



MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Einfluss einer einmaligen Fahrrad-Challenge auf das antioxidative
Potenzial von Personen mit Gilbert-Syndrom

verfasst von | submitted by

Donia Faraj-Allah BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of

Magistra pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien | Vienna, 2024

Studienkennzahl lt. Studienblatt |

UA 066 605

Degree programme code as it appears on the
student record sheet:

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree

Masterstudium Pharmazie

programme as it appears on the student record
sheet:

Betreut von | Supervisor:

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

Genderhinweis

Für eine leichtere Lesbarkeit werden in der vorliegenden Arbeit die männlichen Begriffe bei personenbezogenen Pronomen und Substantiven verwendet. Im Sinne einer genderneutralen Schreibweise sind demnach die verwendeten männlichen Begriffsformen für alle Geschlechter gleichermaßen zu verstehen und stellen keine Wertung oder Diskriminierung der nicht-genannten Form dar. Im Studienkollektiv waren sowohl Frauen als auch Männer vertreten.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen Menschen bedanken, die sowohl fachlich als auch menschlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Zuerst gebührt mein Dank Univ.-Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit und die Möglichkeit diese Arbeit zu verfassen.

Ebenfalls möchte ich mich bei Laura Bragagna, Dipl.-Ing. bedanken, die während der gesamten Laborarbeit und dem Schreiben dieser Arbeit eine großartige Unterstützung war.

Weiters möchte ich mich bei Tamara Stelzer, MsC, die mit ihrer unermüdlichen Hingabe die gesamte Studie durchgeführt hat und sämtliche Daten bereitgestellt hat.

Ganz besonders möchte ich bei meiner Familie – vor allem bei meiner Mutter – und all meinen Freunden bedanken, die stets an meiner Seite stehen und mich mit aller Kraft bestärken und ermutigen.

Inhaltsverzeichnis

Genderhinweis	I
Danksagung.....	II
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
2 Literatur	2
2.1 Physiologie von Bilirubin.....	2
2.1.1 Struktur von Bilirubin	3
2.1.2 Transport von Bilirubin	3
2.1.3 Antioxidatives und antiinflammatorisches Potenzial des Bilirubins.....	5
2.1.4 Physiologische Konzentrationen von Bilirubin.....	7
2.2 Pathophysiologie des Bilirubinstoffwechsels.....	7
2.2.1 Hyperbilirubinämie	7
2.2.2 Morbus Meulengracht / Gilbert Syndrom	8
2.3 Oxidativer Stress	11
2.3.1 Bildung freier Sauerstoff- und Stickstoffspezies.....	11
2.3.2 Messung von oxidativem Stress	13
2.4 ROS-induzierte Schädigungsmechanismen	13
2.4.1 Lipidperoxidation	14
2.4.2 Proteinoxidation	14
2.4.3 Nukleinsäureoxidation.....	15
2.5 Exogene und endogene Schutzfaktoren	15
2.5.1 Superoxiddismutase (SOD)	16
2.5.2 Katalase (KAT)	17
2.5.3 Glutathionperoxidase.....	17
2.5.4 Alpha-Liponsäure (ALA)	17
2.5.5 Coenzym Q10.....	18
2.5.6 Vitamine	18

2.6	Oxidativer Stress und sportliche Aktivität	19
3	Methodik	21
3.1	Studiendesign	21
3.2	Rekrutierung und Zuteilung von Studienteilnehmenden.....	22
3.2.1	Ein- und Ausschlusskriterien.....	22
3.2.2	Studienteilnehmende	23
3.2.3	Untersuchungsdurchführung und Studienverlauf.....	24
3.2.4	Ablauf der Exercise Challenge	24
3.2.5	Blutaufbereitung	24
3.3	Messmethode FRAP	25
3.4	Materialien.....	26
3.4.1	Probenaufbereitung	26
3.4.2	Geräte und Einstellung	27
3.4.3	Lösungsherstellung.....	30
3.4.4	Untersuchungsdurchführung	31
3.4.5	Auswertung	34
3.5	Datenmanagement und -sicherheit	34
3.6	Statistische Analysen.....	35
3.6.1	Deskriptive Statistik	35
3.6.2	Inferenzstatistik	35
4	Ergebnisse	38
4.1	Stichprobe.....	38
4.2	Analyseresultate	41
5	Diskussion.....	47
5.1	Limitationen	48
6	Abstract	49
7	Summary	50
8	Literaturverzeichnis.....	51

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur des Bilirubin IX α (Bonett et al., 1978).....	3
Abbildung 2: Metabolismus von Bilirubin (Wagner et al., 2015).....	4
Abbildung 3: Abbau von Häm und antioxidative Mechanismen von Bilirubin (Bergmann et al., 2015).....	6
Abbildung 4: Links (2-3): TATAA- Promotorregion des UGT1A1 Gens ohne Mutation, rechts (6-7): TATAA- Promotorregion bei Personen mit Gilbert Syndrom (Bosma et al., 1995).....	9
Abbildung 5: Kettenreaktion einer Lipidperoxidation (Halliwell et al., 1984).....	14
Abbildung 6: Zweischnitt Oxidation-Reduktion des Superoxidradikals (Franco et al., 2012).....	16
Abbildung 7: Reaktionsmechanismus der Katalase (Löffler et al., 2008 /modifiziert).....	17
Abbildung 8: Redoxmechanismus des Gluthathionsystems (Almau et al., 2020)	17
Abbildung 9: Amphiphile Struktur der ALA (Tripathi et al., 2023)	18
Abbildung 10: Chemische Struktur des Vitamin E (Ganten et al., 2006).....	18
Abbildung 11: Entstehung von freien Radikalen durch Xanthinoxidase (Vina et al., 2000/modifiziert).....	20
Abbildung 12: Studienkollektiv	23
Abbildung 13: FRAP-Reaktionsprinzip (Munteanu und Apetrei, 2021/ modifiziert).....	25
Abbildung 14: Layout der 96-Well Mikrotiterplatten. Fe ²⁺ (Standardlösung), Blank, Plasmaproben	33
Abbildung 15: Layout der 96-Well Mikrotiterplatten. Trolox, Blank, Plasmaproben	33
Abbildung 16: Fe ²⁺ -Standardgerade zur Berechnung der FRAP-Konzentration in $\mu\text{mol/L}$	34
Abbildung 17: Altersstruktur der Teilnehmenden bezüglich der beiden Gruppen.....	39
Abbildung 18: Altersverteilung unter Berücksichtigung der Gruppen und Geschlechts der Teilnehmenden	40
Abbildung 19: Mittlere Zunahmen der FRAP-Konzentration bezüglich der beiden Gruppen	42
Abbildung 20: Ermittelte FRAP-Konzentrationen ($M \pm 1 \text{ SD}$) unter Berücksichtigung der beiden Gruppen zu T1 und T2.....	43
Abbildung 21: Bivariates Streudiagramm für den Zusammenhang der FRAP-Konzentrationen zu T1 und T2 unter Berücksichtigung der beiden Gruppen.....	44
Abbildung 22: Bivariates Streudiagramm für die Beziehung zwischen Bilirubin am Tag der Fahrrad-Challenge und FRAP-Veränderung unter Berücksichtigung der beiden Gruppen aufgrund der zuvor erfolgten Einteilung mit Regressionsgerade (n=79 gültige Protokolle).....	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung und Bildung der reaktiven RONS (Lothar, 2012)	13
Tabelle 2: Beispiele für endogene und exogene Antioxidantien (Ganten et al., 2006/modifiziert).....	16
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten FRAP-Chemikalien	26
Tabelle 4: Verdünnungsreihe zur Erstellung der Fe^{2+} - Standardgerade.....	27
Tabelle 5: Verdünnungsreihe zur Herstellung der Positivkontrolle	27
Tabelle 6: Benötigte Labormaterialien und erforderliche Geräte für die FRAP-Analyse.....	28
Tabelle 7: Einstellung des Programms MARS Datenanalyse Software (Version 2.41) am FLUOstar Optima für die FRAP-Analyse.....	29
Tabelle 8: Pipettierschema für 96-Well Mikroplatten.....	32
Tabelle 9: Häufigkeiten und Anteilswerte (Zellenprozentage) des Geschlechts der Teilnehmenden und der beiden Altersstufen bezüglich der Zuordnung zu Fall- und Kontrollgruppe	38
Tabelle 10: Kennwerte des Lebensalters (Jahre) unter Berücksichtigung der Gruppen und Geschlechts der Teilnehmenden.....	39
Tabelle 11: Kennwerte der anthropometrischen Größen bezüglich der beiden Gruppen (n=gültige Datenprotokolle)	40
Tabelle 12: Kennwerte der Blutparameter HDL, Chol und TG (mg/dl) bezüglich der beiden Gruppen	41
Tabelle 13: Kennwerte ($M \pm SD$) sowie Spannweite (min-max) der FRAP-Konzentration ($\mu\text{mol/L}$) je Gruppe zu den beiden Erhebungszeitpunkten sowie absolute und relative (%) Differenzen.....	42
Tabelle 14: Koeffizienten der Prädiktoren im Modell für das Kriterium FRAP-Veränderung (N=90)	46

