedeutung der  $F_2$ -Isoprostan-Konzentration wird in Kapitel 5.2.1.5.3 detaillierter beschrieben.

## 4. DIE PHYSIOLOGIE DER GALLENFARBSTOFFE

### 4.1. CHEMISCHE GRUNDLAGEN

Bei den hier behandelten Gallenfarbstoffen Bilirubin, Biliverdin und dem synthetisch hergestellten Bilirubin Ditaurat handelt es sich, wie in Abbildung 5 ersichtlich, um tetrapyrrolische Dicarboxylsäuren, die der Klasse der Porphyrine zugeordnet werden. Alle drei sind in ihren Propionat-Seitenketten verestert und unter physiologischen Bedingungen weder wasser- noch wirklich fettlöslich [Broderson, 1986; Zucker *et al*, 1999], sondern lösen sich besonders gut in Dimethylsulfoxid bzw. einem wässrigen Alkalimedium [Broderson, 1986].

Bei Biliverdin handelt es sich um einen grünfärbigen nicht toxischen Stoff, der die direkte Vorstufe des Bilirubins darstellt. Physiologisch wird es im Rahmen des Hämoglobin-Abbaus gebildet. Bei Nicht-Säugetern, d.s. Reptilien, Amphibien, Vögeln und Fischen, stellt Biliverdin eines der Exkretionspigmente dar, das nicht mehr weiter metabolisiert wird [Bulmer *et al*, 2008].

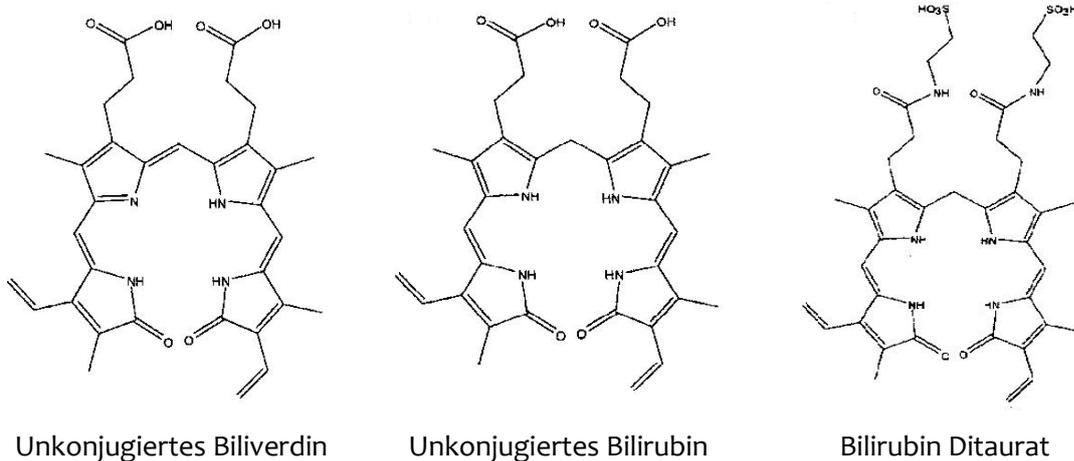


Abbildung 5 – Strukturformeln von Biliverdin, Bilirubin und Bilirubin Ditaurat [Bulmer *et al*, 2007]

Bilirubin ist im Gegensatz zum Biliverdin bei einem physiologischen pH-Wert von 7,35 - 7,45 schlecht wasserlöslich, obwohl es zwei polare Carboxylgruppen in den Propionat-Seitenketten aufweist (siehe Abbildung 5). Dies ist auf intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen zwischen diesen Carboxylgruppen und der NH-Gruppen bzw. dem

Sauerstoff der Pyrrolringe zurückzuführen. Diese hydrophoben Eigenschaften des Bilirubin bergen sowohl Vor- als auch zahlreiche Nachteile in sich. Unter die nachteiligen Wirkungen fallen neben dem zusätzlichen Metabolisierungsschritt neurotoxische Phänomene, sowie die Neigung zur Bildung von Gallensteinen. Die positive Wirkungsweise hingegen liegt in der Funktion des Bilirubin als lipophiles antioxidativ wirksames Molekül. Über diese Bedeutung wird im Kapitel 5 ausführlich diskutiert [Löffler & Petrides, 2007].

Beim Bilirubin Ditaurat handelt es sich im Gegensatz zu den beiden natürlich vorkommenden Gallenfarbstoffen um eine synthetisierte Verbindung, die dem physiologischen konjugierten Bilirubin-Diglucuronid analog ist. Diese Synthese ist nötig, da letzteres aufgrund seiner labilen Eigenschaften in-vivo sonst nicht untersuchbar wäre. Demnach kann die Untersuchung des Bilirubin Ditaurats wertvolle Ergebnisse liefern, die auf die Bioverfügbarkeit bzw. Darmpermeabilität von konjugiertem Bilirubin-Diglucuronid schließen lässt [Bulmer *et al* 2008].

## 4.2. PLASMA-KONZENTRATION UND BIOVERFÜGBARKEIT

### 4.2.1. Die physiologische Bilirubin-Konzentration

Der normale Plasmaspiegel des an Albumin gebundenen Bilirubins liegt zwischen 1,7 und 20,5  $\mu\text{mol/l}$  (0,1-1,2 mg/dl), wobei dieser sich nach der Hämoglobinmenge richtet [Löffler & Petrides, 2007; Madhavan et al, 1997]. Dadurch werden die unterschiedlichen Referenzwerte für Kinder und Erwachsene, aber auch für weiße und farbige Bevölkerungsgruppen erklärt. Grundlegend gibt es ab dem 10. Lebensjahr geschlechtsgebundene Unterschiede insofern, als dass Frauen in der Regel niedere Werte aufweisen als Männer bzw. ältere Menschen höhere als jüngere. Letzteres könnte eine Reaktion auf vermehrten oxidativen Stress im Alter darstellen [Madhavan et al, 1997; Yao et al, 2000].

Gesamt werden täglich etwa 250-300 mg Gallenfarbstoffe gebildet [Stocker, 2004; Stocker et al, 1987].

### 4.2.2. Regulation der Bilirubin-Konzentration

Die Serumkonzentration an Bilirubin wird dabei durch drei Enzyme geregelt:

- (1) Häm-Oxygenase  
wesentlicher Bestandteil der Bilirubin-Bildung
- (2) Biliverdin-Reduktase  
wesentlicher Bestandteil der Bilirubin-Bildung
- (3) Bilirubin-Uridin-Diphosphat-Glucuronosyltransferase (UGT1A1)  
Regulation der Bilirubin-Clearance via Leber und Galle

Eine potentielle Regeneration des Bilirubins mittels Biliverdin-Reduktase wird diskutiert [Schwertner & Vitek, 2008; Sedlak & Snyder, 2004]. Die Häm-Oxygenase hingegen ist das erste am Häm-Abbau beteiligte Enzym, das somit eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Konzentration von Bilirubin einnimmt. Bei Auftreten einer Hämolyse oder Gewebezerstörung wird seine Bildung durch die Anwesenheit von freiem Häm induziert, wodurch es zur Katalyse zellulärer Schutzmechanismen kommt. So betrachtet, ist die Bilirubin-

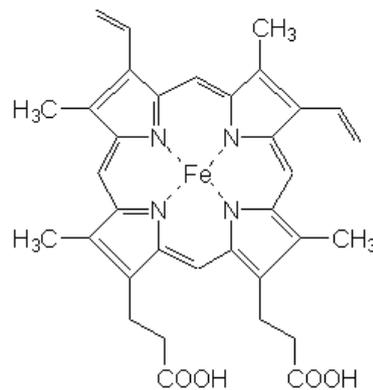
Konzentration an die jeweilig auftretende Stresssituation anpassbar [Snyder & Baranano, 2001; Colpaert et al, 2002].

Grundlegend unterliegen die beiden beschriebenen Enzyme einem feed-back-Mechanismus, d.h. die Hämoxigenase wird durch Biliverdin gehemmt, während Bilirubin die Biliverdin-Reduktase-Aktivität inhibiert.

Auch die UDP-Glukuronosyltransferase wirkt an der Regulation der Bilirubin-Konzentration mit, was besonders im Falle eines auftretenden Mangels sichtbar wird [Hunt et al, 2001]. Näheres hierzu ist in den Kapiteln 4.6.2.1 und 4.6.2.2 nachzulesen.

### 4.3. SYNTHESE VON BILIRUBIN UND BILIVERDIN

Die Gallenfarbstoffe entstehen als Zwischen- bzw. Endprodukte des Häm-Abbaus, konkret beim Abbau des nicht wiederverwertbaren Porphyringerüsts des Hämoglobins (siehe Abbildung 6) und anderer Hämproteine, wie Myoglobin, Cytochrom P450 oder der Katalase. Alle anderen Substanzen, die bei diesem katabolen Vorgang frei werden, wie diverse Aminosäuren und Eisen, können vom Organismus wieder weiterverwertet werden [Löffler & Petrides, 2007].



**Abbildung 6 – Häm-Molekül**

Dem Häm-Abbau liegt das sogenannte Monozyten-Makrophagen-System zu Grunde, in das die Organe Leber, Milz und Knochenmark involviert sind. In einer prähepatischen Phase kommt es zur oxidativen Spaltung des Porphyringerüsts zu Biliverdin, bevor dieses dann zu Bilirubin reduziert wird. Biochemisch betrachtet, sind an dieser Phase verschiedene Enzyme beteiligt. So zum Beispiel die Häm-Oxygenase, die die Spaltung des Eisenporphyrinrings des Häm an der Methinbrücke zwischen den Pyrrolringen A und B katalysiert. Bei dieser oxidativen Spaltung wird CO freigesetzt, während NADPH/H<sup>+</sup> als Reduktionsmittel zur Wasserbildung dient. Als Produkt dieser Reaktion entsteht das grüne Biliverdin IXa, das durch eine cytosolische Biliverdin-Reduktase zum Bilirubin IXa reduziert wird. Das nun gebildete Molekül weist eine rot-orange Farbe auf, die charakteristisch für Bilirubin ist. Im Rahmen dieser Reduktion wird die Methingruppe zwischen den Pyrrolringen C und D zu einer Methylengruppe umgewandelt [Löffler & Petrides, 2007; Schwertner, H.A. & Vitek, L., 2008].

Die zweite Phase findet in der Leber statt, daher der Name intrahepatische Phase. Bilirubin, das in der Milz oder dem Knochenmark gebildet wurde, muss hierfür proteingebunden in die Leber transportiert werden. Bei diesem Transportmolekül handelt es sich um Albumin, das

vor Eintritt des Bilirubins in den Hepatozyten wieder von seiner Trägersubstanz dissoziiert. Dieser Eintritt in die Leberzelle kann sowohl durch einfache Diffusion erfolgen, als auch transportervermittelt über einen Membrantransporter der OATP-Familie (*organic anion transport protein*). In der Zelle angelangt erfolgt die Bindung an intrazelluläre Trägerproteine, wie zum Beispiel Ligandin, welches das Bilirubin weiter ins endoplasmatische Retikulum transportiert. Hier kommt es zur Veresterung der Propionatreste mit Glucuronat, was in Folge zur Lösung der intramolekularen Wasserstoffbrücken führt und somit das Molekül gesamt hydrophiler macht. Die Glucuronidierung kann auch extrahepatisch erfolgen [Löffler & Petrides, 2007].

In der posthepatischen Phase gelangt das Bilirubin von der Leber in die Galle. Der Transportmechanismus beruht auf einem ATP-abhängigen Vorgang, der in das MRP2-System eingebettet ist (*multidrug resistance related protein 2; ein Anionen-Transporter*). Hierfür ist es nötig, dass Bilirubin als Mono- oder Diglucuronid vorliegt [Löffler & Petrides, 2007]. Diese Glucuronierung wird in der Leber mittels Uridindiphosphat (UDP) durchgeführt, wobei es hierfür, wie in Abbildung 7 ersichtlich ist, zwei Andockstellen gibt, die sich jeweils an den beiden Seitenkettenenden der Ringe C und D befinden, sodass es sowohl zur Bildung von Mono- als auch zur Bildung von Diglucuroniden kommen kann [Ryter & Tyrrell, 2000].

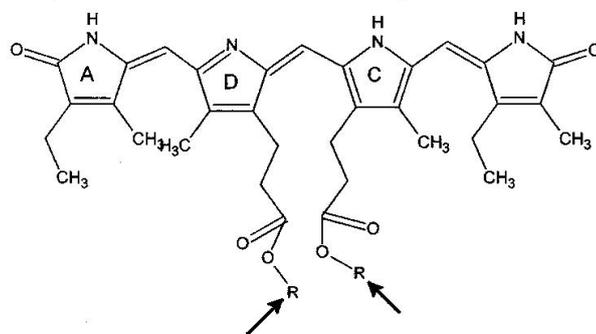


Abbildung 7 – Angriffsstellen für die Bilirubin-Glucuronierung [Ryter & Tyrrell, 2000]

#### 4.4. EXKRETION DER GALLENPIGMENTE BEIM MENSCHEN

Die Gallenfarbstoffe werden in der Galle gesammelt und bei Bedarf sezerniert, wobei sie den Dünndarm unbehelligt passieren. Bilirubin wird erst im Dickdarm durch anaerobe Bakterien weiter abgebaut. Dabei kommt es zur Abspaltung der Glucuronatreste durch die  $\beta$ -Glucuronidase, bevor die schrittweise Reduktion zum Stercobilinogen erfolgt. Die einzelnen Schritte sehen wie folgt aus:

- (1) Hydrierung der Vinylgruppen zu Ethylgruppen → Mesobilirubin
- (2) Hydrierung der Methingruppen zwischen den Ringen A und D sowie B und C zu Methylengruppen → Mesobilirubinogen

Es kommt zu Farbverlust aufgrund der Überführung von Doppel- in Einfachbindungen.

- (3) Hydrierung an den Pyrrolringen A und B → Stercobilinogen
- (4) Dehydrierung der Methylengruppe am Ring D zu einer Methingruppe → Stercobilin

Täglich kommt es durchschnittlich zu einer Ausscheidung von etwa 40-280 mg Stercobilin, wobei bedingt durch die Vernichtung der Anaerobier, wie es zum Beispiel bei einer hochdosierten oralen Antibiotikatherapie der Fall sein kann, die Ausscheidung von chemisch unverändertem Bilirubin auftreten kann. Dies wird durch Luftsauerstoff zu Biliverdin oxidiert, wodurch es zu einer grünlichen Verfärbung des Stuhls kommt.

Die normale Stuhlfarbe wird neben dem Stercobilin auch von anderen Dipyrrolen verursacht. Diese Dipyrrole entstehen, wenn Stercobilinogen durch bakterielle Enzyme weiter zerlegt wird, wie etwa Bilifuchsin.

Ein Teil der Bilirubin-Ausscheidung unterliegt einem enterohepatischen Kreislauf, d.h. etwa 20% der im Darm aus Bilirubin entstehenden Produkte werden reabsorbiert und über die Pfortader wieder der Leber zugeführt, von wo aus sie erneut ausgeschieden werden. Des Weiteren wird ein sehr geringer Anteil davon über das Blut zu den Nieren transportiert, wo es als Urobilin oder Urobilinogen im Harn nachweisbar ist. Im Falle einer Leberfunktionsstörung kommt es zu einer erhöhten Ausscheidung dieser Produkte in den Urin.

Die tägliche Ausscheidung an Gallenfarbstoffen entspricht in etwa der Menge an abgebautem Hämoglobin, da der größte Anteil des Häms im Organismus aus dem

Blutfarbstoff stammt. Hämoglobin wird täglich gebildet und wieder abgebaut, wobei beim Abbau von 1 g Hämoglobin 35 mg Bilirubin entstehen. Auf eine 70 kg schwere Person umgerechnet werden pro Tag 220 mg Bilirubin produziert. Hinzu kommen etwa 30 mg Bilirubin durch andere katabole Vorgänge, wie dem Abbau von Hämproteinen oder auch die Nebenprodukte der Hämbiosynthese. Insgesamt ergibt sich dadurch eine durchschnittliche Menge von 250 mg Bilirubin pro Tag [Löffler & Petrides, 2007].

## 4.5. NACHWEIS- UND ANALYSEMETHODEN VON GALLENPIGMENTEN IM VERGLEICH

### 4.5.1. Diazoreaktion

Bei der Diazoreaktion handelt es sich um eine der am häufigsten in der Praxis eingesetzten Methoden zum Nachweis des Bilirubins in Körperflüssigkeiten und Geweben [Zelenka *et al*, 2008]. Ihr liegt die Spaltung der Methylengruppe zwischen den Pyrrolringen C und D zugrunde, wodurch es zur Bildung und Freisetzung zweier diazotierter Dipyrrole kommt. Grundlegend ist zu bemerken, dass Bilirubinkonjugate leicht oxidierbar und somit instabil sind. Infolgedessen erfolgt diese quantitative Bestimmung über stabile Dipyrrolderivate.

Im Plasma sind zwei verschiedene Formen von Bilirubin enthalten:

(1) Direkt reagierendes/konjugiertes Bilirubin

Bei diesem handelt es sich um glucuronidiertes Bilirubin, das innerhalb weniger Minuten mit dem Diazoreagens reagiert. Sein Anteil am Gesamtbilirubin im Plasma beträgt etwa 10-20%.

(2) Indirekt reagierendes/unkonjugiertes Bilirubin

Darunter versteht sich das an Albumin gebundene Bilirubin, das in der Diazoreaktion ohne Zuhilfenahme von sogenannten „Beschleunigern“, wie z. B. Coffein-Lösung oder Alkohol, nur sehr langsam reagiert. Sein prozentualer Anteil am Gesamtbilirubin im Plasma liegt bei 80-90% [Löffler & Petrides, 2007].

### 4.5.2. AMES-Test

Der AMES-Test wird in der Regel eingesetzt um potentiell mutagene Stoff zu identifizieren. Dabei handelt es sich um eine oftmals angewandte und auch anerkannte Methode der OECD, die einfach und kostengünstig durchführbar ist [Bulmer *et al*, 2007b].

Basis des Tests sind *Salmonella*-Bakterienstämme, die spezifische Gen-Defekte aufweisen, durch die die Bakterien auf ein Histidin-hältiges Medium angewiesen sind, da die Histidin-Eigensynthese gestört wird. Durch auftretende Punktmutationen verursacht durch diverse Mutagene kann es wieder zur Aufhebung dieses Gen-Defekte kommen und die Bakterien wachsen wieder.. Dies muss bei der Auswertung bedacht und gegebenenfalls in die

Interpretation miteinbezogen werden. Häufig wird zur Empfindlichkeitserhöhung des Tests den Bakterien zusätzlich ein Defekt in ihrer Fähigkeit der DNS-Reparatur hinzugefügt, sodass diese besonders den Nachweis für DNS-schädigende Substanzen erbringen können. Die meisten hier mutagenen Substanzen weisen auch kanzerogene Eigenschaften auf und vice versa [Alberts *et al*, 2004].

#### 4.5.3. Caco-2 Zellpermeabilitätstest

Bei diesem Test handelt es sich um ein anerkanntes in-vitro Modell, mit dem die gastrointestinale Absorption direkt gemessen wird, wodurch die in-vivo Bioverfügbarkeit von zum Beispiel Gallenfarbstoffen abgeschätzt werden kann. Bulmer *et al* (2008) haben zusätzlich zur üblichen Testdurchführung die chemisch-physikalischen Eigenschaften von Gallenpigmenten verändert und so versucht, Einflussparameter zu finden, die die Bioverfügbarkeit erhöhen oder herabsetzen können.

Grundlage dieses Tests bilden die Caco-2 Zellen (*menschliches Colon Adenocarcinoma*), die in vereinfachter Form durch polarisierte Monolayer das Epithelium des Dünndarms imitieren. Diese Zellen produzieren alle wesentlichen Verdauungsenzyme und Membrantransporter, sowie auch den für den Dünndarm typischen Bürstensaum aus, sodass es zu einer realistischen Annäherung der Atmosphäre dieses Verdauungsabschnitts kommt [Bulmer *et al*, 2008]. Eine genauere Beschreibung dieses Testablaufs wird in Kapitel 5.1.5 beschrieben.

#### 4.5.4. Differenzierung mittels Cyclodextrinen

Mittels Cyclodextrinen ist eine Differenzierung zwischen Biliverdin, Bilirubin und Bilirubin Ditaurat möglich, da diese sich aufgrund ihres Dichroismus unterscheiden lassen. Biliverdin fügt sich in bestehende Komplexe der beiden Cyclodextrinformen, dem  $\beta$ -cyclodextrin und dem  $\beta$ -methyl-cyclodextrin, ein, während Bilirubin lediglich über Wasserstoffbrücken bindet. Das Bilirubin Ditaurat komplexiert ebenfalls in ähnlicher Weise wie Biliverdin ganz oder auch nur zum Teil, wobei im Gegensatz dazu die Komplexbildung zusätzlich durch Wasserstoffbrückenbildung stabilisiert wird. Bilirubin und sein Ditaurat stellen hierbei gegensätzliche Konforme dar [Goncharova & Urbanová, 2007].

#### 4.5.5. Spektrometrische Bestimmung des Bilirubin

Bilirubin in Körperflüssigkeiten wird in der Regel mittels spektrometrischer Methoden bestimmt, wobei sich jene nach Liley als Standardmethode etabliert hat. Bei dieser sogenannten Liley Chart handelt es sich um eine Tabelle, anhand derer eine fetale Hämolyse klassifiziert wird, nachdem eine Probe der amniotischen Flüssigkeit analysiert wurde. Der Schwachpunkt bei der Liley-Liste besteht darin, dass zwar die Messergebnisse standardisiert interpretiert werden können, jedoch die Datenerfassung keinerlei Standardisierung unterliegt. Demnach kommt es bei identen Proben zu unterschiedlichen Bilirubin-Werten, sodass eine Vergleichbarkeit der Methoden nicht immer gegeben ist [Halldorsdottir *et al*, 2008].

#### 4.5.6. Quantitative Bilirubinbestimmung mittels HPLC

Bei der Bilirubinbestimmung in Geweben und Flüssigkeiten handelt es sich grundlegend um eine komplizierte Aufgabe, da dieses sowohl stark licht- und sauerstoffempfindlich ist, als auch sensitiv gegenüber saurem und alkalischem Milieu. In der Praxis werden verschiedene Methoden angewandt, wie etwa Radioimmunoassay oder ELISA um zum Beispiel Bilirubin in der Cerebrospinalflüssigkeit bei Alzheimer-Patienten quantitativ zu bestimmen. Die Methode der Wahl ist üblicherweise die in Kapitel 4.5.1 beschriebene Diazoreaktion oder die in Kapitel 4.5.5 beschriebenen spektrometrischen Methoden, deren Nachteil jedoch in der bestimmbaren Konzentration liegt, da nur bereits erhöhte Bilirubinspiegel gemessen werden können. Im Gegensatz dazu erfasst eine neu eingeführte HPLC-basierte Methode auch physiologische Konzentrationsbereiche, was durch Einsatz des Mesobilirubins als Korrekturfaktor nach erfolgter Extraktion des unkonjugierten Bilirubins erreicht wird [Zelenka *et al*, 2008].

## 4.6. STÖRUNGEN DES BILIRUBIN-METABOLISMUS

Erhöhte Plasmawerte an Bilirubin, d.s. Konzentrationen an Gesamtbilirubin über 2-3 mg/dl Plasma bzw. über 34  $\mu\text{mol/l}$ , werden grundlegend als Hyperbilirubinämien bezeichnet. Charakteristisch für einen solchen Bilirubinüberschuss ist, dass ebendieses aus dem Plasma austritt und sich in den Geweben verteilt, wodurch es zur Gelbfärbung der Haut und Skleren kommt. Diese Erscheinung wird als Gelbsucht bzw. Ikterus bezeichnet und kann diverse Ursachen haben, wie etwa eine gesteigerte Bildung von Bilirubin, eine Störung der Bilirubinkonjugation oder einem Verschluss der ableitenden Gallenwege, sodass das Bilirubin nicht mehr ausgeschieden werden kann. Grundlegend wird je nach Ursache zwischen prä-, intra- und posthepatischem Ikterus unterschieden, wobei die Namensgebung analog den Phasen der Bilirubinsynthese zu verstehen ist.

In diesem Zusammenhang muss zwischen angeborenen und erworbenen Hyperbilirubinämien differenziert werden, wobei erstere durch einen genetischen Defekt entsteht, während es sich bei der erworbenen Form um einen erhöhten Erythrozyten-Abbau handelt [Löffler & Petrides, 2007].

### 4.6.1. Erworbene Hyperbilirubinämien

#### 4.6.1.1. Prähepatischer/Hämolytischer Ikterus

Beim hämolytischen Ikterus tritt ein erhöhter Erythrozyten-Abbau als Ursache der Hyperbilirubinämie auf, da die Steigerung des katabolen Vorgangs die Leberkapazität übersteigt. Im Detail bedeutet dies, dass die Leber nicht mehr in der Lage ist, das anfallende Bilirubin in ausreichendem Maße zu glucuronidieren und anschließend in die Galle auszuscheiden, sodass es schlussendlich zu einem Ansteigen des unkonjugierten Bilirubins, d.i. an Albumin gebundenes Bilirubin, im Plasma kommt [Löffler & Petrides, 2007].

Die Ursachen eines hämolytischen Ikterus können mannigfaltig sein, wobei es grundlegend zu einer vermehrten Stimulierung der Erythropoiese gekommen sein muss. Mögliche Auslöser können sein

- Genetisch bedingt durch Enzymdefekte (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase)
- Funktionsstörungen (Sichelzellenanämie)
- Hämoglobinurie

- Toxine
- Mechanische Ursachen
- Immunologische Ursachen [Silbernagl & Lang, 1998].

#### **4.6.1.2. Intrahepatischer/Hepatozellulärer Ikterus**

Hepatozellulärer Ikterus bedeutet, dass es zur Schädigung der Leberzellen, konkreter des Leberparenchyms gekommen ist, verursacht zum Beispiel durch Medikamente, Hepatitisviren oder Alkohol, sodass infolgedessen die Bilirubinausscheidung in die Gallenkapillaren inhibiert ist. Dies führt zu einer Erhöhung des konjugierten Bilirubins im Plasma und kann durch akut entzündliche Veränderungen noch verstärkt werden, da es durch eine solche Entzündung auch zu einer mechanischen Beengung der intrahepatischen Gallenwege und somit zum Gallenstau kommen kann [Löffler & Petrides, 2007; Silbernagl & Lang, 1998].

#### **4.6.1.3. Posthepatischer Ikterus/Cholestase**

Diese Form des Ikterus ist durch eine Verstopfung der ableitenden Gallenwege gekennzeichnet, sodass es zu einem Stau des Bilirubins in der Leber kommt. Da es jedoch weiterhin zur Glucuronidierung kommt, tritt infolge des Rückstaus das glucuronidierte Bilirubin in die Interzellulärspalten, die Lymphgefäße und die ableitenden Lebervenen über [Löffler & Petrides, 2007].

Eine Cholestase kann sowohl intra- als auch extrahepatischer Ursache sein. Dabei wird unterschieden, ob der Rückstau direkt in der Leber verursacht wurde, wie etwa bei einer zystischen Fibrose, Medikamenten und hohen Östrogenkonzentrationen, oder nur indirekt über Gallensteine (Cholelithiasis), Tumore, Cholangitis oder Pankreatitis [Silbernagl & Lang, 1998].

#### **4.6.1.4. Physiologischer Neugeborenenikterus**

Neugeborene weisen im Vergleich zu Erwachsenen immer eine Hyperbilirubinämie auf, wobei fast die Hälfte aller Neugeborenen in den ersten 5 Lebenstagen tatsächlich ikterisch ist. In der Regel steigt der Bilirubinspiegel Neugeborener während der ersten drei Tage von 1-2 mg/dl auf 5-6 mg/dl an und fällt anschließend im Zeitraum einer Woche wieder auf Normalwerte herab. Dies beruht darauf, dass die Leber in der Reifung ihrer Ausscheidungsmechanismen zeitlich der Bilirubinproduktion infolge des Abbaus HbF-hältiger Erythrozyten hinten nach

steht. Hiervon betroffen ist besonders der Anteil konjugierten Bilirubins im Plasma [Löffler & Petrides, 2007].

An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass diese erhöhten Bilirubin-Werte in Zusammenhang mit einem erhöhten antioxidativen Potential des Plasmas gebracht werden. Näheres hierzu wird ausführlich in Kapitel 5 diskutiert!

#### **4.6.1.5. Pathologischer Neugeborenenikterus**

Der pathologische Neugeborenenikterus tritt auf, wenn es bei einem physiologischen Ikterus zu einer stärkeren Hämolyse kommt, der unbehandelt zu irreversiblen Hirnschäden führen kann. Betroffen sind dabei bestimmte Hirnkerne, weshalb dieses Phänomen auch als Kernikterus bezeichnet wird. Dies tritt zum Beispiel bei einer Rhesus-Inkompatibilität auf, kann aber auch Folge eines zu niedrigen Geburtsgewichts, einer zystischen Fibrose oder einer anderen genetisch bedingten Erkrankung sein. Typisch für diesen Ikterus ist, dass das Blut eine zu geringe Kapazität aufweist, um die großen Mengen an freiem Bilirubin zu binden, d.h. zu wenig Albumin zur Verfügung steht [Löffler & Petrides, 2007; Kahn *et al*, 2000]. Die Bindungskapazität des Albumins für Bilirubin kann aber auch zu gering werden, wenn es zu einer verstärkten Verdrängung des Bilirubins durch andere Liganden kommt. Auch Medikamente können potentiell Ursache eines Kernikterus werden, wenn sie den Übertritt von Bilirubin durch die Blut-Hirn-Schranke erleichtern. Hierfür sind besonders die Hirndurchblutung, sowie die relative Bindungs-Affinität des Albumins und der Ziel-Neuronen im Gehirn von Bedeutung. Durch diese wird bestimmt, ob die Gewebkonzentration so hoch ansteigen kann, dass Folgeschäden auftreten [Vítek *et al*, 2002]. Diese Schäden äußern sich, sofern das Neugeborene überlebt, später in Form von geistiger Retardierung und Hörschäden [Oren, 1997].

Es gibt verschiedene Formen der Therapie, die bei erhöhten Plasmawerten (d.h. über 5 mg/dl) wirksam sind. Eine dieser Therapiearten ist die Phototherapie, bei der eine Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 400 bis 500 nm angewendet wird. Bei dieser Lichtfrequenz wird das Bilirubin photoisomerisiert und so in Lumirubin verstoffwechselt, das unkonjugiert leicht ausgeschieden werden kann [Agati *et al*, 1998]. Die Ausscheidung erfolgt nun rascher durch die entstandene erhöhte Wasserlöslichkeit des Bilirubins [Kahn *et al*, 2000]. Weitere Therapieformen bestehen in Austausch-Transfusionen bzw. in der Verabreichung von Hämoxigenasehemmern.

## 4.6.2. Angeborene Hyperbilirubinämien

### 4.6.2.1. Gilbert Syndrom

Bei diesem Syndrom handelt es sich um die häufigste autosomal vererbte Hyperbilirubinämie, die bei etwa 2% bis 12% der Bevölkerung auftritt [Iyanagi *et al*, 1998]. Sie äußert sich vorwiegend anhand des unkonjugierten Bilirubins, das Konzentrationen von bis zu 6 mg/dl Plasma erreicht, wobei das Gesamtbilirubin grundlegend nicht erhöht sein muss, sondern erst unter Belastung auffällige Konzentrationen erreicht. Solch eine Belastung kann eine Nahrungskarenz sein, aber auch Infekte oder verschiedene Medikamente sind potentielle Verursacher. Die Symptome des Syndroms äußern sich in der Regel in Form eines milden, stoßweise auftretenden gutartigen Ikterus [Löffler & Petrides, 2007].

Das zugrunde liegende Prinzip besteht in einer Mutation des Gens der UDP-Glukuronosyl-Transferase, wobei der Promotoranteil des Gens betroffen ist. Konkret handelt es sich um einen Polymorphismus des Promotors des UGT1A1-Gens, durch den die Enzymaktivität um durchschnittlich 70% vermindert wird, was als Folge eine erhöhte Konzentration an unkonjugiertem Bilirubin nach sich zieht [Hunt *et al*, 2001].

Das Gilbert-Syndrom wird aufgrund der mäßig erhöhten Bilirubin-Konzentrationen in Zusammenhang mit einer potentiell protektiven Wirkung bei kardiovaskulären Erkrankungen diskutiert. Nähere Details hierzu finden sich in den Kapiteln 5.2.1 und 5.2.1.6.

### 4.6.2.2. Crigler-Najjar-Syndrom

Ebenfalls ein genetischer Defekt des Gens für die UDP-Glukuronosyl-Transferase liegt beim Crigler-Najjar-Syndrom vor, der in diesem Fall für weitaus höhere Bilirubin-Konzentrationen im Plasma führt als beim eben beschriebenen Gilbert-Syndrom. Hierbei sind die 5 Exonregionen des Gens betroffen, wobei grundlegend zwei Typen je nach Art der Vererbung und der Restaktivität des Enzyms unterschieden werden.

- I. Typ I tritt wesentlich seltener auf als Typ II. Dabei handelt es sich um eine autosomal-rezessiv vererbte Störung, bei der die Enzymaktivität unter 1% liegt und somit rasch zu einer hochgradigen Hyperbilirubinämie führt. Die Konzentration an Bilirubin im Plasma kann bis zu 25-40 mg/dl betragen.

Die langfristig einzig effektive Therapie ist eine Lebertransplantation, sodass früher Kinder mit diesem Syndrom bereits innerhalb weniger Tage verstarben. Heutzutage werden Neugeborene mit einer Phototherapie behandelt bis ein passendes Spenderorgan gefunden ist; die maximale Wartezeit liegt bei bis zu vier Jahren, da danach auch die Lichttherapie nicht mehr ausreichend helfen kann. Die Gründe hierfür liegen vor allem in der Erhöhung der Bilirubinwerte durch die größere benötigte Erythrozytenmenge und das verringerte Verhältnis von Körperoberfläche zu Körpermasse [Agati *et al*, 1998]. Die Lebenserwartung kann heute bis zu 30 Lebensjahre erreichen.

- II. Der Typ II wird auch als Arias Syndrom bezeichnet und im Gegensatz zum Typ I autosomal-dominant vererbt. Bei dieser Störung erreichen die Plasmawerte um 6-25 mg/100 ml Plasma, sodass es sich um eine weitaus geringere Erhöhung handelt als vorhin beschrieben. Dies kommt dadurch zustande, dass das Enzym nicht gänzlich fehlt, sondern in verringerter Menge aktiv ist, d.h. die Enzymaktivität erreicht in etwa 10% der eines Gesunden.

Biochemisch betrachtet, handelt es sich hierbei um einen teilweisen Defekt des Glukuronierungssystems, da das Bilirubin vor allem in Form des Monoglukuronids ausgeschieden wird. Eine Phenobarbital-Therapie stimuliert die Enzyminduktion, sodass ein normales Leben geführt werden kann, ohne störende Nebenwirkungen und Symptome [Löffler & Petrides, 2007].

Problematisch ist in beiden Fällen die Diagnose, da hohe Bilirubin-Plasmawerte in den ersten drei Lebensmonaten kein eindeutiger Indikator für das eine oder das andere Syndrom darstellt. Die Leberfunktion ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollends ausgereift und kann sich somit noch ändern. Für eine eventuell notwendige Transplantation wäre eine rasche Diagnose jedoch absolut notwendig [Lee *et al*, 2001].

#### **4.6.2.3. Dubin-Johnson**

Hierbei handelt es sich um eine seltene Krankheit, bei der eine Störung des Stoffwechsels vorliegt. Die Vererbung erfolgt autosomal-rezessiv. Betroffen ist ein Gen, das für MRP-2 codiert, sodass es infolgedessen zu einer gestörten Ausscheidung des Bilirubins in die Galle kommt. Dies bedingt eine Ansammlung an konjugiertem Bilirubin in den Leberzellen, was

schlussendlich mit einem Gewebsübertritt des Gallenfarbstoffs endet. Der Mangel kann zum Teil durch MRP-3 aufgehoben werden.

Eine Therapie ist nicht erforderlich, da sich die Symptomatik auf einen schubweise auftretenden Ikterus beschränkt und auch die Lebenserwartung nicht eingeschränkt wird [Löffler & Petrides, 2007; Kamisako & Leier, 2001; Fretzayas *et al*, 2007].