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung (<i>description</i>)
8OH-dg	8-Hydroxydesoxyguanosin
ALA	Alpha Liponsäure (<i>alpha lipoic acid</i>)
AMP	Adenosinmonophosphat
AOPP	<i>Advanced Oxidation Protein Products</i>
Aqua dest.	Aqua destillata
<i>B</i>	Unstandardisierte Regressionskoeffizient, Anstieg (<i>slope parameter</i>)
β	Standardisierter Regressionskoeffizient, Gewichtung
BMI	<i>Body Mass Index</i>
BVR	Biliverdin-Reduktase
CH ₃ COOH	Essigsäure
Chol	Cholesterin
CN	Crigler-Najjar
CO	Kohlenstoffmonoxid
CoQ10	Coenzym Q10
Cu	Kupfer
CYP 450	Cytochrom P450
DBIL	Direktes Bilirubin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Fe II	Eisen
FeCl ₃ • 6 H ₂ O	Eisen-(III)-chlorid- Hexahydrat
FeSO ₄ • 7 H ₂ O	Eisen-(II)-sulfat- Heptahydrat
FFM	Fettfreie Masse
FRAP	<i>Ferric reducing ability of plasma</i>
GS	Gilbert Syndrom
GSH	Glutathion
GSSG	L-Glutathion
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HC-WC	<i>Waist circumference and hip circumference</i>
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HMOX	Hämoxygenase
HNE	4-Hydroxy-2-Nonenal
HOBr	Hypobromige Säure
HOCl	Hypochlorige Säure
IBIL	Indirektes Bilirubin
IL	Interleukin
IPAQ	<i>International physical activity questionnaire</i>
KI	Konfidenzintervall

KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
<i>M</i>	Mittelwert (<i>mean</i>)
max	Maximum
<i>Md</i>	Median
min	Minimum
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDA	Malondialdehyd
MPO	Myeloperoxidase
Na ₂ HPO ₄	Di-sodium-hydrogen-phosphat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
N, <i>n</i>	<i>Stichprobenumfang, Fallzahl (number)</i>
nm	Nanometer
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NQO	Quinone Oxidoreduktase
NRF 2	<i>Nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
O ₂ ^{•-}	Superoxidradikal
O ₃	Ozon
OG	Obere Grenze
OH [•]	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxinitrit
OS	Oxidativer Stress
oxLDL	<i>Oxidized low-density lipoprotein</i>
<i>p</i>	Signifikanzbeurteilung (<i>probability</i>)
PC	Proteincarbonyl
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Phospholipase A2
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acid</i>
RER	<i>Respiratory exchange ratio</i>
RHS	Retikulohistiozytären System
RNS	Reaktive Stickstoffspezies (<i>Reactive nitrogen species</i>)
RO	Alkoxyradikal
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive oxygen species</i>)
<i>SD</i>	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
<i>SE</i>	Standardfehler (<i>standard error</i>)
SET	Ein-Elektron-Transistoren (<i>single electron transfer</i>)
SOD	Superoxiddismutase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TA	Thymin Adenin
TATA	T(hymin)-A(denin)-T(hymin)-A(denin)
TB	<i>Total bilirubin</i>
TG	Triglyceride

TNF α	Tumornekrosefaktor-alpha
TPTZ	2,4,6-Tri(2-pyridyl) -s-triazin
Trolox	6-Hydroxy-2,5,7,8- tetramethylchroman-2-carbonsäure
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
UCB	Unkonjugiertes Bilirubin (<i>Unconjugated Bilirubin</i>)
UDP UGT1A1	Uridin- Diphosphat Glucuronyltransferase 1A1
UG	Untere Grenze
VO ₂ max	<i>Maximal oxygen uptake</i>
XO	Xanthinoxidase
Zn	Zink

1 Einleitung

Der menschliche Organismus ist ständig freien Radikalen durch exogene und endogene Faktoren ausgesetzt. Sowohl unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen kommt es zur Entstehung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies. Sämtliche Makromoleküle, wie Lipide, Proteine und Nukleinsäure werden durch reaktionsfreudige Radikale oxidativ verändert und funktionell beeinträchtigt. Dieser Prozess ist an der Entstehung vieler Erkrankungen wie Krebs, kardiovaskulärer Erkrankungen oder entzündlichen Erkrankungen etc. beteiligt. Die schädlichen Folgen der Radikale entstehen erst wenn der Organismus mit Hilfe des antioxidativen Netzwerks diese nicht mehr neutralisieren kann. Intensive körperliche Aktivitäten führen ebenfalls zu einer erhöhten Produktion von freien Radikalen. Der oxidative Stress ist ein Wechselspiel zwischen den reaktionsfreudigen Radikalen und den antioxidativen Schutzmechanismus und prooxidative Faktoren des Körpers. In den vergangenen Jahren konnten zahlreiche Studien feststellen, dass eine leicht erhöhte Bilirubinkonzentration sowohl eine antioxidative und antiinflammatorische Wirkung hat. Somit kann eine leicht erhöhte Bilirubinkonzentration sich negativ auf die Produktion von freien Radikalen auswirken. Beim Gilbert Syndrom handelt es sich um eine benigne, vererbare, heterozygote Mutation im Promotor-Teil des UGT1A1. Dadurch ist die Aktivität des Enzyms im Vergleich zu gesunden Menschen gesenkt und es kommt zu einer verringerten Glucuronidierung von Bilirubin und somit zu einer erhöhten Konzentration im Plasma.

Im Rahmen der BiliMetHealth Studie der Universität Wien werden die gesundheitlichen Effekte von Bilirubin im Zusammenhang mit der Bewältigung von oxidativem Stress untersucht. Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine Fall-Kontrollstudie, wobei Personen mit Gilbert Syndrom (GS) mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen werden. Die gegenständliche Masterarbeit liefert vor allem Teilergebnisse zu diesem Projekt, wobei hier die antioxidative Kapazität mittels FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) im Zentrum steht.

Das Ziel dieser Studie ist die Beurteilung, ob und inwieweit die GS-Gruppe durch die antioxidative Wirkung des Bilirubins bei einer einmaligen intensiven körperlichen Belastung geschützt ist und somit einen stärkeren antioxidativen Schutzmechanismus im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe aufweist. Die zentrale Fragestellung ist daher, ob die körperliche Belastung mittels einer Fahrrad-Challenge die FRAP-Konzentration steigert und wie sich die beiden Gruppen darin unterscheiden.

2 Literatur

2.1 Physiologie von Bilirubin

Bilirubin wird im retikuloendothelialen System (RES) durch den Abbau von Häm (Hansen et al., 2020) mittels zweier Enzyme gebildet: mikrosomale Hämoxigenase (HMOX) und der zytosolischen Biliverdin-Reduktase (BVR). Die angeführten Enzyme sind nahezu in den meisten Geweben vorhanden, vor allem aber in den retikuloendothelialen Zellen, Hepatozyten, Nierentubuli und der Darmschleimhaut (Vitek, 2020).

Es gibt drei bekannte Isoenzyme der mikrosomalen Hämoxigenase: Hämoxigenase-1 (HO-1), Hämoxigenase-2 (HO-2) und Hämoxigenase-3 (HO-3). HO-1 ist die katalytische aktive Form und ist zuständig für die Sofortreaktion in der akuten Phase gegen oxidativen Stress. HO-2 hingegen ist ein konstitutives Isoenzym, welches hauptsächlich im Gehirn gebildet wird und als Neurotransmitter bzw. Neuromodulator fungiert (Hayashi et., 2004). HO-3 dient als Häm-bindendes Protein (Wang et al., 2006).

Weiteres sind HO-1 und HO-2 für die Spaltung des Hämrings verantwortlich, wodurch Biliverdin unter der Freisetzung von Eisen (Fe II) und Kohlenstoffmonoxid (CO) entsteht. Durch die Wiederaufnahme des Eisens durch das Protein Ferritin kann es zur Neusynthese weiterer Häm-Moleküle wiederverwertet werden (Gossauer, 1994). Das Kohlenmonoxid hat in niedrigeren Konzentrationen bereits antioxidative und zytoprotektive Effekte (Kobayashi et al., 2007). Anschließend wird das entstandene Zwischenprodukt, Biliverdin, unter Verbrauch des Cofaktors Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) durch die BVR zu Bilirubin reduziert (Creeden et al., 2020). Als Folge dieser Reaktion wird die ursprüngliche zentrale Methingruppe des grünlichen Biliverdins zu einer Methylgruppe reduziert (Heinrich et al. 2007).

Für zahlreiche bedeutende physiologische Funktionen wie Elektronentransfer, Sauerstofftransport, Ligandenbindung und Genregulation sind Hämoglobin und Cytochrome auf Häm angewiesen. Häm entsteht, wenn Häm-haltige Moleküle, wie das Cytochrom P450 (CYP450) und Hämoglobin abgebaut werden (Maruhashi et al., 2019). Zum Abbau von Häm kommt es nach einer Gewebsschädigung, welche anfangs durch eine farbliche Veränderung der Blutergüsse sichtbar wird. Zunächst entsteht eine rote Verfärbung aufgrund der Hämakkumulation und des freien Oxygenhämoglobin im Gewebe. Schlussendlich entstehen grüne

bzw. gelbe Farbtöne durch das Biliverdin bis hin zur länger anhaltenden gelben Färbung, welche vom Bilirubin in oberflächlichen Geweben stammt (Jeney et al, 2013).

Die Leukozyten, vor allem die Makrophagen, sind für die Beseitigung von schädlichem Häm aus dem extrazellulären Milieu zuständig und ebenso für die Bildung verschiedener Stoffe, wie Eisen, Kohlenmonoxid und Biliverdin/Bilirubin, mitverantwortlich (Wagner et al., 2018).

2.1.1 Struktur von Bilirubin

Alle Gallenfarbstoffe, die durch den Abbau von Häm entstehen, haben das gleiche Grundgerüst, aber sie unterscheiden sich lediglich in dem Beta-Substituent. Das unkonjugierte Bilirubin (UCB) ist ein fast symmetrisches Molekül, welches aus zwei Dipyrrrolring Einheiten (Ring A-B und C-D), die durch gesättigte Methylengruppen (-CH₂-) miteinander verbunden sind, besteht. Die zwei äußeren Pyrrolringe (A und D) haben jeweils eine polare Laktamgruppe (-CO-NH-) und die zwei mittleren Ringe (B und C) hingegen tragen eine Carboxylethylseitenkette (-CH₂-CH₂-COOH), wie die Abbildung 1 veranschaulicht.

Das Molekül ist instabil, da die vorkommenden Doppelbindungen der Struktur leicht oxidierbar und lichtempfindlich sind. Die natürlich vorkommende Form des unkonjugierten Bilirubins ist IX α (4Z, 15Z Isomer des unkonjugierten Bilirubins) (Vitek und Ostrow, 2009).

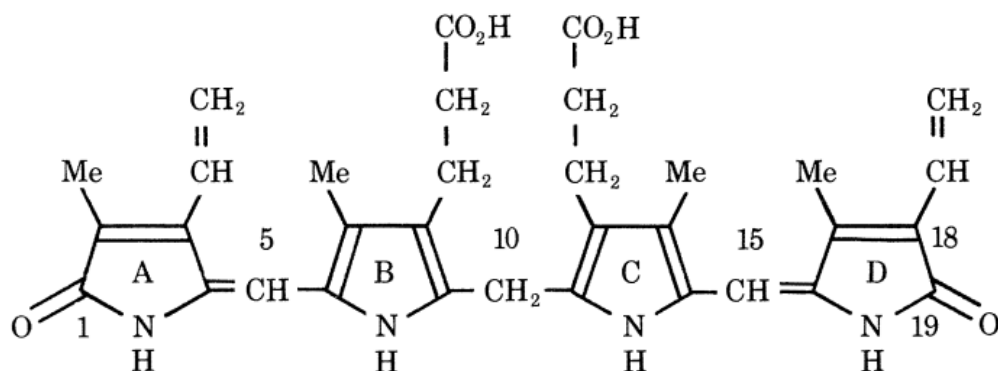


Abbildung 1: Chemische Struktur des Bilirubin IX α (Bonett et al., 1978)