#### **4.6.2.4. Rotor-Syndrom**

Das Rotor-Syndrom ist dem Dubin-Johnson-Syndrom sehr ähnlich. Auch dieses tritt nur selten auf, wird autosomal-rezessiv vererbt und hat eine Störung der Bilirubinausschüttung in die Leber als Ursache. Demzufolge sind auch hier die Bilirubinwerte erhöht (konjugiertes Bilirubin & Gesamtbilirubin), eine Therapie ist jedoch nicht notwendig [Löffler & Petrides, 2007; Roche, 1999].

## 5. DAS ANTIOXIDATIVE POTENTIAL DER GALLENFARBSTOFFE UND IHRER ENZYME

### 5.1. WIRKMECHANISMEN IM PHYSIOLOGISCHEN NORMALZUSTAND

Die Gallenfarbstoffe Biliverdin und Bilirubin weisen eine Reihe von zellschützenden Eigenschaften auf, von denen die wichtigsten in nachstehender Tabelle übersichtlich zusammengefasst sind (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1 – Zellschützende Eigenschaften der Gallenpigmente im gesunden Organismus [Kapitulnik & Maines, 2009]

Eigenschaft	Gallenpigment	Effekt	Schutzwirkung bei
Anti-mutagen	<i>Biliverdin/Bilirubin</i>	Nachweis in AMES-Test	Kardiovaskuläre Erkrankungen & Krebs
Anti-apoptotisch	<i>Bilirubin</i>	Inhibition von ox. Stress Inhibition der Apoptose von Endothelzellen	Zerebralf Gefäße Zytokin-medierte Entzündung
Anit-inflammatorisch	<i>Bilirubin</i>	Reduktion von TNF-Level & Serumstickoxid	Entzündungen der Atemwege
Koagulierend	<i>Bilirubin</i>	Unterdrücken mikro-vaskulärer Thromben-bildung	Embolien Thromben
Bei Organ-Transplantationen	<i>Biliverdin/Bilirubin</i>	Schutz transplantiertes Organe vor ox. Stress	Reperfusion-verletzungen

Die Bildung von Biliverdin/Bilirubin wurde bereits in Kapitel 4 ausführlich beschrieben, sodass die einzelnen daran beteiligten Enzyme und Moleküle nun im Detail betrachtet werden können.

#### 5.1.1. Häm-Oxygenasen

##### 5.1.1.1. Biochemische Grundlagen

Das Häm/Häm-Oxygenase-System dient im Wesentlichen zwei Funktionen, nämlich einerseits der Regulation der Endothelzell-Integrität und andererseits der Reaktionsfähigkeit auf oxidativen Stress [Abraham & Kappas, 2005]. Grundlegend sind Häm-Oxygenasen als Proteine

definiert, die eine sogenannte „*heme oxygenase signature*“ aufweisen. Darunter versteht man eine Proteinstruktur, die jener der erstmals in Ratten entdeckten Häm-Oxygenase-1 und Häm-Oxygenase-2 ähnlich ist, sodass das jeweils vorliegende Protein der HO-Gruppe zugeordnet werden kann. An dieser Sequenz wird das Häm angehaftet (frühere Bezeichnung „*heme-binding pocket*“). Außerhalb dieser Region unterscheiden sich Häm-Oxygenase-1 und Häm-Oxygenase-2 zu mehr als 50% voneinander, wobei diese Unterschiede aufgrund der langen evolutionären Entwicklung des Enzyms zwischen pflanzlichen und tierischen Organismen noch um einiges größer sein kann [Maines & Gibbs, 2005].

In Säugetierorganismen sind zwei iso-Formen der Häm-Oxygenasen zu finden: Häm-Oxygenase-1 und Häm-Oxygenase-2. Beide Enzyme wirken im Rahmen des Häm-Katabolismus, wobei sie ihre Wirkungen vor allem im Endoplasmatischen Retikulum entfalten. Ihre Aufgabe besteht hauptsächlich darin, den Tetrapyrrolring des Häms in Biliverdin, freies Eisen und Kohlenmonoxid zu spalten. Dabei handelt es sich um einen Vorgang, bei dem sie eng an die NADPH Cytochrom P450 Reduktase gekoppelt sind. Eine dritte Enzymform, die Häm-Oxygenase-3, ist ausschließlich in Ratten zu finden, wobei es sich dabei wahrscheinlich um eine Retrotransposition des Häm-Oxygenase-2-Gens handelt [Schipper, 2004], die katalytisch inaktiv ist [Maines & Gibbs, 2005]. Der wesentlichste Unterschied zwischen diesen beiden Formen besteht darin, dass es sich bei der Häm-Oxygenase-1 um die induzierbare Form dieses Enzyms handelt, während die Häm-Oxygenase-2 als konstitutive iso-Form anzusehen ist. Dies ist physiologisch relevant, wenn es um die therapeutische Manipulation der Enzym-Expressionsrate geht [Abraham & Kappas, 2005]. Die Induktion der Häm-Oxygenase-1 ist durch verschiedene Faktoren beeinflussbar, so etwa durch oxidiertes Hämoglobin, Schwermetallionen, Hydrogenperoxid, UV-A Strahlen, Stickoxid und freie Sauerstoffradikale [Vítek *et al*, 2002, Maes *et al*, 2006].

Diese beiden iso-Formen unterscheiden sich sowohl markant in ihrer Gensequenz, als auch in ihren Hauptwirkungszentren. Während der Häm-Oxygenase-1 eine relativ einfach gebaute Genstruktur zugrunde liegt, handelt es sich beim Gen der Häm-Oxygenase-2 um eines der komplexesten überhaupt. In bezug auf ihre Wirkungsbereiche ist festzuhalten, dass Häm-Oxygenase-1 besonders in allen nicht neuronalen Geweben, wie etwa Gefäßwände, Leber-, Nierenzellen, u.v.a. in höheren Konzentrationen aufzufinden ist, während Häm-Oxygenase-2 besonders in Nervengeweben und Gehirn vorkommt [Maines & Gibbs, 2005]. Jedoch wird gerade im zentralen Nervensystem die Häm-Oxygenase-1 durch Noxen und andere pro-oxidativen Vorgänge stimuliert, was besonders bei Erkrankungen des zentralen

Nervensystems zum Tragen kommt. Die Konzentrationserhöhung fällt je nach Krankheit unterschiedlich stark aus (Näheres hierzu siehe Kapitel 5.2.3) [Schipper, 2004].

Hinsichtlich des Häm-Abbaumechanismus, der Funktion als Co-Faktor, der Substratspezifität, sowie der möglichen Unterdrückung durch synthetische Metallo-Porphyrine sind Häm-Oxygenase-1 und Häm-Oxygenase-2 als ident zu betrachten [Abraham & Kappas, 2005].

Die Aktivierung der Häm-Oxygenase-1 wird durch verschiedene Faktoren induziert, wobei grundlegend oxidativer Stress als eine der Hauptursachen zu betrachten ist [Cao *et al*, 2009]. So kommt es zum Beispiel bei Exposition von oxidiertem LDL zu einer verstärkten Expression der Häm-Oxygenase-1 in Endothelzellen des Gefäßsystems, sowie in glatten Muskelzellen. Ebenfalls zu einer Erhöhung des Enzymspiegels führen atherosklerotische Läsionen, wodurch auf die generelle Beeinflussung der Expressionsrate durch Stressbedingungen geschlossen werden kann [Abraham & Kappas, 2005; Abraham & Kappas, 2008]. Im Gegensatz dazu wird die Häm-Oxygenase-2 physiologisch kontinuierlich exprimiert, ohne vorangehende Induktion (siehe auch Kapitel 5.1.1.3) [Abraham & Kappas, 2008; Kim & Doré, 2005].

#### **5.1.1.2. Cytoprotektive Wirkungen der Häm-Oxygenase-1**

Die cytoprotektive Wirkung dieses Enzyms betrifft besonders das Gefäßsystem, weshalb der Häm-Oxygenase-1 insbesondere im Zusammenhang mit Erkrankungen desselben ein enormes Wirkungspotential zugeschrieben wird. Ihre Effekte können sowohl direkt, als auch indirekt über die beim Häm-Abbau gebildeten Produkte Kohlenmonoxid und Bilirubin zum Tragen kommen. Direkt bedeuten hierbei das Erhöhen der Ferritin-Aktivität, sowie die verstärkte Chelatbildung mit freiem Eisen. Die Reaktionsprodukte wirken im Gegensatz dazu mehr auf die Gefäßwände bzw. Zellbestandteile selbst [Durante *et al*, 2005]. In Summe werden der Häm-Oxygenase-1 neben der zellschützenden Effekte bei Atherosklerose eine ganze Reihe von positiven Effekten zugeschrieben, wie etwa eine grundlegend anti-inflammatorische Wirkung, sowie eine positive Beeinflussung des Krankheitsverlaufs bei Sepsis, Diabetes, Lungenerkrankungen Gefäßverschluss und Ischämie [Abraham & Kappas, 2005]. In Kapitel 5.2.1.3 finden sich weitere Details zu diesem Thema bzw. die Beschreibung der gezielten Modulation der Häm-Oxygenase-1-Expression zu therapeutischen Zwecken.

Eine weitere in diesem Zusammenhang sehr interessante Beobachtung besteht darin, dass die Häm-Oxygenase-1 nicht immer auf dieselbe Weise wirkt, sondern verschiedene Wirkungen auf unterschiedliche Zelltypen ausübt. Konkret bedeutet dies, dass die Beeinflussung des

Zellzyklus stimuliert oder reduziert werden kann, je nach Zyklusphase bzw. je nachdem, ob es sich um Endothelzellen oder glatte Gefäßmuskelzellen handelt. Dieser Tatsache wird sehr große Bedeutung zugesprochen, da durch diese Plastizität die Häm-Oxygenase-1 je nach klinischem Bedarf anders wirken kann. Insofern nimmt dieses Enzym eine zentrale Schlüsselrolle für die Regeneration von Gefäßen ein und kann vielleicht in Zukunft therapeutisch entsprechend adaptiert werden [Abraham & Kappas, 2005].

### **5.1.1.3. Cytoprotektive Wirkungen der Häm-Oxygenase-2**

Die Häm-Oxygenase-2 wirkt besonders im zentralen Nervensystem, wo sie für das Aufrechterhalten der zellulären Homöostase verantwortlich ist. Aber auch im Zuge einer Stressreaktion entfaltet sie zellschützende Eigenschaften, wobei diese ausschließlich durch einen katalytisch inaktiven Mutanten zustande kommt. Diese Zellprotektion entsteht aufgrund von Interaktionen sowohl zwischen den beiden Häm-Oxygenase-Isomeren, als auch mit anderen Proteinen, wodurch es zu unterschiedlichen Signalkaskaden kommt. Demnach verursachen die beiden Häm-Oxygenasen auch nicht-enzymatische Schutzfunktionen [Kim & Doré, 2005].

### **5.1.2. Schutzwirkungen des Biliverdin**

Biliverdin selbst weist neben seiner Funktion als Vorläufer des Bilirubins vor allem anti-mutagene, sowie kardioprotektive Wirkungen auf. Aber auch bei Organtransplantationen stellt es gemeinsam mit Bilirubin einen Schutzfaktor vor Abstoßungsreaktionen dar, d.h. sie wirken Reperfusionverletzungen entgegen [Kapitulnik & Maines, 2009].

Die Schutzwirkungen des Biliverdins auf das Herz-Kreislaufsystem sind Teil komplexer Prozesse, die in Abhängigkeit mit Bilirubin zum Ausdruck kommen bzw. wird Bilirubin möglicherweise bei Bedarf über Biliverdin regeneriert, sodass dessen antioxidative Wirkungen längerfristig aufrecht erhalten werden können [Liu et al, 2006]. Eine der bedeutendsten Funktionen liegt in der Inhibition der endothelialen Dysfunktion, die zu Vasokonstriktion und damit langfristig zu Gefäßerkrankungen führt [Kapitulnik & Maines, 2009].

### 5.1.3. Biliverdin Reduktase

Die menschliche Biliverdin-Reduktase stellt ein ganz spezielles Enzym mit einem sehr breiten Wirkungsspektrum, das Glucoseaufnahme, Genexpression und Stressantwort umfasst, dar. Chemisch betrachtet handelt es sich primär um eine dual-spezifische Kinase, sowie um einen Aktivator des Insulins bzw. des Insulin Growth Factor-1. Der Wirkungsbereich umfasst jedoch auch die Funktion als Transkriptionsfaktor auf DNA-Ebene, sowie jene eines Signalmoleküls in diversen Enzymkaskaden. Die Dualspezifität ist ein Hauptmerkmal, das darin besteht, dass sie sich bei unterschiedlichen Umweltbedingungen, wie etwa pH oder ATP-Verfügbarkeit, unterschiedlich verhält. In Zusammenhang mit Gallenpigmenten ist dieses Enzym für die Umwandlung von Biliverdin in Bilirubin zuständig.

Auf nuklearer Ebene zeichnet die Biliverdin-Reduktase unter anderem für die Genexpression zur Aktivierung der Häm-Oxygenase-1 verantwortlich, sodass ihr eine zentrale Rolle bei der Kontrolle des Häm-Katabolismus bzw. der Häm-Oxygenase-1-Aktivierung zu kommt. Beide Vorgänge werden durch sie kontrolliert [Kapitulnik & Maines, 2008].

### 5.1.4. Schutzwirkungen des Bilirubins

Grundlegend werden dem Bilirubin mehrere gesundheitsfördernde bzw. gesundheits-erhaltende Eigenschaften zugeschrieben, wie etwa das antioxidative, das anti-inflammatorische, das anti-apoptotische, das anti-mutagene, sowie das anti-proliferative Potential. Hinzukommt, dass dieses Gallenpigment in direkter Korrelation zur totalen antioxidativen Serumkapazität des Menschen stehen soll, wobei Bilirubin hierbei eine höhere Effizienz aufweist als zum Beispiel Vitamin C oder Vitamin E (hierzu siehe Kapitel 5.1.5) [Schwertner & Vitek, 2008; Bulmer *et al*, 2007b]. Des Weiteren wird dem Bilirubin ein Vitamin-E-sparender Effekt zugeschrieben, der ebenfalls eine Unterstützung des Oxidationsschutzes im Organismus darstellt [Bélanger *et al*, 1997].

Die anti-inflammatorische Wirkung des Bilirubins zeigt sich besonders in der an Albumin gebundenen Form, wo es vor allem im Gewebe wirkt. Dabei kommt es durch die komplement-hemmende Aktivität zur Hemmung entzündungsbedingter Schädigungen [Vitek *et al*, 2002].

Auch die Darmflora hat indirekt über Bilirubin einen Effekt auf die körpereigenen Schutzmechanismen. Der Darm spielt in der Immunabwehr eine bedeutende Rolle, wobei

genau genommen die Mikroflora für diese Wirkung verantwortlich ist. Wie bereits in Kapitel 4.4 ausführlich beschrieben, spielt diese im Colon auch eine wesentliche Rolle beim Abbau des Bilirubins. Vitek *et al* haben 2005 in einer Studie erstmals den Beweis für einen direkten Zusammenhang der intestinalen Mikroflora und dem Serumspiegel an Bilirubin bei Erwachsenen erbracht, indem sie den Effekt verschiedener Antibiotika an *Gunn Ratten* untersuchten. Das Ergebnis belegte einen substantiellen Einfluss der Intestinalflora auf den Bilirubin-Metabolismus, was etwa bei einer langandauernden Antibiotika-Therapie im Ansteigen des Bilirubinserumspiegels resultieren kann bzw. bei entsprechender Antibiotika-Gabe auch in einem verstärkten Bilirubinkatabolismus und damit verbunden mit einem Absinken des Serumspiegels endet [Vitek *et al*, 2005].

Im Lipoprotein-Metabolismus weist Bilirubin ebenfalls eine positive Wirkung auf, wie anhand von Untersuchungen an Gilbert-Syndrom-Patienten belegt werden konnte. Demnach weisen diese Individuen generell höhere Bilirubinserkonzentrationen, als auch erhöhte HDL-LDL-Ratio auf, sodass es zu einer erhöhten Resistenz vor Serumoxidation kommt. Dies führt in weiterer Folge zu einer Reduktion des Risikos für kardiovaskuläre Erkrankungen (siehe Kapitel 5.1.6 und 5.2.1). In diesem Zusammenhang spielt Bilirubin in seiner unkonjugierten Form mit (antioxidativ wirksame Formen siehe Kapitel 5.1.4.1), wobei dieses zirkulierende Bilirubin bei der Prognose von Prädispositionen für eventuelle kardiovaskuläre Störungen als gewichtiger einzustufen ist als der HDL-LDL-Ratio [Bulmer *et al*, 2008].

#### **5.1.4.1. Bilirubin in seinen antioxidativ wirksamen Formen**

Bilirubin kann in drei Formen antioxidativ wirksam sein, und zwar in Form des

- (1) freien unkonjugierten Bilirubins
- (2) konjugierten Bilirubins
- (3) an Albumin gebundenem Bilirubins.

##### **(1) Freies unkonjugiertes Bilirubin**

Das antioxidative Potential dieser Wirkform liegt besonders in der Reaktionsfähigkeit mit Superoxid-Anionen und Peroxyl-Radikalen, sowie auch der Fähigkeit Singulett-Sauerstoff einzufangen. Durch diese Eigenschaften erweist unkonjugiertes Bilirubin insgesamt eine hohe antioxidative Wirksamkeit, die mit der des Serumalbumins verglichen werden kann und

irgendwo zwischen der des Trolox und der Ascorbinsäure einzuordnen ist [Stocker & Ames, 1987; Stocker *et al*, 1990; Abraham & Kappas, 2005].

## **(2) Konjugiertes Bilirubin**

Konjugiertes Bilirubin ist wasserlöslich und kann dadurch auch frei gelöst im Blut vorliegen. Es wirkt besonders der Lipidperoxidation entgegen, wobei seine Wirksamkeit sich auch auf die eines Tocopherol-Synergisten erstreckt. Dadurch kann verbrauchtes Tocopherol, das ebenfalls eine große Rolle im Schutz der Lipidmembranen aufweist, rascher regeneriert werden (vergleiche Kapitel 3.4.2.2). Biliverdin weist im Modell zum konjugierten Bilirubin vergleichsweise eine fast 2,5-fache Wirksamkeit pro Molekül auf.

Da die Gallenflüssigkeit hauptsächlich der Fettemulgierung dient, spielt Bilirubin in seiner konjugierten Form auch hierbei als Protektor der Intestinalschleimhaut eine wesentliche Rolle. Konkret verhindert konjugiertes Bilirubin die potentielle Oxidation aufgenommener Fette direkt im Darm, um so der Zerstörung der Mukosa entgegenzuwirken. So werden mit der Nahrung aufgenommene Mutagene und Karzinogene rasch unwirksam gemacht [Stocker *et al*, 1990].

## **(3) An Albumin gebundenes Bilirubin**

An Albumin-gebundenes Bilirubin dient grundlegend als Schutz für alle Albumin-Liganden vor Oxidation, sowie im Besonderen für an Albumin gebundene Fettsäuren, deren Schutz ansonsten nach vollständiger Oxidation des Vitamin C verloren gehen würde [Hunt *et al*, 2001]. In dieser Wirkform weist Bilirubin sogar eine höhere Effizienz auf als das  $\alpha$ -Tocopherol, dessen antioxidativer Schutz im Plasma ohne Bilirubin in eine gegenteilige Wirkung umschlägt, d.h. pro-oxidativ wird. Somit kann Bilirubin – in Abhängigkeit von der Konzentration – als „limitierender Faktor“ des  $\alpha$ -Tocopherols bezeichnet werden [Tomaro & Batlle, 2002].

Weiters, muss an dieser Stelle noch einmal betont werden, dass die Bilirubin-Konzentration im Plasma mit jener der totalen antioxidativen Kapazität des Plasmas korreliert, während dies bei den Tocopherolen alleine nicht der Fall ist. Eine noch höhere Korrelation wird jedoch erreicht, wenn Bilirubin,  $\alpha$ -Tocopherol und die antioxidative Kapazität des Plasmas zusammengenommen werden [Tomaro & Batlle, 2002].

### 5.1.5. Basale cytoprotektive Wirkungen der Gallenpigmente

#### 5.1.5.1. Biliverdin und Bilirubin als generelle Cytoprotektoren

Sowohl Biliverdin, als auch Bilirubin im Speziellen spielen im Rahmen der zellulären Schutzmechanismen eine zentrale Rolle. Besonders unter Stresssituationen des Organismus sind Reaktionsmechanismen, wie jene des Bilirubins als Radikalfänger, vor allem als Fänger von reaktiven Sauerstoffmolekülen, zu beobachten. Aber auch andere oxidative Zellschädigungen werden von Bilirubin abgeschwächt, wie in mehreren in vivo Studien belegt werden konnte. Grundlegend ist hierbei jedoch zu betonen, dass beide Gallenpigmente nur in niedrigen Konzentrationen von bis zu maximal 1,2 mg/dl bis 1,5 mg/dl (vergleiche Kapitel 4.2) vorliegen dürfen, um diese positiven Auswirkungen zu zeigen. Bei erhöhten Serumspiegeln (über 2 mg/dl definiert bereits eine Hyperbilirubinämie) kann die Wirkung rasch ins Gegenteil umkippen und dem Organismus schaden [Abraham & Kappas, 2005].

Außerdem wird vermutet, dass Bilirubin einen wesentlichen Einfluss auf die Eicosanoid-Synthese hat, wie von Wang *et al* im Tierversuch an Ratten gezeigt werden konnte. Dieser Studie lag die Hypothese zugrunde, dass Bilirubin als Schlüsselmediator der Häm-Oxygenase-1-vermittelten Zellprotektion fungiere. Dabei konnte grundlegend bewiesen werden, dass eine Behandlung mit Bilirubin zum Beispiel Leberschädigungen nach einer Lipopolysaccharid-Infusion wesentlich verbessern konnte. Die Serumspiegel prägnanter Einflussfaktoren, wie etwa Stickoxid oder TNF, waren in Bilirubin-behandelten Individuen deutlich niedriger als jene der Kontrollgruppe. Zusätzlich kam es zu einer dreimal stärkeren Lipopolysaccharid-vermittelten Prostaglandin-Synthese, sodass auf eine Beeinflussung der Eicosanoid-Bildung geschlossen wurde [Wang *et al*, 2004; Abraham & Kappas, 2005].

#### 5.1.5.2. Wirkungen auf das Komplement-System

Das Komplement-System erfüllt wesentliche Aufgaben in der unspezifischen Immunabwehr, wobei es besonders bei allergischen Reaktionen, sowie bei Entzündungen zum Tragen kommt. Der grundlegende Mechanismus sieht so aus, dass es durch Antikörper zur Neutralisierung von Antigenen, Bakterien oder Viren kommt und diese in weiterer Folge abgebaut werden müssen. Dieser Abbau wird durch das Komplement-System in die Wege geleitet, wobei es verschiedene Arten der Aktivierung gibt, die bei Auslösung in einer klassischen Stoffwechsellkaskade abläuft [Löffler & Petrides, 2008]. Die Gallenpigmente

greifen hierbei besonders am C1-Schritt ein, der mit den Immunglobulinen M und G wechselwirkt, sodass es zur Modulation der entsprechend anschließenden Reaktionen kommt. Für die Forschung in diesem Kontext interessant bleibt weiterhin, ob und wie eine Verbesserung der komplement-vermittelten Zerstörung von Zellen und Geweben bei bestimmten Krankheiten, wie, hämolytischer Anämie oder ABO-Inkompatibilität bei Spender-Lebern, möglich ist [Liu *et al*, 2003].

#### 5.1.6. *Protektion des Blutplasmas*

Blut nimmt im Organismus eine zentrale Stelle ein, da es aufgrund seiner Transportfunktion in fast alle Stoffwechselvorgänge des Körpers direkt oder indirekt involviert ist. Im Kontext eines antioxidativen Schutzes besteht die Hauptaufgabe darin, die Redox-Balance – auch unter Belastung, wie etwa bei Nikotinkonsum oder chronischer Entzündungen – aufrecht zu erhalten. Dies geschieht vornehmlich durch Transport und Verteilung der Antioxidantien zu ihren entsprechenden Wirkorten, aber auch durch Reduktion oxidierter Moleküle durch bestimmte Plasmakomponenten, wie dies zum Beispiel bei Ascorbinsäure/Ascorbat der Fall ist [Stephens *et al*, 2009].

Aber auch der Schutz der Blutgefäße selbst unterliegt teilweise dem Wirkungsbereich der Gallenpigmente. So schützt etwa Biliverdin in Synergismus mit Vitamin E die Zellmembran vor Lipidperoxidation, wobei es besonders in der wässrigen Phase der Lipiddoppelschicht wirkt. Des Weiteren ist belegt, dass Bilirubin das gesamte antioxidative Potential des Blutplasmas erhöht, indem es Peroxyl-Radikale deaktiviert. Der zugrunde liegende Mechanismus ist bis heute noch ungeklärt [MacLean *et al*, 2007; Minetti *et al*, 1998].

Der Schutz des Blutserums selbst vor oxidativer Schädigung ist besonders im Zusammenhang mit dem Gilbert-Syndrom (siehe Kapitel 4.6.2.1) interessant, da Individuen mit dieser Erkrankung aufgrund der erhöhten Serumbilirubinwerte und der damit einhergehenden erhöhten Oxidationsresistenz ein verringertes Risiko für kardiovaskuläre Krankheiten aufweisen. Dies lässt auf die Bedeutung des Bilirubins als antioxidativ-wirksames Schutzmolekül schließen, da der Bilirubinwert den einzigen unterschiedlichen Standardparameter zwischen Gilbert-Syndrom-Patienten und Kontrollpersonen darstellt [Bulmer *et al*, 2008].

Des Weiteren weisen Patienten dieses Syndroms häufig ein erhöhtes HDL:LDL Verhältnis auf, was eine zusätzliche Resistenzsteigerung vor oxidativem Stress darstellt, wobei dies

unabhängig von anderen Faktoren, wie etwa der Fettaufnahme oder körperlicher Betätigung auftritt. Deshalb wird davon ausgegangen, dass es bei Personen mit Gilbert-Syndrom geringfügige Abweichungen im Lipoprotein-Metabolismus gibt, die in der Gefäßprotektion große Auswirkung zeigen [Bulmer *et al*, 2008].

Zusätzlich wird der Schutz des Plasmas durch die gesamt zirkulierende Zahl an Antioxidantien definiert, wobei Synergismen zwischen den einzelnen Molekülen berücksichtigt werden müssen. Besonders Vitamin C weist in diesem Kontext ein hohes Potential auf (Näheres siehe Kapitel 3.5) [Bulmer *et al*, 2008].

## 5.2. WIRKMECHANISMEN DER GALLENPIGMENTE UNTER PATHOLOGISCHEN BEDINGUNGEN

### 5.2.1. Gallenfarbstoffe und Kardiovaskuläre Erkrankungen

Zu Beginn dieser Thematik findet sich hier eine Übersicht der bedeutendsten Schutzeffekte von Biliverdin/Bilirubin und wie sie gesundheitlichen Störungen entgegenwirken (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2 – Zellschützende Eigenschaften der Gallenpigmente im kranken Organismus [Kapitulnik & Maines, 2009]

Eigenschaft	Gallenpigment	Effekt	Schutzwirkung bei
Neuroprotektiv	<i>Bilirubin</i>	Reduktion des Infarkttrisikos	Hirnfarkt
Cardioprotektiv	<i>Biliverdin/Bilirubin</i>	Schutz vor Vasokonstriktion	Hypertension Dysfunktion der Gefäßendothelzellen
Pulmoprotektiv	<i>Biliverdin/Bilirubin</i>	Schutz vor Verletzung von Lungengewebe	Lungenentzündung

#### 5.2.1.1. Basiswissen und Ätiologie

Bei kardiovaskulären Erkrankungen handelt es sich um ein sehr komplexes Krankheitsbild, das oft letale Folgen nach sich zieht. Koronare Herzerkrankungen etwa stellen weltweit die häufigste Todesursache dar. An ihrer Entstehung sind unzählige Faktoren beteiligt, deren Anzahl mit neuen Erkenntnissen im Bereich der Biowissenschaften stetig ansteigt. Grundlegend ist jedoch festzuhalten, dass bis heute die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen nicht ausreichend aufgeklärt sind und zudem viele Patienten ischämischer Erkrankungen oftmals keine eindeutigen Risikofaktoren aufweisen. Demnach sind in diesem Zusammenhang besonders Studien zum Einfluss der genetischen Polymorphismen auf Erkrankungen des Gefäßsystems nötig [Stephens *et al*, 2008], aber auch die genauere Erforschung von Plasmamarkern als Indiz für oxidativen Stress steht im Zentrum des Interesses, da besonders bei einer raschen Erkennung effektive Therapieschritte eingeleitet werden können. Eine routinemäßige Messung solcher Plasmawerte gibt es bis heute noch nicht. Klar ist jedoch, dass oxidativer Stress, Diabetes und kardiovaskuläre Erkrankungen in engem Zusammenhang miteinander stehen und demnach die Entdeckung

solcher Plasmamarker medizinisch-therapeutisch von immenser Bedeutung sein könnte [Stephens *et al*, 2009].

Oxidativer Stress im Gefäßsystem ist das Resultat verschiedener Mechanismen und äußert sich in einer Vielzahl von Folgereaktionen. Da es sich bei Zellmembranen aufgrund der ungesättigten Fette um sehr sensible Strukturen handelt, werden durch ihre Beeinträchtigung diverse Signalwege unterbrochen bzw. verändert. Einer davon basiert zum Beispiel auf der Beeinträchtigung des NO-Signalwegs durch Peroxynitrit-Radikale, wodurch es zu fehlenden Reaktionen endothelialer Vasodilatoren kommt. Dies führt in weiterer Folge zu einer verstärkten Plättchenaggregation, zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, zu einer zusätzlichen Proliferation glatter Muskelzellen, sowie zu Lipidoxidation. Diese Faktoren zusammengenommen charakterisieren im Wesentlichen die Entstehung einer Atherosklerose, da es durch diese zu einer Verengung bis hin zur Verstopfung von vitalen Gefäßen kommt [Stephens *et al*, 2009].

Grundlegend handelt es sich bei der Entstehung von Atherosklerose um einen sehr umfassenden Prozess, der im Wesentlichen in einer degenerativen Veränderung der Arterienwand endet. In diesem Rahmen spielt die sogenannte endotheliale Dysfunktion eine zentrale Rolle, da es durch diese zu einer Störung der vaskulären Homöostase kommt. Im Detail betrachtet werden durch diesen Vorgang diverse Signalwege (z. B. NO) verändert bzw. einige Mediatoren freigesetzt, die eine Gefäßverstopfung durch z. B. Monozyten, Thrombozyten oder auch Lymphozyten fördern. Betroffen ist hierbei besonders die Intima, die Ursprungsort dieser Degenerationen ist. Ihre Widerstandskraft gegenüber äußere Stresseinflüsse und Noxen, wie es etwa Zigarettenrauch, Bluthochdruck oder Diabetes mellitus sind, variieren interindividuell sehr stark (siehe hierzu Kapitel 5.2.1.1.1) [Kasper, 2004].

#### 5.2.1.1.1. Einfluss der Gen-Umwelt-Interaktion

Um den Gesundheitszustand aufrechtzuerhalten ist ein Gleichgewicht funktioneller Proteine Voraussetzung. Diese unterliegen alle einer komplexen genetischen Regulation. Jedoch ist hierbei anzumerken, dass es sich bei der genetischen Kontrolle nicht um einen statischen Vorgang handelt, sondern um einen äußerst dynamischen Prozess, der permanent in Wechselwirkung mit den jeweils vorliegenden Umwelteinflüssen steht. Salopp formuliert bedeutet dies, dass zelluläre Funktionen sich immer wieder neu anpassen und weiter entwickeln, um dieselbe Homöostase konstant zu halten. Kardiovaskuläre Erkrankungen und

Stoffwechselstörungen, wie etwa Diabetes, sind die klassischen Beispiele für den Verlust dieses Gleichgewichtszustandes [Stephens *et al*, 2008].

Anhand des Rauchverhaltens, das eine starke Erhöhung des oxidativen Stresses bedeutet, kann der genetische Einfluss besonders deutlich veranschaulicht werden. Während es Individuen gibt, die trotz intensiven Tabakkonsums kaum ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen aufweisen, kommt es bei anderen rauchenden Personen rasant zu einer Anhäufung diverser mit dem Rauchen assoziierter gesundheitlicher Beschwerden. Dies kann im Wesentlichen auf die genetische Veranlagung zurückgeführt werden. Zum Beispiel gibt es Unterschiede in der antioxidativen Aktivität je nachdem welchen Genotyp ein Individuum für das Apolipoprotein E aufweist, einem Protein, das vor allem für die Entfernung von triglyceridreichen Lipoproteinen aus dem Plasma verantwortlich ist [Stephens *et al*, 2008]. Ein ebensolches Phänomen tritt beim Gilbert-Syndrom auf, bei dem es aufgrund der mäßig erhöhten Bilirubin-Plasmawerte zu einem verringerten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen kommt [Vitek *et al*, 2002; Bulmer *et al*, 2008].

#### 5.2.1.1.2. Physiologische Grundlagen

Im Rahmen einer Atherogenese stellt die Oxidation des LDL-Cholesterins einen wesentlichen Punkt dar, wobei besonders dem oxidierten LDL (ox-LDL) sowohl bei Initiation, als auch Progression atherosklerotischer Veränderungen große Bedeutung zu kommt. Ox-LDL weist einerseits cytotoxische Eigenschaften auf, die insbesondere Endothelzellen und glatte Muskelzellen betreffen und bewirkt andererseits die Schaumzellbildung, die zur Atherosklerose führt [Stephens *et al*, 2009].

HDL-Cholesterin wirkt im Gegensatz zum LDL-Cholesterin durch diverse Eigenschaften einer Atherogenese entgegen. Das Gallenpigment Bilirubin weist dem High Density Lipoprotein Cholesterol (HDL-Cholesterin) ähnliche antioxidative, als auch anti-inflammatorische Eigenschaften auf, sodass es ebenfalls in der Lage ist anti-atherogen zu wirken. Konkret geschieht dies durch eine Reduktion der Oxidation des LDL-Cholesterins, sowie auch jener anderer Lipide, wobei diese oxidationsprotektive Wirkung an ein Zusammenwirken mehrerer Antioxidantien, wie zum Beispiel Glutathion oder  $\alpha$ -Tocopherol gebunden ist. Des Weiteren wirkt es grundlegenden Schädigungen durch oxidativen Stress entgegen und kann Sauerstoffradikale unschädlich machen [Schwertner & Vitek, 2008; Durante *et al*, 2005]. Durch seine Hemmung der Proteinkinase C kommt es zu einer Schutzwirkung vor

Atherogenese basierend auf einer reduzierten Schaumzellenbildung an der glatten Muskulatur [Clark *et al*, 2000].

#### **5.2.1.2. Therapeutische Bedeutung von Aspirin**

Bei Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen kommt es sehr häufig zum Einsatz von Aspirin, dessen Wirkstoff – die Acetyl-Salicyl-Säure – bei langfristiger Gabe nicht nur therapeutische Wirkung entfaltet, sondern oftmals auch zu Nebenwirkungen im Bereich des Magens führt [Becker *et al*, 2003]. Jedoch überwiegt das positive Wirkungsspektrum bei weitem, indem Aspirin vor allem die Thrombenbildung inhibiert und somit eine Reduktion etwaiger Thrombosen, d.s. Gefäßverstopfungen, bedingt. Dies wirkt sich insbesondere auf die Inzidenz Myocardinfarkte aus. Grundlegend führt der Aspirin-Einsatz – ebenso wie auch Bilirubin – zu einem generellen Oxidationsschutz von Endothelzellen, [Cao *et al*, 2009].