2.1.2 Transport von Bilirubin

Der gelbe Gallenfarbstoff ist ein lipophiles Molekül, welches durch die Bindung am Plasma-protein, Albumin, zur Leber transportiert wird (Conti, 2021). In der Regel sind 90% des UCB beim Erwachsenen an Albumin gebunden und die restlichen 10% befinden sich am Apolipoprotein D im HDL (Vitek und Ostrow, 2009). Im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten findet die Kopplung des unkonjugierten Bilirubins an Glucuronsäure durch das

Enzym Uridindiphosphoglucuronat-Glucuronosyltransferase 1A1 (UDP-UGT1A1) statt (Conti, 2021). Da das Bilirubin zwei Carboxethylseitenketten besitzt (siehe Abbildung 1), können Mono- bzw. Dikonjugate entstehen (Vitek und Ostrow, 2009). Durch die Glucuronidierung wird es zum wasserlöslichen konjugierten bzw. direkten Bilirubin (DBIL), wodurch es zur Galle und weiter zum Darm transportiert werden kann (Conti, 2021). DBIL wird ausschließlich hepatisch eliminiert und ist nicht nierengängig (Martin und Bayer, 2014). Im Darm wird DBIL durch die Beta- Glucuronidasen zum farblosen Stercobilinogen abgebaut und teils zum braun gefärbten Stercobilin (Stuhlfarbe) weiter oxidiert. Dieses wird zum Großteil mit dem Kot ausgeschieden. Ein kleiner Teil wird über den enterohepatischen Kreislauf wieder resorbiert. Bei starkem Abbau von Häm gelangt Stercobilinogen über das Blut in die Nieren und wird als Urobilinogen mit dem Harn ausgeschieden (Koolman und Röhm, 2018; Silbernagl und Despopoulos, 2003), wie auch in Abbildung 2 schematisch veranschaulicht.

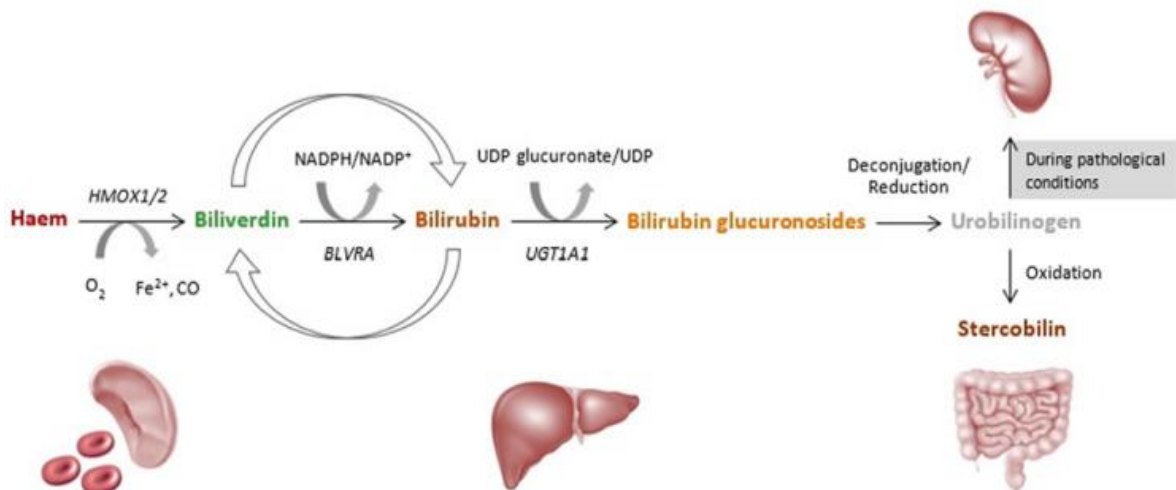


Abbildung 2: Metabolismus von Bilirubin (Wagner et al., 2015)

2.1.3 Antioxidatives und antiinflammatorisches Potenzial des Bilirubins

Bilirubin ist ein stark endogenes Antioxidans. Bereits im Jahr 1954 konnten Bernard et al. die antioxidative Wirkung des Bilirubins feststellen, da die Oxidation von Vitamin A, ungesättigten Fettsäuren und die LDL-Oxidation verhindert werden konnte (Vitek, 2017). Das Gallenpigment ist ebenfalls ein potenter Inhibitor der Superoxidproduktion durch die Hemmung der mitochondrialen NADPH-Oxidase-Aktivität (Wagner et al., 2015).

Des Weiteren stellt Bilirubin einen starken Radikalfänger dar. Durch die lipidlöslichen Eigenschaften des Bilirubins kann es mit Lipidperoxyradikalen (LOO^{\bullet}) interagieren und bei der Reaktion entsteht entweder ein nichtradikalisches Produkt oder Sauerstoff. Bilirubin reagiert aber auch mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS). Das Vorhandensein von Bilirubin kann somit protektiv bei verschiedenen hypoxiebedingten Krankheiten wirken und einen Schutz vor den schädlichen Folgen des oxidativen Stresses bieten (Cui et al., 2023).

Die antioxidative Eigenschaft von Bilirubin ist auf dessen chemische Struktur zurückzuführen, die auch in Abbildung 3 veranschaulicht ist. Das Gelbpigment fängt nämlich ROS durch die Abgabe eines Wasserstoffatoms an der C-10-Brücke des Tetrapyrrolmoleküls ab, wodurch ein stabiles Kohlenstoff-Radikal (BR^{\bullet}) entsteht. Bei der protektiven Wirkung des Bilirubins spielt der Bilirubin-Biliverdin Regelkreis eine entscheidende Rolle, da Bilirubin erstmals mit Oxyradikalen reagieren muss, damit Biliverdin entsteht, welches wiederum durch die BVR zu Bilirubin reduziert wird (siehe Kapitel 2.1). Bilirubin aktiviert schließlich den Transkriptionsfaktor Erythroid-derived 2-like 2 (Nrf 2), welcher für die Expression von HO-1 und vielen endogenen Antioxidantien, wie z.B. Glutathion (GSH), Superoxiddismutase (SOD) und NADPH-quinone Oxidoreduktase (NQO) zuständig ist. Durch diese Prozesse wird der oxidative Schaden reduziert und die zelluläre Redoxhomöostase beibehalten (Cui et al., 2023).