Die Toxizität der Acetyl-Salicyl-Säure auf den Verdauungstrakt kann mittels Vitamin-C-Verabreichung gelindert werden, wobei der dahintersteckende Mechanismus genauso auf einer Enzyminduktion beruht wie auch die positiv therapeutische Wirkung bei kardiovaskulären Störungen [Becker *et al*, 2003]. Aspirin verursacht demnach eine Induktion der Häm-Oxygenase-1, sodass es in weiterer Folge sowohl zu einer erhöhten Ferritin-Aktivität in Endothelzellen kommt, als auch zu einer verstärkten Eisenfreisetzung. Beide Wirkungen werden direkt durch die Oxygenase ausgelöst und sind im Rahmen einer Verlangsamung der Atherogenese von großer Bedeutung (vergleiche Kapitel 5.1.1.2) [Abraham & Kappas, 2005]. Auf das Verdauungssystem bezogen sind gastrische Epithelzellen nur in Anwesenheit von Vitamin C in der Lage die Häm-Oxygenase-1-mRNA in die aktive Proteinform zu überführen, sodass diese ihre antioxidative und gefäßerweiternde Wirkung entfalten kann. Diese zell-spezifische Vitaminwirkung geht jedoch über eine reine Enzyminduktion hinaus, indem durch Vitamin-C-Gabe ebenfalls eine verstärkte Proteinexpression, als auch eine gesteigerte Enzymaktivität in den betreffenden gastrischen Zellen belegt werden konnte [Becker *et al*, 2003].

#### **5.2.1.3. Medizinisch-therapeutische Aspekte des Häm-Katabolismus**

Kardiovaskuläre Erkrankungen haben einen langen Entwicklungszeitraum, der aus mehreren zusammenhängenden, teils interindividuell unterschiedlichen Schritten besteht. Charakteristische Erscheinungen sind unter anderem Störungen im Lipidstoffwechsel,

erhöhter oxidativer Stress, Entzündungen, endotheliale Störungen, Leukozytenansammlungen, Differenzierung, Aktivierung der glatten Gefäßmuskelzellen (*vascular smooth muscle cell*, SMC), veränderter Matrixmetabolismus, sowie Thrombenbildung [Faxon *et al*, 2004]. Die protektive Wirkung der Gallenpigmente gegenüber diesen Entwicklungen bewirkt grundlegend einen Schutz vor drohender Atherogenese und wird enzymatisch, vor allem über die Häm-Oxygenase-1 reguliert. Durante *et al* diskutieren in diesem Zusammenhang einen Polymorphismus in der Häm-Oxygenase-1 Promoterregion, der die Expressionsrate definiert. Bei einer erniedrigten Häm-Oxygenase-1-Expression kommt es zu einer erhöhten Prävalenz für koronare Arterienerkrankungen, sowie einer gesteigerten Restenosis-Neigung bei Angioplastie-Patienten [Durante *et al*, 2005]. Im Tierversuch an Mäusen konnte sogar bestätigt werden, dass die Abwesenheit der Häm-Oxygenase-1 verstärkt zu atherosklerotischen Veränderungen führt, sowie Gefäßverschlusserkrankungen verursacht. Des Weiteren wurden erhöhte Blutdruckwerte, kardiale Hypertrophie und akutes Nierenversagen beobachtet [Abraham & Kappas, 2005].

Grundlegend werden der Häm-Oxygenase-1 weitere Schlüsselfunktionen in der Entwicklung kardiovaskulärer Störungen zugeschrieben, die besonders in der Inaktivierung des Pro-Oxidans Häm bestehen. Wie bereits mehrfach in vorangegangenen Kapiteln beschrieben, wird das Häm durch die Häm-Oxygenase-1 zu Biliverdin und in weiterer Folge zu Bilirubin metabolisiert. Beide Pigmente verfügen über ein großes antioxidatives Potential [Durante *et al*, 2005]. Des Weiteren erhöht die Häm-Oxygenase-1-Bildung die Ferritin-Aktivität, was durch Chelatbildung mit freiem Eisen zu einer zusätzlichen Schutzwirkung führt [Durante *et al*, 2005].

Das therapeutische Potential der Häm-Oxygenasen wurde vor allem im Tierversuch untersucht, wobei sich sowohl Häm-Oxygenase-1, als auch Häm-Oxygenase-2 grundlegend bewährten. Die Häm-Oxygenase-1 zum Beispiel scheint ein immenses Wirkungsspektrum aufzuweisen, das besonders nach einem Myokard-Infarkt zum Tragen kommt. So führt sie unter anderem zu einer reduzierten myokardialen Hypertrophie, zu einer generellen Reduktion des oxidativen Stresses, sowie zu einer inflammatorischen Aktivierung. Eine verstärkte Aktivierung der Häm-Oxygenase-1 ist grundlegend verantwortlich für eine Abschwächung der kardialen Hypertrophie und des Weiteren auch für basale antioxidative und zellschützende Effekte, die besonders das Herz betreffen. Bei Transplantationen kann durch Induktion der Häm-Oxygenase-1 die Zelltoleranz im Herzmuskelbereich signifikant erhöht werden, was jedoch bisher nur in in-vivo-Studien belegt werden konnte. All diese

Fakten zusammengenommen zeigen eine umfassende potentielle Effizienzsteigerung einer Infarkttherapie [Abraham & Kappas, 2005].

#### 5.2.1.3.1. Therapeutische Induktion der Häm-Oxygenase-1

Die Erhöhung der Häm-Oxygenase-Expressionsrate führt zu einer vermehrten Bildung des Enzyms selbst und in weiterer Folge zu gesteigerten Konzentrationen der Reaktionsprodukte Kohlenmonoxid und Bilirubin, deren Serumspiegel in direkter Korrelation zur Risikosenkung von kardiovaskulären Erkrankungen stehen. Somit kann die gezielt angewandte Beeinflussung der Häm-Oxygenase-1-Bildung ein enormes Präventionspotential beinhalten.

Eine Induktion der Häm-Oxygenase-1 kann auf zwei Arten erfolgen. Einerseits über ein synthetisches Häm-Analog, das vor allem als Schutz vor Atherosklerose und Gefäßverletzungen gezielt eingesetzt wird. Beispiele hierfür sind unter anderem Hemin und Cobalt-Protoporphyrin. Andererseits können auch natürlich vorkommende Antioxidantien in der Nahrung induktive Wirkungen auf dieses Enzym aufweisen und somit dieselben protektiven Wirkmechanismen auslösen [Durante *et al*, 2005].

Hemin und Protoporphyrin wurden beide bisher nur im Tierversuch untersucht. Ihr Spektrum bezieht sich vor allem auf Verengungen der Arteria carotis bzw. auf die Prävention atherosklerotischer Entwicklungen bei Mäusen. Grundlegend müssen außerdem bei der therapeutischen Anwendung dieser Analoga einige negative Auswirkungen mitberücksichtigt werden, wie etwa die fehlende Spezifität, die toxischen Effekte bei hohen Konzentrationen, sowie die Hemmung der Häm-Oxygenase-Aktivität selbst durch Cobalt-Protoporphyrin [Durante *et al*, 2005]. Außerdem kann auf diesem Weg, d.h. mittels Metallo-Porphyrinen nicht nur eine Induktion, sondern in Abhängigkeit des Austauschelements auch eine inhibitorische Wirkung erzielt werden. Zum Beispiel führt der Ersatz des Eisens als Zentralatom durch Zink oder Zinn zu einer Inhibition des jeweiligen Enzyms [Abraham & Kappas, 2005].

Der Ansatz der Häm-Oxygenase-Induktion über Nahrungsantioxidantien scheint im Gegensatz dazu weitaus praktikabler zu sein. Besonders Pflanzenpolyphenole, wie Curcumin und Kaffeesäurephenylethylester zeigen vielversprechende Wirkung insbesondere in Bezug auf Endothelzellen und Makrophagen. Auch das sogenannte „französische Paradoxon“ wird in diesem Zusammenhang diskutiert. Darunter versteht man, dass in Frankreich die Mortalitätsrate aufgrund koronarer Herzerkrankungen wesentlich geringer ausfällt als in

anderen industrialisierten Staaten, deren Bevölkerung jedoch über ähnliche Profile hinsichtlich der Risikofaktoren verfügen. Begründet wird dies von Durante *et al* mit einer erhöhten Häm-Oxygenase-1-Expression, verursacht durch den gesteigerten Konsum an Resveratrol, einem Phytoalexin, das in besonders hohen Konzentrationen in roten Weintrauben zu finden ist und seine Enzym-induktive Wirkung vor allem in Gefäßzellen entfaltet [Durante *et al*, 2005].

Die Palette an Häm-Oxygenase-1-induktiven Antioxidantien umfasst noch weitere Substanzen, wie etwa die Kaffeeterpene Cafestol, Kahwoel, Carnosol und Sulphoraphane, aber auch nicht-antioxidativ wirksame Stoffe werden als Induktoren vermutet. Als Beispiel sei hier Glutamin genannt. Grundlegend fehlen in diesem Zusammenhang noch weitere Studien, die sich gezielt mit der Induktion der Häm-Oxygenasen und den damit verbundenen Effekten auseinandersetzen [Durante *et al*, 2005].

Durante *et al* entdeckten ein weiteres interessantes Detail im therapeutischen Einsatz der Häm-Oxygenase-1-Induktion. Nämlich, dass viele Medikamente, die bereits erfolgreich zur Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen eingesetzt werden, zumindest teilweise über die Induktion der Häm-Oxygenase-1 wirken. Als Beispiele können hier einige Wirkstoffe angeführt werden, wobei besonders Aspirin aufgrund seines häufigen Einsatzes hervorzuheben ist. Aber auch organische Nitratester oder Probuco, die beide Cholesterin-senkende Effekte hervorrufen, wirken über eine gesteigerte Enzyminduktion [Durante *et al*, 2005].

Aspirin kommt im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen sehr häufig zum Einsatz, wobei seine Wirkung insbesondere auf eine gesteigerte Expression der Häm-Oxygenase-1 zurück zu führen ist. Eine Vorbehandlung von Zellen mit Aspirin schützt Endothelzellen vor toxischen Hydrogenperoxiden im selben Ausmaß wie Bilirubin protektiv wirkt [Abraham & Kappas, 2005].

Die örtliche Steuerung der Häm-Oxygenase-1-Induktion stellt einen zentralen Punkt beim Einsatz im Rahmen einer Therapie dar. Die induktive Wirkung soll sich an spezifisch definierten Stellen im Organismus entfalten, was nicht immer einfach zu regulieren ist. Ein im Tierversuch sehr stark untersuchter Weg hierbei ist der Gentransfer, der jedoch noch weiterer Studien bedarf [Durante *et al*, 2005]. Grundlegend konnten in diesem Zusammenhang bereits Erfolge im Bereich der organspezifischen Steuerung erzielt werden, wobei sich drei verschiedene Arten von Vektoren bewährten. Dabei handelt es sich um adenovirale, retrovirale und Liposom-basierte Vektoren [Abraham & Kappas, 2005].

#### 5.2.1.3.2. Häm-Abbau-Produkt Kohlenmonoxid

Das ebenfalls durch den Häm-Abbau gebildete Kohlenmonoxid weist ebenso wichtige positive Wirkungen in Bezug auf atherosklerotische Veränderungen auf, wobei es grundlegend gefäßschützend wirkt. Der protektive Mechanismus, durch den dies bewirkt wird, besteht vor allem in inhibitorischen Aufgaben, wie etwa der Unterdrückung der Gefäßzellapoptose, der Verminderung der Bildung von Sauerstoffradikalen, einer Suppression der Initiation von Entzündungsreaktionen, der reduzierten Bildung von Wachstumsfaktoren, sowie einem Entgegenwirken einer etwaigen Thrombenbildung. [Durante et al, 2005]. Primär ist jedoch festzuhalten, dass es sich bei Kohlenmonoxid um kein Antioxidans handelt, sondern dass es lediglich indirekt unterstützend wirkt bzw. induktiv die Aktivierung antioxidativ wirkender Gene beeinflussen kann. Indirekt bedeutet in diesem Zusammenhang, dass es in der Lage ist Superoxidlevel zu senken bzw. den GSH-Spiegel zu erhöhen und grundlegend anti-apoptotische Effekte ausübt. Auch eine blutdrucksenkende Wirkung wird dem Kohlenmonoxid zugeschrieben (Näheres siehe Kapitel 5.2.1.4) [Abraham & Kappas, 2005].

Die therapeutische Zufuhr von Kohlenmonoxid erfolgt in der Regel exogen, d.h. durch direkte Inhalation und nicht durch Häm-Oxygenase-1-Induktion. Durch diese Kohlenmonoxid-Verabreichung können Gefäßschädigungen bei bestimmten Eingriffen reduziert bis verhindert werden, wie dies zum Beispiel bei *Ballon-Angioplastiken* bereits üblich ist. Diese präventive Maßnahme führt zu einem anhaltenden Schutz der betroffenen Gefäße. Es gilt jedoch zu beachten, dass die Verabreichung einer gesättigten Kohlenmonoxid-Lösung nur kurz vor einem Eingriff effektiv ist und auch dann nur im Rahmen einer bereits stattfindenden Behandlung weitere Schädigungen vermindert [Durante et al, 2005].

#### 5.2.1.3.3. Häm-Abbau-Produkt Bilirubin

Das Wirkungsspektrum des Bilirubins selbst ist in diesem Kontext nicht zu vernachlässigen. Neben seiner LDL-Oxidation bei oxidativem und inflammatorischen Stress bewirkt es unter den entsprechenden physiologischen Zuständen noch eine Reihe von anderen protektiven Phänomenen, wie etwa die Inhibition von Endothelzellschädigungen, die Blockierung der Leukozytenadhäsion und der darauffolgenden Infiltration in die Gefäßwände, sowie das Verhindern einer SMC-Akkumulation durch Induktion der SMC-Apoptose [Durante et al, 2005]. Detaillierter betrachtet, spielt Bilirubin im Besonderen mit Angiotensin II (Ang II) eine

wichtige protektive Rolle, da es die durch oxidativen Stress bedingte gefäßverengende Wirkung dieses Enzyms abschwächen und somit einer Blutdruckerhöhung entgegenwirken kann. [Abraham & Kappas, 2005].

Eine exogene Zufuhr wie beim Kohlenmonoxid könnte auch bei Biliverdin und/oder Bilirubin einen potentiellen neuen therapeutischen Ansatz bei Gefäßschädigungen darstellen, wobei jedoch deren äußerst geringe Bioverfügbarkeit zu berücksichtigen ist. In diesem Zusammenhang sind bisher nur Tierversuche vorzuweisen, die zum Teil vielversprechende Ergebnisse lieferten. So haben Biliverdin-Gaben einen Sättigungseffekt auf ischämisch geschädigte Organe, und hierbei besonders auf das Herz. Des Weiteren kann dem Biliverdin ein Schutz vor arterieller Verengung zugeschrieben werden. Das Hauptproblem bei der Biliverdin/Bilirubin-Applikation stellt jedoch dessen hohes neurotoxisches Potential dar, das nur ein sehr begrenztes therapeutisches Fenster zulässt [Durante *et al*, 2005, Öllinger *et al*, 2005]. Dieser Faktor ist die Hauptursache für fehlende Humanstudien in diesem Forschungsfeld.

Des Weiteren stellt Bilirubin einen sehr spezifischen Schutzfaktor vor Kupfer-induzierter Oxidation dar. Dies ist insofern von Relevanz, als dass sich in atherosklerotischen Läsionen häufig pro-oxidativ wirksames Kupfer ansammelt, das durch interstitielles Bilirubin in seiner Wirkung gebremst wird und somit oxidative Gefäßschädigungen reduziert [Bulmer *et al*, 2008].

#### **5.2.1.4. Bluthochdruck**

Bluthochdruck zählt mit zu den häufigsten Erkrankungen der industrialisierten Länder und ist eng an die Entstehung einer Atherosklerose gekoppelt [Kasper, 2004; Cao *et al*, 2009]. Definiert wird Hypertonie mit einem systolischen Wert zwischen 140-159 mmHg (Stadium 1) bzw. über 160 mmHg (Stadium 2) und einem diastolischen Wert zwischen 90-99 mmHg (Stadium 1) bzw. über 100 mmHg (Stadium 2), wobei je nach Ursache zwischen einer primären und einer sekundären Form (d.i. krankheitsbedingt) unterschieden wird [Kasper, 2004].

Bei Bluthochdruck spielen Biliverdin und Bilirubin eine im Vergleich zum Kohlenmonoxid scheinbar untergeordnete Rolle, wobei es bereits aktuelle Studien zur Co-Aktivität von Bilirubin und anderen körpereigenen Wirkstoffen mit blutdrucksenkender Wirkung gibt [Cao *et al*, 2009]. Kohlenmonoxid im Gegensatz dazu weist einen eindeutig beweisbaren anti-

hypertensiven Effekt auf, der enzymatisch über die Häm-Oxygenase-1 gesteuert wird. Diese Wirkung konnte mehrfach im Tierversuch an Ratten belegt werden, Humanstudien liegen hingegen noch keine vor. Weitere Untersuchungen des Blutdruck-regulierenden Effekts könnten sich medizinisch jedoch als große Gelegenheit herausstellen, als dieser besonders durch enzymatische Induktion therapeutisches Potential aufweist.

Grundlegend ist Kohlenmonoxid in seinen Eigenschaften denen des Stickoxids sehr ähnlich. Beide agieren als Messenger bzw. als Signalmoleküle, besonders im Gefäßsystem, wo sie als Vasodilatoren wirken und auch für die Proliferation der Zellen in der glatten Gefäßmuskulatur mitverantwortlich sind. Demnach ergibt sich die Co-Wirkung dieser beiden Stoffe in Bezug auf die Blutdruckregulierung, die wie bereits erwähnt im Tierversuch erfolgreich untersucht wurde [Abraham & Kappas, 2005].

Des Weiteren kommt Adipopectin in diesem Kontext eine bedeutende Rolle zu. Dabei handelt es sich um ein gewebsspezifisches Hormon des Fettgewebes, das sowohl linderndes als auch präventives Potential aufzuweisen scheint und in zweierlei Form vorkommt (HMW – high-molecular weight; LMW – low-molecular weight). Es wird ein Zusammenwirken von Häm-Oxygenase-I und Adipopectin vermutet, das besonders bei Hypertension zum Ausdruck kommt. Im Tierversuch konnte eine blutdrucksenkende Wirkung von Häm-Oxygenase-I/Adipopectin belegt werden, die durch HO-I-induzierte Ausschüttung von Adipopectin in Adipocyten verursacht wurde [Cao *et al*, 2009].

2007 erkannten Chow *et al*, dass eine Hypoadipopectinämie oftmals einer Bluthochdruckentwicklung voraus geht, wobei ein niederer Spiegel an Adipopectin noch andere anti-hypertensive Effekte bedingt, wie etwa die Aktivierung einer Entzündungsreaktion [Chow *et al*, 2007]. Grundlegend führen niedere Adipopectinspiegel im Fettgewebe zur Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems, was eine Steigerung des Blutdrucks, sowie auch eine Zunahme an Fettgewebe bedingt. Somit kann eine Reduktion des Adipopectins zu diversen Schädigungen am Organismus führen, die als Folgeerscheinung von Hypertension auftreten. Als wichtigste Beispiele seien hier Erkrankungen der Koronararterien, Myocardinfarkt, renale Dysfunktion und Retinopathie genannt [Cao *et al*, 2009].

Auf zellulärer Ebene näher betrachtet, wirkt eine Induktion der Häm-Oxygenase-1 immer in Abhängigkeit des Wirkungsortes. Zum Beispiel führt eine induktive Therapie der Endothelzellen im Bereich der humanen Mikrogefäße zu einer verringerten Wirkung des

TNF $\alpha$  bzw. im Bereich der Nieren zu einer verminderten Ang II-vermittelten DNA-Schädigung. Erhöhte Ang II-Spiegel werden nicht nur mit verschiedenen Formen der Hypertension in Verbindung gebracht, sondern sogar als Hauptursache des oxidativen Stresses im renalen Bereich bezeichnet [Abraham & Kappas, 2005].

### **5.2.1.5. Diabetes mellitus**

#### 5.2.1.5.1. Ätiologie

Bei Diabetes mellitus handelt es sich um eine chronische Stoffwechselerkrankung, von der der gesamte Organismus betroffen ist, d.h. Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel. Grundlegend werden zwei Formen unterschieden, je nachdem ob es sich um einen Insulinmangel (Typ I) oder um eine verminderte Insulinwirkung bzw. Insulinresistenz (Typ II) handelt. Diabetes tritt in der Regel mit mehreren pathologischen Begleiterscheinungen gemeinsam auf, wie etwa Übergewicht, diversen Gefäßerkrankungen, Bluthochdruck und/oder renalen Schädigungen [Biesalski *et al*, 2004].

Eine Insulinresistenz stellt im Grunde genommen einen Schutz der Zelle vor oxidativem Stress dar, indem durch sie eine langanhaltende übermäßige Aufnahme von Glucose und Fettsäuren unterbunden wird, die in weiterer Folge zu oxidativen Schädigungen führen würde. Besonders die pankreatischen  $\beta$ -Zellen und Endothelzellen sind davon betroffen, da sie Glucose Insulin-unabhängig aufnehmen und somit sehr hohe Glucose-Konzentrationen erreicht werden können (vergleiche Kapitel 5.2.1.5.2) [Stephens *et al*, 2009].

Ein direkter Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und Bluthochdruck wird diskutiert, konnte aber bis heute nicht eindeutig belegt werden, auch wenn die vasodilatorischen Effekte des Insulins sehr dafür sprechen. Konkret bezieht sich diese gefäßerweiternde Wirkung auf Gefäße der menschlichen Skelettmuskulatur. Insulin-resistente Individuen weisen häufig eine Gefäßverengung auf, wodurch es aufgrund des erhöhten Blutstromwiderstands langfristig zu Bluthochdruck kommen kann [Cao *et al*, 2009].

#### 5.2.1.5.2. Diabetes und oxidativer Stress

Im Rahmen eines Diabetes kommt es aufgrund der Störungen im Glucose-Stoffwechsel, d.h. der Hyperglykämie zu einer generellen Erhöhung des oxidativen Stresses, der langfristig zu Beschädigungen der Gefäße führt [Abraham & Kappas, 2005]. Aber auch andere Glucose-

unabhängige Faktoren, wie eine erhöhte NADPH-Aktivität führen zu einer Stresserhöhung. Demzufolge wird Diabetes selbst als einer der Hauptfaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen angesehen, was besonders dadurch bestärkt wird, dass erkrankte Individuen durch ein zwei- bis dreimal so hohes Risiko für koronare Herzerkrankungen belastet sind. Ob nun aber der Diabetes selbst wirklich Ursache oder doch das Resultat des oxidativen Stresses ist, ist bis heute unklar [Stephens *et al*, 2009].

Grundlegend steht demnach auch bei dieser Erkrankung besonders die rasche Reduktion des Stresszustandes im Mittelpunkt, wobei wieder die Häm-Oxygenase-1 bzw. deren Produkte Kohlenmonoxid und Bilirubin durch ihren anti-apoptotischen Effekt eine bedeutende Rolle spielen. Deshalb scheint es bei Diabetikern zu einer signifikant erhöhten Expression der Häm-Oxygenase-1-mRNA und darauffolgend des entsprechenden Proteins zu kommen. Eine Normalisierung der Häm-Oxygenase-1-Level mittels Antioxidantien ist jedoch möglich, wobei besonders Vitamin E hohe Effizienz aufweist [Abraham & Kappas, 2005].

Die Gallenfarbstoffe Biliverdin und Bilirubin zeigen beide einen sehr starken Einfluss auf die Erhaltung der Zellintegrität von Endothelzellen, was besonders bei Diabetes aufgrund der erhöhten Stressbelastung zum Tragen kommt. Beide Stoffe können sowohl die Zellen funktionstüchtig erhalten, als auch den Zelltod dieser Strukturen verhindern bzw. hinauszögern. Im Tierversuch an diabetischen Ratten konnte belegt werden, dass bedingt durch die Gallenpigmente einerseits die vaskuläre Reaktivität verbessert und andererseits einer Restenosis entgegen gewirkt wird. Bilirubin ist außerdem in Verdacht die Bioverfügbarkeit von Stickoxid zu erhöhen und damit noch zusätzlich oxidativen Stressparametern entgegen zu wirken, die ansonsten Endothelgewebe schädigen würden. Des Weiteren zählen die Hemmung der Proteinkinase und der NADPH-Oxidase zu den Aufgaben von Bilirubins. Die Pigment-vermittelte Blockade dieser beiden Enzyme könnte eine Häm-Oxygenase-1 vermittelte Abschwächung der durch den Diabetes verstärkten Oxidantien-Bildung darstellen und somit einen umfassenden Schutzmechanismus vor oxidativen Stress verkörpern [Abraham & Kappas, 2005].

#### 5.2.1.5.3. Plasmamarker bei Diabetes-bedingtem oxidativen Stress

Eine rasche Messung der oxidativen Belastung im Plasma stellt immer noch eine medizinisch-therapeutische Herausforderung dar. Als der „Gold-Standard“ wird die Konzentrations-erfassung der F<sub>2</sub>-Isoprostane angesehen, deren Werte bei beiden Diabetes-Typen im

Vergleich zu gesunden Individuen erhöht sind. Bei diesen Isoprostanen handelt es sich um Moleküle, die im Zuge eines Angriffs auf Phospholipidmembranen durch freie Radikale gebildet werden [Stephens *et al*, 2009].

#### **5.2.1.6. Ischämie und Herzinfarkt**

Bei einer Ischämie handelt es sich um eine Sauerstoffunterversorgung (meist Herz oder Gehirn), die oftmals mit einem Infarkt endet. Vitek *et al* diskutieren in diesem Kontext bereits seit mehreren Jahren die potentielle Schutzwirkung eines mäßig erhöhten Bilirubinserumspiegels, wie er etwa beim Gilbert-Syndrom vorkommt. Demnach soll eine anhaltende unkonjugierte Hyperbilirubinämie das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen, insbesondere ischämischer Erscheinungsformen, signifikant senken [Vitek *et al*, 2002; Vitek *et al*, 2005].

Auf biochemischer Ebene wird die Wirkung des Bilirubins oftmals mit jener des HDLs verglichen bzw. gleichgestellt, da es sich bei diesem ebenfalls um eine Art Schutzfaktor vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen handelt. Jedoch scheint Bilirubin den wesentlicheren Faktor dieser beiden darzustellen, da seine mäßig erhöhten Konzentrationen stärker mit einer Risikosenkung für ischämische Herzerkrankungen in Zusammenhang gebracht werden können als dies beim HDL-Cholesterin der Fall ist. Des Weiteren wird postuliert, dass diese erhöhten Spiegel an Gallenpigmenten auch HDL-Apoproteine und andere Lipide vor Oxidation schützen können. Ob diese Wirkung des Bilirubins nun rein synergistisch mit jener des HDL-Cholesterins wirkt, oder als zusätzlicher Schutzparameter angesehen werden kann, ist zurzeit noch unklar. Abgesehen davon wird die Möglichkeit diskutiert, Bilirubinspiegel als Indikator für die Schwere einer arteriellen Koronarerkrankung einzusetzen, da niedrigere Bilirubin-Werte im Gegensatz zu den HDL-Cholesterin-Konzentrationen mit dem Erkrankungsrisiko zu korrelieren scheinen [Vitek *et al*, 2002].

Die Behauptung, dass Gilbert-Syndrom-Patienten besser vor ischämischen Erkrankungen geschützt sind, stützt sich vor allem darauf, dass bei diesen die gesamte antioxidative Aktivität in den Körperflüssigkeiten gesteigert ist und dabei Bilirubin als einziger Standardparameter im Vergleich zu Kontrollpersonen erhöht ist. Mit dieser Erhöhung steigt auch der anti-atherogene Effekt, wie von Benaron *et al* 1991 an hyperbilirubinämischen Kindern belegt konnte. Hierbei ist jedoch anzumerken, dass sich mäßig erhöhte Bilirubin-Werte immer im physiologischen Bereich bewegen. Aussagen über darüber hinausgehende

Steigerungen bezüglich einer Schutzfunktion konnten bis heute nicht gemacht werden [Vítek *et al*, 2002].

Eine weitere interessante Beobachtung in diesem Zusammenhang betrifft Patienten mit einem akuten Myocard-Infarkt, bei denen eine signifikante Erhöhung des unkonjugierten Bilirubins fest gestellt werden konnte. Daraus wurde eine verstärkte Häm-Oxygenase-1-Expression abgeleitet, die somit einen zentralen Schutzmechanismus für akute Stresssituationen darstellt [Vítek *et al*, 2002].

Im Bereich des zentralen Nervensystems hingegen kann sich eine erhöhte Bilirubin-Konzentration rasch zum Negativen auswirken, wenn Bilirubin selbst oxidiert wird während es gleichzeitig aufgrund einer Hirnischämie lokal zu einem sehr starken Anstieg an freien Radikalen kommt. Dies führt zu chronischer Vasokonstriktion, was schwerwiegende Folgeerscheinungen nach sich ziehen kann [Kapitulnik & Maines, 2008].

### 5.2.2. *Gallenfarbstoffe und Krebs*

Über den Zusammenhang von Krebserkrankung und Gallenfarbstoffe gibt es nur wenig wissenschaftlich belegte Erkenntnisse, wobei die Annahme nahe liegt, dass Biliverdin/Bilirubin aufgrund ihrer belegten anti-oxidativen Effekte den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen. Grundlegend ist die Krebsmortalität invers mit der Bilirubin-Konzentration assoziiert, sodass das Risiko an Krebs zu sterben mit zunehmendem Serumbilirubin sinkt [Liu *et al*, 2006]. Serumkonzentrationen könnten somit auch zur Einschätzung des Krebsrisikos eingesetzt werden. Dies bezieht sich vor allem auf Krebsarten, die den Verdauungstrakt und insbesondere den Colon betreffen [Liu *et al*, 2006; Rigato *et al*, 2005].

### 5.2.3. *Gallenfarbstoffe und Erkrankungen des Zentralen Nervensystems*

#### 5.2.3.1. **Plasmapherese als Therapiebestandteil**

Bilirubin führt in erhöhter Konzentration zu diversen toxischen Reaktionen im Organismus, wobei besonders Ablagerungen im Gehirn schwere teils irreversible Folgen nach sich ziehen. Demnach ist es von entscheidender Bedeutung dieses lipophile Endotoxin, das Bilirubin letztendlich ist, so rasch als möglich aus dem Körper zu entfernen. Die häufigste und auch effizienteste Methode dafür besteht in der Hämo-perfusion. Dabei handelt es sich um eine

Reinigung des gesamten Blutes, indem es durch ein extrakorporales System geleitet und anschließend dem Organismus wieder zugeführt wird. In diesem System befindet sich eine Adsorptionseinheit, in der mittels eines Adsorbens das Bilirubin herausgefiltert wird. Üblicherweise werden hierfür Serumalbumin, Tierkohle oder Agar eingesetzt, die jedoch alle ihre Stärken und Schwächen aufweisen [Yang *et al*, 2007]. Neuere Forschungen beschäftigten sich mit der Suche nach besseren geeigneten Adsorbenssubstanzen, von denen zwei in den nachstehenden Kapiteln kurz vorgestellt werden.

#### 5.2.3.1.1. Adsorption auf „Carbon nanotube sheets“

„Carbon nanotube sheets“ stellen ein vielversprechendes neues Adsorbens dar, da deren Adsorptionsfläche im Vergleich zu bisherigen Materialien um ein Vielfaches größer ist und sie außerdem eine graphitähnliche Struktur aufweisen, sodass besonders polycyclische Moleküle gebunden werden können. Diese Methode dient somit zur Erhöhung der Adsorptionskapazität des Bilirubins um dieses in weiterer Folge effizienter aus dem Plasma entfernen.

Cytotoxische Eigenschaften dieser „carbon nanotube sheets“ werden durch Modifikation reduziert indem deren Oberfläche wasserlösliche Eigenschaften bekommt. Ein weiterer Vorteil gegenüber bisheriger Methoden besteht in der Tatsache, dass „carbon nanotube sheets“ kaum bis gar nicht ins Plasma übertreten, wodurch der Organismus nach erfolgter Plasmaphorese eine geringere Sekundärbelastung erfährt [Ando *et al*, 2009].

#### 5.2.3.1.2. Adsorption durch nanokristallines Titan

Eine Adsorption mittels nanokristallinem Titan ( $\text{TiO}_2$ ) weist ebenso wie jene mit „carbon nanotube sheets“ eine Reihe von Vorteilen auf. Diese sind ebenfalls eine vergrößerte Adsorptionsfläche, optische Transparenz, sowie eine leichte Herstellbarkeit verbunden mit chemischer Stabilität ohne toxische Nebenwirkungen. Des Weiteren ist festzuhalten, dass die Adsorption mit steigender Bilirubin-Konzentration steigt und mit steigender Temperatur bzw. mit steigender Ionenstärke sinkt. Außerdem ist die Regenerierung des  $\text{TiO}_2$ -Films mittels UV-Strahlung einfach und rasch durchführbar, wobei jedoch eine Mehrfachverwendung der Filme nur im Labor zugelassen ist. Für klinische Zwecke dürfen  $\text{TiO}_2$ -Filme heutzutage nur einmal angewandt werden [Yang *et al*, 2007].

### **5.2.3.2. Erkrankungen des zentralen Nervensystems im Kontext mit erhöhten Gallenpigmentkonzentrationen**

Im zentralen Nervensystem sind die beiden am Häm-Katabolismus beteiligten Enzyme, die Häm-Oxygenase und die Biliverdin-Reduktase, ebenfalls zu finden. Daraus erfolgen potentielle Einflussmechanismen des Bilirubins auf diverse Erkrankungen im Nervensystem, die in mehreren Studien untersucht wurden. Grundlegend basieren alle diese Krankheiten ebenfalls auf einer Imbalance der pro-oxidativen und anti-oxidativen Effekte, sodass Bilirubin als entsprechendes Stoffwechselprodukt therapeutisches Potential aufweisen könnte [Van Bergen *et al*, 1999]. Eine überblicksmäßige Zusammenfassung der wichtigsten Untersuchungsergebnisse in diesem Kontext ist in den nachstehenden Kapiteln zu finden.

#### **5.2.3.2.1. Unkonjugierte-Bilirubin-Enzephalopathie (UCB)**

Unter dieser Enzephalopathie versteht sich ein Sammelbegriff für neurologische Defizite, die aufgrund eines Kernikterus entstehen. Dies kann infolge eines Anstiegens der Bilirubin-Produktion bzw. durch eine verminderte Bilirubin-Konjugation vorkommen, da es dadurch zu einem Anstieg des stark lipophilen Gallenpigments in der Basalganglia des Gehirns kommt [Kapitulnik & Maines, 2008].

Bilirubin in erhöhter Konzentration stört die Funktion neuronaler Zellen und führt zum Zelltod. Die genaue Pathogenese ist nur zum Teil geklärt, wobei verschiedene neurotoxische Mechanismen in Verdacht stehen. So wird zum Beispiel vermutet, dass die gestörte Glucoseaufnahme und Verwertung, die oxidative Phosphorylierung und/oder eine Störung der mitochondrialen Funktion mitverantwortlich sind [Hachiya & Hayashi; 2008, Doré, 2002; Schipper *et al*, 2006].

#### **5.2.3.2.2. Einflussfaktoren bei Depression bzw. Winterdepression**

Einer der wesentlichsten Hauptfaktoren bei Depressionen besteht in einer reduzierten Verfügbarkeit von Noradrenalin bzw. Serotonin, was besonders bei der Winterdepression zum Tragen kommt. Hierbei leiden Patienten vor allem in der licht-armen Jahreszeit, wobei die Hemmung der Melatonin-Bildung aus Serotonin als Erkrankungsursache definiert ist [Silbernagl & Lang, 1998]. Der mögliche Gallenpigment-Einfluss basiert auf der Annahme, dass zirkulierendes Bilirubin eventuell als Photorezeptor wirkt, sodass dieses aufgrund seiner Ähnlichkeit mit dem Chromophor des Phytochroms den Zeitrhythmus mit beeinflusst.

Bilirubin weist eine maximale Absorption in blauem Licht auf, was direkt mit der Melaninproduktion in Zusammenhang gebracht werden kann. Die Bildung des Melanins beruht auf einem Photorezeptor, der seine maximale Wirksamkeit ebenfalls im blauen Absorptionsbereich hat und durch diesen den Tag-Nacht-Rhythmus des Menschen im Wesentlichen bestimmt [Oren *et al*, 2002].