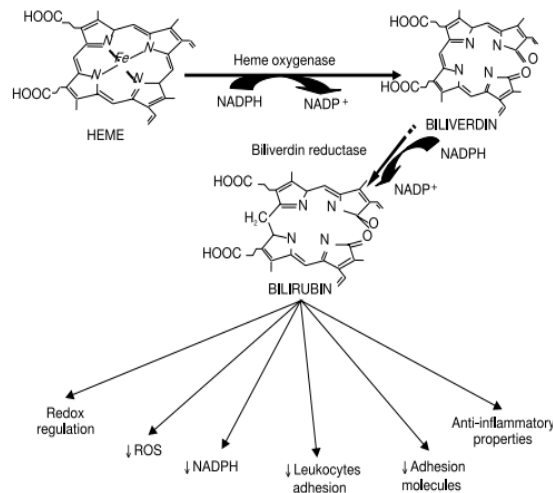


Abbildung 3: Abbau von Häm und antioxidative Mechanismen von Bilirubin (Bergmann et al., 2015)

Ebenso besitzt Bilirubin in physiologischen Konzentrationen (0.1-1.2 mg/dL) antiinflammatorische Effekte durch die Hemmung des NF- κ B (Nuclear factor-kappa B) Signalwegs der Makrophagen und führt auch zur Apoptose der T-Zellen. Die Zellen werden vor antiinflammatorischen Schäden geschützt, da Bilirubin die Phosphorylierung des Inhibitors von NF- κ B α unterdrückt. Dadurch findet die Freisetzung des NF- κ B Dimers in den Zellkern nicht statt und es kommt zu einer verringerten Expression zahlreicher entzündungsfördernder Proteine, wie IL-1, Tumornekrosefaktor α (TNF- α) sowie IL-6. Daraus wird ersichtlich, dass Bilirubin entzündungsfördernde Prozesse auf mehreren Ebenen beeinflusst (Cui et al., 2023).

In verschiedenen Studien konnte ebenso ein Zusammenhang zwischen niedriger Bilirubinkonzentrationen und die Entstehung verschiedener entzündlicher Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, systemischen Lupus erythematosus und Wegener granulomatosis festgestellt werden (Vitek und Schwertner, 2007). Man beobachtete zudem, dass Patienten, die an Krebserkrankungen leiden, einen niedrigeren Bilirubinspiegel aufweisen (Vitek und Schwertner, 2007). Temme et al. konnten zeigen, dass die Mortalität bei Dickdarmkrebs mit steigender Konzentration des Gallenpigments linear abnimmt (Temme et al., 2001). Es wurde beobachtet, dass Frauen mit einer erhöhten Bilirubinkonzentration ein geringeres Risiko haben an Brustkrebs und Gebärmutterkrebs zu erkranken. (Ching et al., 2002 und Duguay et al., 2004).

Die Ergebnisse zahlreicher Studien, die das antioxidative und antiinflammatorische Potential des Bilirubins bestätigen, könnte eine Erklärung der niedrigen Prävalenz von chronischen, durch oxidative bedingte Krankheiten bei Personen mit erhöhten Bilirubinspiegeln (Mölzer et al., 2017).

2.1.4 Physiologische Konzentrationen von Bilirubin

Die durchschnittliche physiologische Konzentration liegt beim gesunden Erwachsenen zwischen 5-17 $\mu\text{mol/L}$ (Asad et al., 2021). Gesunde Erwachsene produzieren am Tag etwa 4 mg/kg Körpergewicht an UCB (Vitek und Ostrow, 2009), wobei 75% durch das zirkulierende Hämoglobin entsteht, und der restliche Anteil durch den Abbau von Hämoglobin-enthaltenen Molekülen, vor allem Cytochromen, entsteht (Levitt und Levitt, 2014).

Die Bilirubinkonzentration im Serum wird beeinflusst durch Geschlecht, Rasse, Alter, Rauchen, Medikamente und chronische Erkrankungen (Vitek und Schwertner, 2008). Männer haben höhere Werte innerhalb derselben Altersgruppe im Vergleich zu Frauen. Man beobachtet ebenfalls, dass es altersbedingte Veränderungen bei den Männern gibt. Die Bilirubinkonzentration steigt bis zum 24. Lebensjahr an und bleibt danach konstant. Allgemein weisen jüngere Menschen eine höhere Konzentration als ältere auf (Yao et al., 2000). Ähnliche Beobachtungen konnte man für hellhäutige Bevölkerungsgruppen feststellen, diese haben nämlich einen erhöhten Bilirubinspiegel im Vergleich zu dunkelhäutigen Menschen (Madhavan et al., 1997).

2.2 Pathophysiologie des Bilirubinstoffwechsels

2.2.1 Hyperbilirubinämie

Eine erhöhte Bilirubinkonzentration im Plasma kann entweder durch eine vermehrte Produktion oder Störungen beim Abbau des Bilirubins verursacht werden (Darimont und Kullak-Ublick, 2008). Ein veranschaulichendes Beispiel hierfür ist, dass Gelbsucht sich bei Menschen meistens in der ersten Lebenswoche entwickelt, da die hepatische Metabolisierung nicht vollständig gereift ist und es zu keinem bzw. einem sehr geringen Abbau von Bilirubin kommt (Hansen et al., 2020).

Es ist allerdings bedeutsam zu betonen, dass eine leicht erhöhte Bilirubinkonzentration zu den bereits erwähnten positiven Effekten (siehe Kapitel 2.1.3) führt aufgrund der antioxidativen und antiinflammatorischen Effekte des Bilirubins (Wagner et al., 2018).

So zählt das Gilbert Syndrom (GS) zu den milden Hyperbilirubinämien, während Crigler-Najjar (CN) 2 mit einer Konzentration von 120-340 $\mu\text{mol/L}$ und CN1 mit einer Konzentration von 340-685 $\mu\text{mol/L}$ zu den schweren Hyperbilirubinämien zählen, die zu schwerwiegenden Schäden führen (Gilbert and Lereboulett 1901, Arias 1962 und Crigler 1952).

Die Diagnose einer Hyperbilirubinämie wird zunächst durch die Messung des Gesamtbilirubins (total bilirubin, TB) im Blut bestimmt, um weiters zwischen dem unkonjugierten Bilirubin (indirektes Bilirubin; IBIL) und konjugierten Bilirubin (direktes Bilirubin; DBIL) unterscheiden zu können. Um zwischen den schädlichen und positiven Effekten einer Hyperbilirubinämie zu differenzieren, ist einerseits genauer zu erheben, ob IBIL oder DBIL erhöht ist, und andererseits wie hoch die Konzentration des zirkulierenden Bilirubins ist. Beispielsweise sind erste Hinweise einer hämolytischen Anämie oder einer gestörten Konjugation des Gelbfarbstoffs ein erhöhter TB-Wert im Serum bei einer normalen DBIL-Konzentration. Zudem deuten erhöhte TB- als auch DBIL-Konzentration auf eine mögliche Cholestase (Gallenverschluss) oder auf gewisse Zustände, welche die Elimination von konjugiertem Bilirubin beeinträchtigen.

Allgemein ist es relevant zu betrachten, dass erhöhte Plasmakonzentrationen von Bilirubin nicht die Ursache einer Krankheit sind, sondern vielmehr ein Hinweis auf das Vorhandensein einer metabolischen Veränderung, die den Bilirubinstoffwechsel bzw. die Ausscheidung beeinflusst (Wagner et al., 2018).

Da die vorliegende Arbeit eine Studie behandelt, in der Personen mit Gilbert-Syndrom einbezogen wurden, wird nicht detailliert auf die weiteren Hyperbilirubinämiearten eingegangen.