Grundlegend weisen winterdepressive Patienten niedrigere Serumbilirubinspiegel auf als Kontrollpersonen. Inwieweit es sich dabei um einen tatsächlichen Zusammenhang handelt oder vielleicht nur um ein zufällig synchron auftretendes Phänomen ist noch nicht geklärt. Jedoch führt eine Lichtbehandlung rasch zur Erhöhung erniedrigter Bilirubin-Spiegel, sowie auch unphysiologische hohe Bilirubin-Werte mittels Licht verringert werden können [Oren *et al*, 2002]. Demnach weist Bilirubin bei Winterdepression wahrscheinlich therapeutisches Potential auf, dessen Wirkungsweise gemeinsam mit Hämoglobin mit jener der Tetrapyrrolpigmente in Pflanzen verglichen werden kann [Rigato *et al*, 2005].

#### 5.2.3.2.3. Gallenpigment-beeinflusste Merkmale der Schizophrenie

Schizophrenie stellt eine psychotische Nervenkrankheit dar, bei der es zu Veränderungen der Gedanken, der Wahrnehmung und auch des Verhaltens kommt, da betroffene Individuen oftmals nicht in der Lage sind zwischen Realität und Vorstellung zu unterscheiden. Es handelt sich jedoch um keine multiple Persönlichkeitsstörung. Die Krankheitsursache ist bis heute noch nicht aufgeklärt, jedoch stehen Veränderungen von Signalwegen und den damit verbundenen chemischen Botenstoffen unter Verdacht. Aber auch anatomische Veränderungen des Gehirns gehen mit dieser Erkrankung einher, wobei meist erweiterte Ventrikel und ein verkleinerter Hippocampus beobachtet werden [www.netDoktor.at, 29.08.2009].

Bei Schizophrenie konnte bis heute kein kausaler Zusammenhang zwischen Bilirubin-Plasmaspiegel und Ausprägung der Schizophrenie definiert werden. Jedoch weisen Patienten dieser Erkrankung durchwegs höhere Konzentrationen an Bilirubin auf als Kontrollgruppen, sodass eine Hyperbilirubinämie als Biomarker für die Schwere der Erkrankung herangezogen werden könnte. Außerdem kommt es bei erfolgreicher Behandlung einer Schizophrenie in der Regel zu einer signifikanten Reduktion der Bilirubin-Plasmakonzentration bzw. weisen Patienten mit höherem Bilirubin-Plasmaspiegel stärkere Symptome auf [Rigato *et al*, 2005].

#### 5.2.3.2.4. Morbus Alzheimer

Bei Morbus Alzheimer handelt es sich um eine Erkrankung des Nervensystems, deren Ursache bis heute noch nicht geklärt wurde. Trotzdem sind einige metabolische Veränderungen im Gehirnstoffwechsel bekannt, die möglicherweise zur Krankheitsentstehung bzw. deren Verlauf beitragen. Hierzu zählt unter anderem der Häm-Oxygenase-1-Spiegel, der auch im Gehirn als Stressindikator aufgrund des krankheitsbedingt stark erhöhten oxidativen Stresses fungiert [Infante et al, 2008]. Häm-Oxygenase-1 wird nur in einigen wenigen Regionen des Gehirns exprimiert, die sich hauptsächlich auf den Zerebralcortex und den Hippocampus beschränken. Die Expressionsrate steigt mit dem Alter an, sodass dieser Anstieg Teil der physiologischen Hirnalterung ist. Bei Morbus Alzheimer ist diese natürliche Entwicklung um ein Vielfaches beschleunigt [Schipper, 2004].

Bei der Suche nach Risikoindikatoren wird besonderes Augenmerk auf den erhöhten Cholesterinspiegel im Gehirn gelegt, der eng mit der Expression der Häm-Oxygenase-1 zusammenhängt. Bei einem niedrigen Häm-Oxygenase-1-Spiegel und einer zeitgleich unterdrückten Expression des Leber-X-Rezeptor- $\beta$  kommt es zu einem signifikanten Anstieg bzw. Akkumulation von Cholesterin im Gehirn, wodurch die Amyloid- $\beta$ -Produktion (d.s. senile Plaques) angeregt wird. Amyloid- $\beta$  ist schon seit längerem als Risikofaktor für eine Alzheimer Erkrankung bekannt [Infante et al, 2008]. Andererseits wird auch oftmals von einer übermäßig starken Expression des Häm-Oxygenase-1-Gens in Neuronen mit senilen Plaques berichtet, sodass die Konzentrationsbestimmung dieses einen Enzyms alleine nicht aussagekräftig ist [Kimpura et al, 2000].

In diesem Kontext wird des Weiteren diskutiert, ob überhaupt eine Bilirubin-Produktion im Gehirn stattfindet oder ob der Häm-Oxygenase-1 lokal nicht möglicherweise andere Funktionen zuzuordnen sind. Das Problem hierbei ist, dass die Bilirubin-Konzentration in den Zellen des Nervensystems physiologisch so gering ist, dass sie mit den ansonsten üblichen Detektionsmethoden kaum bestimmt werden kann. Mögliche Optionen stellen die in Kapitel 4.5.6 beschriebene HPLC-Methode oder das ELISA-Verfahren dar, bei denen weitaus präzisere Analyseergebnisse erzielt werden. Kimpura et al beschrieben bereits im Jahr 2000 in einer japanischen Studie, dass der Bilirubin-Level in der zerebrospinalen Flüssigkeit von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu denen von Kontrollpersonen signifikant erhöht ist, ohne dass es zu einer verstärkten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke gekommen war. Daraus wurde abgeleitet, dass es im Alzheimer-erkrankten Nervensystem eine eigene Bilirubin-

Synthese geben muss, die als Antwort auf den lokal auftretenden chronisch oxidativen Stress verstanden wird. Die Messmethode bestand dabei in einer ELISA-Bestimmung anhand zweier monoklonaler anti-Bilirubin-Antikörper [Kimpara *et al*, 2000]. Weitere Untersuchungen hinsichtlich des Bilirubin-Metabolismus und dessen antioxidatives Potential im Gehirn von Alzheimer-Patienten stehen jedoch noch immer aus.

Abgesehen von der Häm-Oxygenase-1-Expression ist auch jene der Häm-Oxygenase-2 für mögliche therapeutische Zwecke in Diskussion. Häm-Oxygenase-2 ist fast ausschließlich in Neuronen zu finden und wird im Gegensatz zur Häm-Oxygenase-1 kontinuierlich exprimiert, sodass eine Beeinflussung der Expressionsrate weitaus diffiziler ist. Jedoch wird bereits seit ein paar Jahren eine Induktion der Häm-Oxygenase-2 diskutiert, die besonders in Bezug auf Therapien von akuten bzw. chronischen neurodegenerativen Störungen, wie Schädeltrauma, Morbus Alzheimer oder Schlaganfall interessant werden kann [Doré, 2002]. Studien mit anwendbaren Induktionsmöglichkeiten werden noch erwartet.

Auffällig bei Untersuchungen der Gehirnregionen von Alzheimer-Patienten ist, dass es anfänglich auf Basis der Neuronen kaum Unterschiede in Bezug auf die Häm-Oxygenase-1-Expression und auch andere für diese Erkrankung typische Merkmale im Vergleich zu Individuen mit leichten kognitiven Störungen bzw. physiologischer Altersdemenz gibt. Demnach könnte es sich bei Morbus Alzheimer, vereinfacht ausgedrückt, um einen beschleunigten Alterungsprozess des zentralen Nervensystems handeln [Schipper *et al*, 2006]. Die Suche nach der Beschleunigungs- und somit Krankheitsursache beschäftigt viele Wissenschaftsrichtungen schon seit Jahren.

#### 5.2.3.2.5. Morbus Parkinson

Bei Morbus Parkinson handelt es sich ähnlich wie bei Morbus Alzheimer um eine neurodegenerative Erkrankung unbekanntes Ursprungs, die jedoch auf einer fortschreitenden Degeneration dopaminerger Neuronen in der Substantia nigra basiert. Interessant ist, dass es im Zuge der Pathogenese zu einer stark vermehrten Expression der Häm-Oxygenase-1 in dieser Hirnregion kommt, die vermutlich als Antwort auf den lokal verstärkt erhöhten oxidativen Stress auftritt. Inwieweit diese Beobachtung tatsächlich therapeutisches Potential aufweist bzw. ob Gallenpigmenten dabei eine Rolle spielen, muss in den kommenden Jahren noch intensiv erforscht werden [Schipper, 2004].

#### 5.2.3.2.6. Multiple Sklerose

Bei Multiple Sklerose handelt es sich vermutlich um eine inflammatorische Autoimmunerkrankung, bei der es zur Demyelinisierung von Zellen im zentralen Nervensystem kommt. Die konkrete Ätiologie konnte bis heute wissenschaftlich nicht belegt werden, jedoch wird ein enger Zusammenhang der Pathogenese mit oxidativem Stress angenommen, wie dies auch bei Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson der Fall ist.

Als möglichen Ansatzpunkt für eine potentielle Therapie wird der Biliverdin-Reduktase großes Potential zugesprochen, da sie die Bildung des anti-oxidativ wirksamen Bilirubins wesentlich mitsteuert. Die Biliverdin-Reduktase regeneriert zu Biliverdin oxidiertes Bilirubin in einem katalytischen Kreislauf, sodass der antioxidative Schutz dauerhaft aufrechterhalten werden kann. Im Vergleich mit dem Einsatz anderer Antioxidantien im therapeutischen Sinn konnte die Biliverdin-Reduktase den größten Effekt vorweisen. Sie bewirkte bei MS-Patienten eine Reduktion der freien Radikale in den betroffenen Gehirnregionen ohne die Bilirubin-Konzentration signifikant zu erhöhen [Liu *et al*, 2006].

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

---

Gallenpigmente sind Produkte des Häm-Katabolismus, die einige positive Effekte sowohl auf den gesunden, als auch den kranken Organismus ausüben. Die Bildung wird durch diverse Faktoren bestimmt, wie etwa Stresszustand oder freies Eisen. Die Häm-Oxygenase stellt dabei das limitierende Enzym dar, durch dessen Aktivität es zur Bildung von Biliverdin kommt, das durch die Biliverdin-Reduktase weiter zu Bilirubin reduziert wird.

Bilirubin wird zum Großteil ausgeschieden, übernimmt jedoch bei Bedarf vielfältige Funktionen, die besonders dem Schutz vor Schädigung bedingt durch oxidativen Stress dienen. So wirkt es zum Beispiel der Entstehung von Atherosklerose entgegen, indem es die endotheliale Dysfunktion hemmt bzw. den oxidativen Stresszustand im Gehirn bei neurodegenerativen Erkrankungen reduziert. Ein möglicher Therapieansatz zur Steigerung des Bilirubins besteht in einer gezielten Induktion der Häm-Oxygenase, sodass spezifischen Krankheitsbildern entgegengewirkt werden kann. Ein Beispiel hierfür wäre die Adinopfectionsteigerung, die über eine Häm-Oxygenase-1-Induktion zur vermehrten Bildung von Bilirubin und damit zur Senkung des Blutdrucks führt. Hinzu kommt, dass der Plasmaspiegel potentiell als Diagnosemarker für kardiovaskuläre Erkrankungen oder möglicherweise auch für Morbus Alzheimer dienen kann.

Problematisch an der Erforschung des Bilirubins als Therapieansatz ist der enge Grad zwischen positivem Nutzen und starker lipophiler Toxizität, die zu schweren Schädigungen, besonders in Gehirn und Leber, führt. Des Weiteren, handelt es sich bei kardiovaskulären und neurodegenerativen Erkrankungen um sehr komplexe Krankheitsbilder, sodass mehrere Ursachen, sowie synergistische Wirkungen verschiedener antioxidativer Mechanismen beachtet werden müssen.

Auch der Nachweis bzw. die Analyse von Gallenpigmenten stellt wissenschaftlich eine gewisse Herausforderung dar, da Biliverdin/Bilirubin sehr empfindlich für Licht und Sauerstoff sind, sowie in unterschiedlichen pH-Bereichen verschiedene Reaktionen zeigt. Hinzu kommt, dass die physiologische Konzentration relativ niedrig ist und somit sehr genaue Analysemethoden voraussetzt. Neuere Methoden, die sich bei der Bestimmung von niedrigeren Konzentrationen etabliert haben sind unter anderem die HPLC oder verschiedene Plasmapherese-Varianten.

Zusammenfassend kann den Gallenpigmenten Biliverdin und Bilirubin antioxidatives Potential zugesprochen werden, das besonders bei Erkrankungen, wie der Atherosklerose, Krebs und auch eventuell bei verschiedenen neurodegenerativen Störungen positiv auf den Organismus wirkt. Jedoch sind noch Studien zur gezielten Anwendung (durch Enzyminduktion oder Verabreichung) ausständig, die sich aufgrund der hohen Toxizität des Bilirubins als Herausforderung darstellen.

## 7. SUMMARY

---

Bile pigments are products of heme-catabolism that show several positive effects on healthy as well as ill organisms. Its formation is influenced by various factors, such as oxidative stress or free iron. The limiting-factor in this context is defined by the heme-oxygenase an enzyme that converts hemoglobin into biliverdin which is then metabolized into bilirubin by biliverdin-reductase.

Although bilirubin is mainly excreted in large parts, it can be a potent antioxidant. As an example bilirubin counteracts atherosclerosis by inhibiting endothelial dysfunction or by reducing oxidative stress in brain tissue at neurodegenerative diseases. So a possible approach in therapy of such diseases might be an increase of bilirubin production through targeted induction of heme-oxygenase. For instance, it is known that an increase in adinopectin leads to a decrease of blood pressure due to the heme-oxygenase-1-induction that causes an increased formation of bilirubin. Furthermore, the plasma level of bilirubin might be used for diagnostic purposes for cardiovascular diseases as well as for some neurologic disorders, such as Morbus Alzheimer in future.

But research on bilirubin as therapeutical approach shows one major problem – there is just a narrow window between its positive effects and its lipophilic toxicity that leads to heavy impairments, especially in brain and liver. Another difficulty in this context is the complexity in the formation of cardiovascular as well as neurodegenerative diseases, which requires consideration of diverse mechanisms and synergistic effects of antioxidative processes.

Detection and analysis of bile pigments also show some limitations as these molecules are very sensitive to light and oxygen. Besides that, different reactions take place depending on the local pH-value. On top of that physiologic concentrations usually are rather low, so that very precise analysis techniques are required, as for instance HPLC or some plasma-pheretic approaches.

Summarizing all of these facts, the bile pigments biliverdin and bilirubin show antioxidative potential that is especially effective to prevent cardiovascular diseases, cancer and possibly some neurodegenerative disorders. But still, the direct prove and the therapeutical

implementation (via enzyme-induction or application) is necessary which will be a scientific challenge due to the strong toxicity of bilirubin.

---

## 8. QUELLENVERZEICHNIS

---

- Abraham, Nader G.; Kappas, Attallah (2005): *Heme oxygenase and the cardiovascular-renal system*. In: *Free Radical Biology & Medicine* 39 p. **1-25**.
- Abraham, Nader G.; Kappas, Attallah (2008): *Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase*. In: *Pharmacological Review* 60 p. **79-127**.
- Agati, G.; Fusi, F.; Pratesi, S.; Galvan, P.; Donzelli, G. (1998): *Bilirubin photoisomerization products in serum and urine from a Crigler-Najjar type I patient treated by phototherapy*. In: *Journal of Photochemistry and Photobiology* 47 p. **181-189**.
- Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (2004): *Molekularbiologie der Zelle – Kapitel 23.2 Die vermeidbaren, exogenen Ursachen von Krebs*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, 4. Auflage p. **1551**.
- Ando, K.; Shinke, K.; Yamada, S.; Koyama, T.; Takai, T.; Nakaji, S.; Ogino, T. (2009): *Fabrication of carbon nanotube sheets and their bilirubin adsorption capacity*. In: *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. doi: **10.1016/j.colsurfb.2009.02.017**
- Becker, J.C; Grosser, N.; Boknik, P.; Schröder, H.; Domschke, W.; Pohle, T. (2003): *Gastroprotection by vitamin C – a heme oxygenase-1-dependet mechanism?* In: *Biochemical and Biophysical Research Communication* 312 p. **507-512**.
- Bélangier, S.; Lavoie, J.-C.; Chessex, P. (1997): *Influence of Bilirubin on the antioxidant capacity of plasma in newborn infants*. In: *Biology of the neonate* 71 p. **233-238**.
- Benaron, D.A.; Bowen, F.W. (1991): *Variation of initial serum bilirubin rise in newborn infants with type of illness*. In: *Lancet* 338 p. **78-81**.
- Bulmer, Andrew C.; Blanchfield, Joanne T.; Coombes, Jeff, S.; Toth, Istvan (2008): *In vitro permeability and metabolic stability of bile pigments and the effects of hydrophilic and lipophilic modification of biliverdin*. In: *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16 – p. **3616-3625**.

- 
- Bulmer, Andrew C.; Blanchfield, Joanne T.; Toth, Istvan; Fassett, Robert G.; Coombes, Jeff S. (2008): *Improved resistance to serum oxidation in Gilbert's syndrome: A mechanism for cardiovascular protection*. In: *Atherosclerosis* 199 **p. 390-396**.
- Bulmer, A.C.; Ried, J.S.; Blanchfield, J.T.; Wagner, K.-H. (2007a): *The anti-mutagenic properties of bile pigments*, *Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res.*, doi:10.1016/j.mrrev.2007.05.001
- Bulmer, A.C.; Ried, K.; Coombes, J.S.; Blanchfield, J.T.; Toth, I.; Wagner, K.-H. (2007b): *The anti-mutagenic and antioxidant effects of bile pigments in the Ames Salmonella test*. In: *Mutation Research* 629 **p. 122-132**.
- Cao, J.; Inoue, K.; Li, X.; Drummond, G.; Abraham, N. (2009): *Physiological significance of heme oxygenase in hypertension*. In: *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 **p. 1025-1033**.
- Chow, W.S., Cheung, B.M., Tso, A.W., Xu, A., Wat, N.M., Fong, Ch.H. (2007): *Hypoadiponectinemia as a predictor for the development of hypertension: a 5-year prospective study*. In: *Hypertension* 49 **p. 1455-1461**.
- Colpaert, E.; Timmermans, J.P.; Lefebvre R. (2002): *Immunohistochemical localization of the antioxidant enzymes biliverdin reductase and heme oxygenase-2 in human and pig gastric fundus*. In: *Free Radical Biology and Medicine* 32/7 **p. 630-637**.
- Doré, S. (2002): *Serial Review: Causes and Consequences of Oxidative Stress in Alzheimer's Disease*. In: *Free Radical Biology & Medicine* Vol. 32 **pp. 1276-1282**.
- Durante, William; Johnson, Fruszina K.; Johnson, Robert A. (2005): *Targeting heme oxygenase-1 in the treatment of atherosclerosis*. In: *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* Vol. 2 No. 3 **p. 201-206**.
- Elliott, W.H. & Elliott D.C. (2001): *Biochemistry and Molecular Biology*. Second Edition. Oxford University Press. **p. 282f**.
- Elmadfa, I., Leitzmann, C. (2004): *Ernährung des Menschen*. 4. Auflage. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart. **p. 301f**.
- Faxon, D. P. et al (2004): *Atherosclerosis vascular disease conference. Writing group III: pathophysiology*. In: *Circulation* 109 **pp. 2617-2625**.