2.2.2 Morbus Meulengracht / Gilbert Syndrom

Bei Morbus Meulengracht, zumeist auch unter Gilbert Syndrom bekannt, handelt es sich um eine angeborene, unkonjugierte Hyperbilirubinämie (bis 6 mg/100 ml bzw. $>17.1 - 85 \mu\text{mol/L}$) (Vitek und Tiribelli, 2021). Die Prävalenz von Gilbert Syndrom liegt zwischen 2-12 % (Vitek, 2017).

Die Ursache dieses Phänotyps ist eine Mutation im Bereich des Promotorteils des UDP-Glucuronyltransferase 1-Gens (Löffler et al., 2007). Der Polymorphismus ist durch die genetische Variation UGT-1A1*28 (rs8175347) gekennzeichnet (Vitek und Tiribelli, 2021). Der Promotor hat durch die angeborene Genmutation nun mindestens sieben Tymin Adenin (TA) Wiederholungen in der TATA-Box in beiden Allelen, welche weniger aktiv als die ursprünglichen 6 TA Wiederholungen sind und somit auch zu einer wesentlich höheren Bilirubin Konzentration führt (Hunt et al., 2001; Wagner et al., 2018). Durch die Vermehrung der Anzahl der TA- Wiederholungen in der TATA-Box entsteht das Heptamer mit der Sequenz (TA)₇TAA (Burchell und Hume, 1999), wie auch in Abbildung 4 dargestellt ist.

Diese Mutation spiegelt sich in der Bilirubinkonzentration wider, da die TATA-Region an dem Transkriptionsfaktor IID bindet, welcher essenziell für den Start der Transkription von der UDP-Glucuronosyltransferase ist. Dies hat zur Folge, dass es zu einer stark reduzierten Expression der Enzyme, welche für die Glucuronidierung von Bilirubin zuständig sind, kommt. Die Aktivität der Glucuronidierung bei Personen mit Gilbert Syndrom beträgt nur 30% von dem eines gesunden Menschen (Bosma et al., 1995).

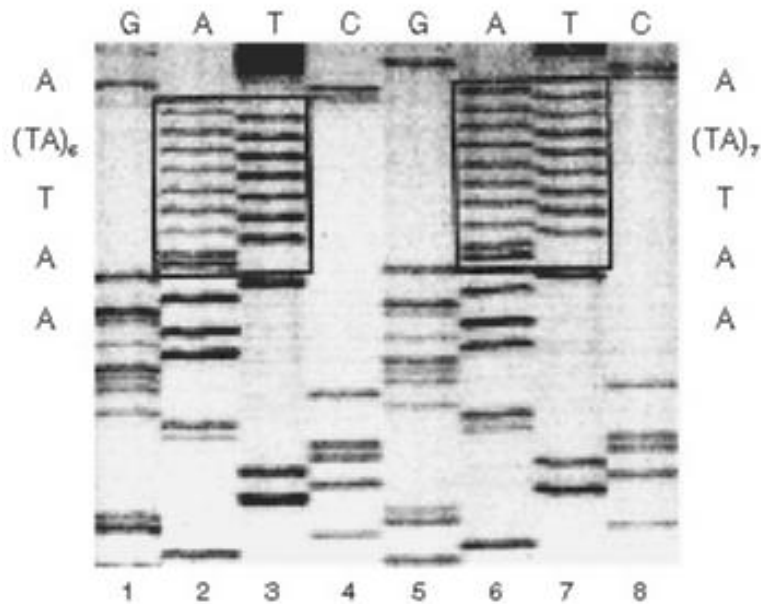


Abbildung 4: Links (2-3): TATAA- Promotorregion des UGT1A1 Gens ohne Mutation, rechts (6-7): TATAA- Promotorregion bei Personen mit Gilbert Syndrom (Bosma et al., 1995)

Abseits von der homogenen Mutation wurden auch heterozygote Punktmutationen festgestellt, welche autosomal dominant vererbt werden. Bei den Punktmutationen handelt es sich um genetische Veränderungen im ersten Abschnitt (Exon 1) (G71R) und im vierten Abschnitt (Exon 4) des UGT1A Gens, wodurch der Phänotyp ebenfalls hervorgerufen wird. Bei den unterschiedlichen Formen der Punktmutation handelt es sich allerdings immer um Missense Mutationen, da sich ein einzelnes Nukleotid vom Wildtyp unterscheidet (Aono et al., 1995).

2.2.2.1 Diagnose des Gilbert-Syndroms

Klinisch manifestiert sich das Gilbert-Syndrom erstmals im Jugendalter durch einen Zufallsbefund, da sich die Bilirubinwerte erstmals stabilisieren und es bei den Männern auch zu einem erhöhten Testosteronspiegel kommt, wodurch sich die Aktivität des UGT-Enzyms verringert. Dies ist auch der Grund, warum Männer von dem Phänotyp eher betroffen sind. (Muraca und Fevery, 1984; Madhavan et al., 1997). Es gibt starke Schwankungen bei der

Serumbilirubinkonzentration, da sie nicht zwingend durchgehend erhöht ist. Die Konzentration des Bilirubins steigt oftmals durch körperliche Anstrengung, Stress, während der Menstruation, Infekten, bei Einnahme bestimmter Medikamente oder Nahrungskarenz (Schmid,1995; Vitek und Tiribelli, 2021).

2.2.2.1.1 Kalorienrestriktionstest

Somit stellt die erste Methode zur Diagnose des Phänotyps den sogenannten „caloric restriction“ oder auch „starving test“ dar (Thomsen et al., 1989). Darunter versteht man eine Kalorieneinnahme von 400 kcal pro Tag für 72 Stunden. Der Anstieg der Konzentration des unkonjugierten Bilirubins tritt bereits innerhalb von 24 Stunden auf und verdoppelt sich im Vergleich zum ursprünglichen Wert (Owens und Sherlock, 1973). Es ist ein zeitaufwändiges Verfahren, da die Personen stationär für die Dauer des Tests aufgenommen werden müssen, um eine genauer Kalorieneinnahme zu gewährleisten und die Blutzuckerwerte zu kontrollieren (Teich et al., 2008).

2.2.2.1.2 Nikotinsäuretest

Ein weiteres diagnostisches Verfahren ist der Nikotinsäuretest (eng: nicotinic acid test), hierbei ist eine Nüchternzeit von 12 Stunden notwendig. Danach wird Nikotinsäure 50 mg i.v. oder 170-300 mg peroral verabreicht und es kommt zu einer Erhöhung der unkonjugierten Bilirubinkonzentration (Teich et al., 2008). Es ist ausschließlich eine Bestimmung der Serumkonzentration nach 180 Minuten notwendig (Davidson et al., 1975).

2.2.2.1.3 Rifampicin-Test

Der Rifampicin-Test beruht auf die Induktion der CYP-450 Isoenzyme und konkurriert auf zellulärer Ebene mit den Ausscheidungswegen in der Leber. Bei einer Gabe von 900 mg oral Rifampicin steigt der Bilirubinspiegel an. Dieser Effekt ist bei nüchternen Personen bereits nach 2 Stunden sichtbar (Anstieg der Konzentration von über 1.9 mg/dl), während bei nicht fastenden Personen dies erst nach 4 Stunden zu beobachten war. Dieser Test ist ein sensibler und spezifischer Test (Murthy et al., 2001).

2.2.2.1.4 Genotypisierung

Eine Genotypisierung, welchen den Polymorphismus in dem Promotor vom UGT1A1 liefert, bestätigt das Vorliegen des Gilbert Syndroms. Außerdem wird der genetische Test ebenfalls eingesetzt, wenn eine Therapie mit bestimmten Medikamenten, wie Atazanavir oder Irinotecan notwendig ist, weil bei Vorliegen der Mutation die Dosis um die Hälfte reduziert muss (Ehmer et al., 2008).

2.3 Oxidativer Stress

Unter oxidativen Stress versteht man die Dysbalance zwischen freien Radikalen und der antioxidativen Kapazität des Immunsystems (Sies, 2020).

Der oxidative Stress nimmt eine zentrale Rolle für physiologische Effekte und somit auch für die Stärkung des Immunsystems ein. Dies wird unter dem Begriff „oxidativen Eustress“ zusammengefasst (Sies, 2020). Ein anschauliches Beispiel hierfür sind die zahlreichen Signaltransduktionen: Die TRP (transient receptor potential) -Kanäle, welche essenziell für die Wahrnehmung von externen sensorischen Reizen sind, werden durch Radikale, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Stickstoffmonoxid (NO) und Elektrophile aktiviert. Dadurch kommt es zum Calciumeinstrom, wodurch die Signale in den Zellen weitergeleitet werden (Sies, 2021). Des Weiteren dienen ROS der zellulären Abwehr gegen Bakterien und anderen Mikroorganismen und könnten somit zum Aufrechterhalten der zellulären Homöostase beitragen (Hensley und Floy, 2002).

Der oxidative Distress hingegen wird mit negativen Gesundheitsaspekten in Verbindung gebracht, da freie Radikale die Zellen auch schädigen und schlussendlich zur Pathogenese vieler chronischen Erkrankungen beitragen (Sies, 2020). Ein erhöhter Anteil an freien Radikalen im Körper kann durch verschiedene Erkrankungen, Stress, Medikamente aber auch Ernährung und Lebensstil verursacht werden. Der Organismus kann diese nicht mehr durch das antioxidative Netzwerk kompensieren und es kommt in weiterer Folge zu chronischen Erkrankungen, wie zum Beispiel koronare Herzerkrankungen (KHK), Diabetes, Arteriosklerose und vorzeitigen Alterungsprozessen (Kirkamm et al., 2023).

2.3.1 Bildung freier Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Als freies Radikal bezeichnet man jene Atome, die ungepaarte Elektronen in der äußersten Atomhülle besitzen. Ihre erhöhte Reaktionsfähigkeit ist der schädliche Auslöser des oxidativen Stresses (Afanas'ev, 2010). Durch die freien Elektronen wird das Radikal instabil und hat eine kurze Lebensdauer. Somit reagieren sie mit anderen Atomen, um ein Elektronenpaar zu bilden und die Stabilität des Atoms zu gewährleisten. Das angegriffene Molekül hat somit ein Elektron weniger und wird schlussendlich selbst zu einem neuen freien Radikal, wodurch sich eine Kettenreaktion bildet, und die Zellen angegriffen und funktionell beeinträchtigt werden (Phaniendra et al., 2014). Im Zuge dieser Reaktion entstehen reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) und reaktive Stickstoffspezies (reactive

nitrogen species, RNS) (Brieger et al., 2012). Die hochreaktiven Verbindungen können entweder positiv oder negativ geladen sein (Lothar, 2012).

Die freien Radikale, sowohl ROS als auch RNS, entstehen aus exogenen Quellen und auch endogenen Prozessen. Zu den exogenen Quellen gehören beispielsweise Alkohol, Umweltverschmutzung, Rauch, Schwermetalle. Zu den endogenen Quellen zählen NADPH, Myeloperoxidase (MPO), Lipooxygenase und Angiotensin II, welche eine relevante Rolle bei enzymatischen Reaktionen, wie beispielsweise der Aktivierung oder Inhibierung anderer Enzyme, spielen. Diese Radikale sind unentbehrlich für wichtige physiologische Prozesse im Organismus (Afanas'ev, 2010), allerdings führen überschüssige Konzentrationen an ROS auch zu Schädigungen von Makromolekülen (siehe Kapitel 2.4) (Phaniendra et al., 2014).

Bei der Gruppe der ROS und RNS unterscheidet man zwischen Radikalen und Nicht-Radikalen. Beispiele für Radikale, die von einem Sauerstoff- bzw. Stickstoffatom abstammen sind, Superoxidradikal ($O_2^{\cdot -}$) Hydroxyradikal (OH^{\cdot}), Alkoxyradikal (RO^{\cdot}), Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}) oder Stickstoffdioxid (NO_2). Zu der Gruppe der Nicht-Radikale zählen Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hypochlorige Säure ($HOCl$), Hypobromige Säure ($HOBr$), Peroxinitrit ($ONOO^-$), Ozon (O_3) und viele mehr (Phaniendra et al., 2014).

Vor allem NADPH als endogene Quelle ist für die Bildung des Superoxidradikals ($O_2^{\cdot -}$) verantwortlich, da dieses durch die Reduktion eines Elektrons, welches von NADPH während der Zellatmung bereitgestellt wird, entsteht (Liguori et al., 2018). Die NADPH-Oxidase, welche die Reaktion von NADPH zu $NADP^+$ katalysiert, spielt eine bedeutsame Rolle bei der Bekämpfung von Mikroorganismen. Dadurch steigt der extramitochondriale Sauerstoffverbrauch („respiratory burst“) und bildet aber gleichzeitig eine gute Grundlage für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (Ganten et al., 2006). Das entstandene Superoxidradikal wird von der SOD zu H_2O_2 verstoffwechselt. Wasserstoffperoxid ist allerdings per Definition kein freies Radikal, da das Atom keine ungepaarten Elektronen besitzt, aber es ist in der Lage das Hydroxyradikal (OH^{\cdot}) zu bilden durch die sogenannte Fenton oder Haber-Weiss Reaktion (Liguori et al., 2018). Die hoch reaktiven Hydroxylradikale greifen vor allem Phospholipide in Zellmembranen und Proteinen an. In Neutrophilen hingegen, kann Wasserstoffperoxid durch Chlorid und MPO zur Hypochlorigen Säure ($HOCl$) umgewandelt werden, welche vor allem zelluläre Proteine angreift. Das Radikal Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}) entsteht durch die Reaktion der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff unter Verbrauch des Cofaktors NADPH. Die Reaktion wird von der Stickstoffsynthase (NOS) katalysiert. Man unterscheidet zwischen folgenden drei Isoenzymen der NOS: epitheliale NOS, welche für die

Vasodilatation und der vaskulären Regulation verantwortlich ist, die neuronale NOS (nNOS) für die intrazelluläre Signale und die induzierbare NOS, welche durch verschiedene Endotoxine oder Zytokine aktiviert wird. Abgesehen von den Schäden, die Stickstoffmonoxid bereits mit sich trägt, kann Sauerstoff damit reagieren, welche gemeinsam zum reaktiven Peroxynitrit reagieren (Liguori et al., 2018), wie auch in Tabelle 1 zeigt.