- Fretzayas, A.; Kitsiou, S.; Papadopoulou, A.; Nicolaidou, P. (2007): *Clinical expression of co-inherited Dubin-Johnson and thalassaemic heterozygous states*. In: *Digestive and Liver Disease* 39 p. **369-374**.
- Goncharova, I.; Urbanová, M. (2007): *Bile pigment complexes with cyclodextrins: electronic and vibrational circular dichroism study*. In: *Tetrahedron: Asymmetry* 18 p. **2061-2068**.
- Hachiya, Y.; Hayashi, M. (2008): *Bilirubin encephalopathy: A study of neuronal subpopulations and neurodegenerative mechanisms in 12 autopsy cases*. In: *Brain & Development* 30 p. **269-278**.
- Halldorsdottir, Anna M.; Grenache, David G.; Snyder, Jennifer; Chowning, Russell T.; Gronowski, Ann M. (2008): *Comparison of various methods for amniotic fluids deltaOD450 bilirubin measurement*. In: *Clinica Chimica Acta* 389 p. **160-163**.
- Hunt, S.; Kronenberg, F.; Eckfeldt, J.; Hopkins, P.; Heiss, G. (2001): *Association of plasma bilirubin with coronary heart disease and segregation of bilirubin as a major gene trait: the NHLBI family heart study*. In: *Atherosclerosis* 154 p. **747-754**.
- Infante, J.; Rodríguez-Rodríguez, E.; Mateo, I.; Llorca, J.; Vázquez-Higuera, J.L.; Berciano, J.; Combarros, O. (2008): *Gene-gene interaction between heme oxygenase-1 and liver X receptor- $\beta$  and Alzheimer's disease risk*. In: *Neurobiology of Aging*. Doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.025.
- Iyanagi, T.; Emi, Y.; Ikushiro, S. (1998): *Biochemical and molecular aspects of genetic disorders of bilirubin metabolism*. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1407 p. **173-184**.
- Kahn, M.; Muzammil, S.; Tayyab, S. (2000): *Role of salt bridge(s) binding and photoconversion of bilirubin bound to high affinity site on human serum albumin*. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1479 p. **103-113**.
- Kamisako, T.; Leier, I. (2001): *Characterization of ATP-dependent monoglucuronosyl bilirubin transport across rat canicular membrane vesicles*. In: *Hepatology Research* 19 p. **103-107**.
- Kapitulnik, J.; Maines, M.D. (2008): *Pleiotropic functions of biliverdin reductase: cellular signaling and generation of cytoprotective and cytotoxic bilirubin*. In: *Trends in Pharmacological Sciences* Vol. 30 No. 3 p. **129-137**.

- 
- Kasper, Heinrich (2004): *Ernährungsmedizin und Diätetik*. Urban & Fischer. **p. 302f**,
- Kim, Y.-S.; Doré, S. (2005): *Catalytically inactive heme oxygenase-2 mutant is cytoprotective*. In: *Free Radical Biology & Medicine* 39 **p. 558-564**.
- Lee, W.; Mchiernan, P.; Preece, M. Baty, D.; Kelly, D., Burchell, B., Clarke, D. (2001): *Bile bilirubin pigment analysis in disorders of bilirubin metabolism in early infancy*. In: *Arch. Dis. Child* 85/1 **p. 38-42**.
- Liu, Y.; Liu, J.; Tetzlaff, W.; Paty, D.W.; Cynader, M.S. (2006): *Biliverdin reductase, a major cytoprotectant, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis*. In: *Free Radical Biology & Medicine* 40 **p. 960-967**.
- Liu, Y.; Zhu, B.; Wang, X.; Luo, L.; Li, P., Paty, D.; Cynader, M. (2003): *Bilirubin as a potent antioxidant suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the role of oxidative stress in the development of multiple sclerosis*. In: *Journal of Immunology* 139 **p. 27-35**.
- Löffler, G., Petrides, Petro E., Heinrich, Peter C. (2007): *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Medizin Verlag, 8. Auflage **p. 509, 621-626**.
- MacLean, P.; Drake, E.C.; Ross, L.; Barclay, E. (2007): *Bilirubin as an antioxidant in micelles and lipid bilayers: Its contribution to the total antioxidant capacity of human blood plasma*. In: *Free Radical Biology & Medicine* 43 **p. 600-609**.
- Madhavan, M; Wattigney, W.; Srinivasan, S.; Berenson, G. (1997): *Serum bilirubin distribution and its relation to cardiovascular risk in children and young adults*. In: *Atherosclerosis* 131 **p. 107-113**.
- Maes, O.C.; Kravitz, S.; Mawal, Y.; Su, H.; Liberman, A.; Mehindate, K.; Berlin, D.; Sahlas, D.J.; Chertkow, H.M.; Bergman, H.; Melmed, C.; Schipper, H.M. (2006): *Characterization of  $\alpha$ 1-antitrypsin as a heme oxygenase-1 suppressor in Alzheimer plasma*. In: *Neurobiology of Disease* 24 **p. 89-100**.
- Maines, Mahin D. & Gibbs, Peter, E.M. (2005): *30 some years of heme oxygenase: From a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events*. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338. **p. 568-577**.

- Minetti, M.; Mallozzi, C.; Di Stasi, A.M.M.; Pietraforte, D. (1998): *Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma*. In: Archives of Biochemistry and Biophysics Vol. 352 No. 2 April 15 **pp. 165-174**.
- Öllinger R.; Bilban, M.; Erat, A.; Froio, A.; McDaid, J.; Tyagi, S.; Csizmadia, E.; Garca-Souza, A.V.; Soares, M.P.; Otterbein, L.E.; Usheva, A.; Yamashita, K.; Bach, F.H. (2005): *Bilirubin – A Natural Inhibitor of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation*. In: CIRCULATION - Journal of the American Heart Association. August 16, 2005 **p. 1030-1039**.
- Oren, D. (1997): *Bilirubin, REM sleep and phototransduction of environmental time cues. A hypothesis*. In: Chronological International 14/3 **p. 319-329**.
- Oren, D.; Desan, P.; Boutros, N.; Anand, A.; Charney, D. (2002): *Effects of light on low nocturnal bilirubin in winter depression: a preliminary report*. In: Biological Psychiatry 51 **p. 422-425**.
- Padayatty, S., Katz, A., Wang, Y., Eck, P., Kwon, O., Lee, J., Chen, S., Corpe, C., Dutta, A., Levine, M. (2003): *Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention*. In: J Am Coll Nutr 22 **p. 20f**.
- Rigato, I.; Ostrow, J.D.; Tiribelli, C. (2005): *Bilirubin and the risk of common non-hepatic diseases*. In: TRENDS in Molecular Medicine Vol. 11 No. 6 June 2005 **p. 277-283**.
- Roche Lexikon Medizin (1999) Urban & Fischer Verlag, 4. Auflage.
- Ryter, S.; Tyrrell, R. (2000): *The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity*. In: Free Radical Biology and Medicine 28/2 **p. 289-309**.
- Schipper, Hyman M.; Bennett, David A.; Liberman, Adrienne, Bienias, Julia L.; Schneider, Julia A.; Kelly, Jeremiah; Arvanitakis, Zoe (2006): *Glial heme oxygenase-1 expression in Alzheimer disease and mild cognitive impairment*. In: Neurobiology of Aging 27 **p. 252-261**.
- Schipper, Hyman M. (2004): *Heme Oxygenase Expression in Human Central Nervous System Disorders – Serial Review: Heme Oxygenase in Human Diseases*. In: Free Radical Biology & Medicine, Vol. 37, No. 12. **pp. 1995-2011**.
- Schwertner, Harvey A. & Vitek, Libor (2008): *Gilbert Syndrome, UGT1A1\*28 allele and cardiovascular disease risk: Possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin*. In: Atherosclerosis 198 **p. 1-11**.

- Sedlak, T.W., Snyder, S.H. (2004): *Bilirubin benefits: cellular protection by a biliverdin reductase antioxidant cycle*. In: *Pediatrics* 113 **p. 1776-1782**.
- Sies, H. (1997): *Oxidative stress: oxidants and antioxidants*. In: *Experimental Physiology* 82. **p. 291ff.**
- Silbernagl, S., Lang, F. (1998): *Taschenatlas der Pathophysiologie*. Thieme Verlag Stuttgart.
- Smirnoff, N. (2001): *L-Ascorbic acid biosynthesis*. In: *Vitam Horm* 61 **p. 249**.
- Snyder, S.; Baranano, D. (2001): *Heme oxygenase: a font of multiple messengers*. In: *Neuropsychopharmacology* 25/3 **p. 294-299**.
- STATISTIK AUSTRIA, Todesursachenstatistik. Erstellt am: 16.06.2008.
- Stephens, J.W.; Bain, S.C.; Humphries, S.E. (2008): *Gene-environment interaction and oxidative stress in cardiovascular disease*. In: *Atherosclerosis* 200 **p. 229-238**.
- Stephens, J.W.; Khanolkar, M.P.; Bain, S.C. (2009): *The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease*. In: *Atherosclerosis* 202 **p. 321-329**.
- Stocker, R. (2004): *Antioxidant activities of bile pigments*. In: *Antioxidative Redox Signal*. 6 Review **p. 841-849**.
- Stocker, R.; McDonagh, A.; Glazer, A., Ames, B. (1990): *Antioxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin*. In: *Methods in Enzymology* 186/31 **p. 301-309**.
- Stocker, R.; Ames, B. (1987): *Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 84 **p. 8130-8134**.
- Stocker, R.; Yamamoto, Y.; McDonagh, A.F.; Glazer, A.N., Ames, B.N. (1987): *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance*. In: *Science* 235 **p. 1043-1046**.
- Tomaro, M.; Battle, A. (2002): *Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress*. In: *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 34 **p. 216-220**.

- Van Bergen, P.; Rauhala, P.; Spooner, C.; Chiueh, C. (1999): *Hemoglobin and iron-evoked oxidative stress in the brain: protection by bile pigments, manganese and S-nitrosoglutathione*. In: *Free Radical Research* 31 p. **631-640**.
- Vertuani, S., Angusti, A., Manfredini, S. (2004): *The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview*. In: *Curr. Pharm. Des.* p. **1679**.
- Vítek, L.; Jirsa, M.; Brodanova, M.; Kalab, M.; Marecek, Z.; Danzig, V.; Novotny, L.; Kotal, P. (2002): *Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels*. In: *Atherosclerosis* 160 p. **449-456**.
- Vítek, L.; Zelenka, J.; Zadinová, M.; Malina, J. (2005): *The impact of intestinal microflora on serum bilirubin levels*. In: *Journal of Hepatology* 42 p. **238-243**.
- Wang, W.W.; Smith, D.L.; Zucker, S.D. (2004): *Bilirubin inhibits iNOS expression and NO production in response to endotoxin in rats*. In: *Hepatology* 40 p. **424-433**.
- Yao, J; Reddy, R.; van Kammen, D. (2000): *Abnormal age-related changes of plasma antioxidant proteins in schizophrenia*. In: *Psychiatry research* 97 p. **137-151**.
- Zelenka, J.; Leníček, M.; Muchová, L.; Jirsa, M.; Kudla, M.; Balaz, P.; Zadinová, M.; Ostrow, J.D.; Wong, R.J.; Vítek, L. (2008): *Highly sensitive method for quantitative determination of bilirubin in biological fluids and tissues*. In: *Journal of Chromatography B* 867 p. **37-42**.

[www.netDoktor.at](http://www.netDoktor.at), 29.08.2009

## ABBILDUNGEN

Abbildung 1 – Strukturformel von Glutathion

Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Glutathion> (29.8.2009)

Abbildung 2 – Strukturformel von Bilirubin

Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Bilirubin> (29.08.2009)

Abbildung 3 – Strukturformel der L-Ascorbinsäure

Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Ascorbinsäure> (29.08.2009)

Abbildung 4 – Strukturformeln der Tocopherole & Tocotrienole

Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Tocopherol> (29.08.2009)

Abbildung 5 – Strukturformeln von Biliverdin, Bilirubin und Bilirubin Ditaurat

Quelle: Bulmer, A.C.; Ried, K.; Coombes, J.S.; Blanchfield, J.T.; Toth, I.; Wagner, K.-H. (2007b): *The anti-mutagenic and antioxidant effects of bile pigments in the Ames Salmonella test*. In: Mutation Research 629

Abbildung 6 – Häm-Molekül

Quelle: [http://images.google.de/imgres?imgurl=http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chemie-mediziner-neu/heterocyclen/bilder/haem.gif&imgrefurl=http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chemie-mediziner-neu/heterocyclen/porphyrine.html&usq=\\_\\_lkseXQolvJJauOiT4Yt\\_A4-ihIE=&h=265&w=247&sz=5&hl=de&start=5&tbnid=zTOp13YpnAyPwM:&tbnh=112&tbnw=104&prev=/images%3Fq%3DH%25C3%25A4m%26hl%3Dde%26rlz%3D1B3GGGL\\_deAT242AT262%26sa%3DG](http://images.google.de/imgres?imgurl=http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chemie-mediziner-neu/heterocyclen/bilder/haem.gif&imgrefurl=http://www2.chemie.uni-erlangen.de/projects/vsc/chemie-mediziner-neu/heterocyclen/porphyrine.html&usq=__lkseXQolvJJauOiT4Yt_A4-ihIE=&h=265&w=247&sz=5&hl=de&start=5&tbnid=zTOp13YpnAyPwM:&tbnh=112&tbnw=104&prev=/images%3Fq%3DH%25C3%25A4m%26hl%3Dde%26rlz%3D1B3GGGL_deAT242AT262%26sa%3DG) (vom 28.1.2009)

Abbildung 7 – Angriffsstellen für die Bilirubin-Glukuronierung

Quelle: Ryter, S; Tyrrell, R. (2000): *The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity*. In: Free Radical Biology & Medicine 28/2.

## 9. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abbildung 1 – Strukturformel von Glutathion.....	12
Abbildung 2 – Strukturformel von Bilirubin .....	13
Abbildung 3 – Strukturformel der L-Ascorbinsäure.....	13
Abbildung 4 – Strukturformeln der Tocopherole & Tocotrienole .....	14
Abbildung 5 – Strukturformeln von Biliverdin, Bilirubin und Bilirubin Ditaurat.....	16
Abbildung 6 – Häm-Molekül .....	20
Abbildung 7 – Angriffsstellen für die Bilirubin-Glucuronierung .....	21

## 10. TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 1 – Zellschützende Eigenschaften der Gallenpigmente im gesunden Organismus ...	33
Tabelle 2 – Zellschützende Eigenschaften der Gallenpigmente im kranken Organismus.....	43

## 11. CURRICULUM VITAE

---

### Mag. Katharina THEILER

Geboren am 28. Juni 1983 in Wien  
Familienstand ledig/1 Kind (geboren im Mai 2007)  
Adresse Gasteigergasse 3/12  
A-1200 Wien  
Telefon +43 (0)650/98 28 957  
E-Mail [katharina\\_theiler@hotmail.com](mailto:katharina_theiler@hotmail.com)

---

### Ausbildung

seit Oktober 2003 Diplomstudium der Ernährungswissenschaften  
Wahlfach: Ernährungsökonomie  
Universität Wien

Oktober 2002 -  
September 2007  
5. September 2007 Diplomstudium der Biologie/Anthropologie  
Wahlfach: Humanethologie  
Hochschulabschluss:  
Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat)  
Universität Wien

September 1997 -  
Juni 2002  
10. Juni 2002 Höhere Lehranstalt für wirtschaftliche Berufe  
Schwerpunkt: Kulturtourismus  
Reifeprüfung  
Wassermannngasse 12  
1210 Wien

September 1993 -  
Juni 1997 Gymnasium  
Franklinstraße 21  
1210 Wien

---

## Berufserfahrung

Seit 8. Juni 2009                      Qualitätsmanagement/Labor  
Almdudler-Limonade A. & S. Klein GmbH & Co KG  
Grinzinger Allee 16  
A-1190 Wien

## Praktika

1. August 2007 –                      Ernährungsberatung  
30. September 2007                Lifestyle Palace  
Schnirchgasse 12  
A-1030 Wien

1. August 2006 –                      Online Coaching  
31. August 2006                      xx-well.com AG  
Chausseestraße 8  
D-10115 Berlin

1. Juni 2000 –                          Praktikum – Küche  
31. August 2000                      Café-Restaurant RESIDENZ  
Schloß Schönbrunn  
A-1120 Wien

## Studienjobs

1. Oktober 2005 –                      Museumsaufsicht  
31. Dezember 2006                Kunsthistorisches Museum  
Maria-Theresien-Platz  
1010 Wien

1. April 2004 –                        Telefonumfragen  
31. Mai 2004                          Consent Marktforschung  
1140 Wien

1. September 2002 –                Schauraumaufsicht  
30. September 2002                Schloß Schönbrunn  
1200 Wien

---

## Sprachkenntnisse

### Englisch

März 2006	IELTS (International English Language Testing System) University of Cambridge
Juni 2002	BEC Higher (Business English Certificate Higher) University of Cambridge Local Examinations Syndicate

### Französisch

Juni 2002	TEF (Test d'évaluation de Français) Chambre de commerce et d'industrie de Paris
-----------	---

---

## Zusatzqualifikationen

### EDV

April 2002	ECDL (European Computer Driving License)
------------	---

### Wirtschaft

Dezember 2008	EBC*L (Europäischer Wirtschaftsführerschein) Stufe B
Mai 2008	EBC*L (Europäischer Wirtschaftsführerschein) Stufe A