RONS	Chemische Formel	Mechanismus	Entstehung
Superoxidradikal	$O_2^{\bullet -}$	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$	Reduktion von O_2
Hydroxylradikal	OH^{\bullet}	$H_2O \rightarrow H^{\bullet} + OH^{\bullet}$	Fenton-/Haber-Weiss-Reaktion
Wasserstoffperoxid	H_2O_2	$2 O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Superoxiddismutase (SOD)
Stickstoffmonoxid	NO^{\bullet}	$L\text{-Arginin} + O_2 + NADPH \rightarrow NO^{\bullet} + L\text{-Citruilin} + NADP$	Stickstoffmonoxidsynthase (NOS)
Peroxynitrit	$ONOO^{\bullet -}$	$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet -} \rightarrow ONOO^{\bullet -}$	Reaktion von Stickstoffmonoxid- und Superoxidradikal-Radikalen

Tabelle 1: Einteilung und Bildung der reaktiven RONS (Lothar, 2012)

2.3.2 Messung von oxidativem Stress

Die Messung der Biomarker für den oxidativen Stress stellt eine Herausforderung dar, weil das oxidative bzw. antioxidative Netzwerk ein sehr komplexes ist und die freien Radikale eine kurze Halbwertszeit haben. Es können einerseits indirekte Biomarker, wie konjugierte Diene, Hydroperoxide, Malondialdehyd (MDA), 4 Hydroxynonenal, Pentan, Ethan, F2-Isoprostane und oxidiertes LDL (oxLDL) gemessen werden, andererseits kann man die antioxidative Gesamtkapazität in Flüssigkeiten und Geweben messen. Die enzymatischen (wie Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase) und die nicht enzymatischen Antioxidantien, wie Vitamin A, C, E, Glutathion und Harnsäure zählen dazu (Pingitore et al., 2015).

2.4 ROS-induzierte Schädigungsmechanismen

In den Mitochondrien werden reaktive Sauerstoffspezies gebildet, die durch ihre hohe oxidative Eigenschaft mit Makromolekülen interagieren. Die reaktionsfähigen freien Radikalen können fast alle chemischen Strukturen im Körper oxidativ verändern, was eine Zellschädigung und Fehlfunktionen vieler Organe zur Folge hätte (Kirkamm et al., 2023).

2.4.1 Lipidperoxidation

Besonders gefährdet von den hohen Konzentrationen an ROS sind lipidhaltige Strukturen der Zellmembranen und Zellkerne. Es kommt zur Entstehung von Lipidperoxiden bei der Reaktion von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFA) mit Oxidantien. Als Folge der Reaktion kommt es zur eingeschränkten Funktion der membran-gebundenen Enzyme und Rezeptoren. Durch den hohen Kalziumeinstrom in die Zelle kommt es zum Zelltod, da die Permeabilität der Zellmembran abnimmt (Kirkamm et al., 2023).

Die Lipidperoxidation entsteht durch das Abspalten eines Wasserstoffatoms durch ein reaktionsfreudiges Radikal in lipidhaltigen Molekülen. Das gebildete Radikal in der mehrfach ungesättigten Fettsäure bildet nun konjugierte Doppelbindungen, welche wiederum rasch mit Sauerstoff reagieren und schlussendlich ein Hydroperoxylradikal bilden. Letzteres spaltet weitere Wasserstoffatome von freien Fettsäuren und fördert somit das Fortschreiten der Lipidperoxidation (Halliwell et al., 1984), wie auch die Darstellung in Abbildung 5 zeigt. Bei dieser Reaktion entstehen eine Vielzahl von Produkten, wie Isoprostane, MDA, 4-Hydroxy-2-Nonenal (HNE) und 2- Propenal, welche sowohl im Plasma als auch im Urin messbar sind und als indirekte Indikatoren dienen (Lothar, 2012).

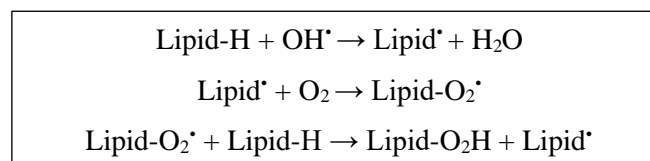


Abbildung 5: Kettenreaktion einer Lipidperoxidation (Halliwell et al., 1984)

2.4.2 Proteinoxidation

Weitere Makromoleküle, die von reaktiven Sauerstoffspezies oxidiert werden können, sind Proteine, da sie viele leicht oxidierbare Aminosäuren in ihren Seitenketten enthalten. Die Aminosäuren Cystein und Methionin reagieren sehr stark mit Hydroxylradikalen und HOCl (Winterbourn und Kettle, 2013). Die hoch reaktiven Hydroxylradikale sind vor allem für die oxidative Schädigung der Proteine verantwortlich. Peroxide greifen primär jene Proteine an, welche Peroxid-sensitive Thiolgruppen besitzen. Die Folge dieses Angriffs ist die irreversible Oxidation der Thiol- und Methioningruppen und Seitenkettenänderungen der Proteine, wodurch es zur Thiol-Überoxidation, Carbonylierung und Dityrosine-Formation kommt (Heinecke et al., 1993). Diese Modifikationen tragen zur Beeinträchtigung der Proteinfunktion bei (Manta und Gladyshev, 2017). Nach der oxidativen Schädigung der

Proteine werden die Aminosäurerückstände zu Carbonylderivaten umgewandelt. Proteincarbonylgruppen werden als Marker für die Proteinschädigung verwendet (Sen, 2001). Weiteres kann der Nachweis von AOPP (engl.: Advanced Oxidation Protein Products) und NO (Stickstoffmonoxid) ein Hinweis auf die Proteinoxidation sein (Neubauer et al., 2008).

2.4.3 Nukleinsäureoxidation

Die Desoxyribonukleinsäure (DNA) in den Mitochondrien ist anfälliger für die oxidative Schädigung durch ROS als die nukleare DNA, da ROS in den Mitochondrien gebildet werden. Das Hydroxylradikal schädigt das genetische Material durch Interaktion mit verschiedenen Komponenten. Dazu gehören die Pyrimidin- und Purinbasen und auch das Desoxyribosezucker-Rückgrat, was zu Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen führt. Durch diese Veränderung der DNA-Struktur kommt es zur Beeinträchtigung der Funktion (Phaniendra et al., 2014). Es kommt zu einer erhöhten Expression des 8-Hydroxy-2-Deoxyguanin (8-OHdG), das auch gleichzeitig ein relevanter Marker für DNA-Schädigungen darstellt (Barnes, 2020). Die reaktive Stickstoff-spezies, vor allem Peroxynitrit interagiert insbesondere mit Guanin. Dies hat entweder eine nitrative oder oxidative DNA-Läsion zur Folge und als Produkte werden 8-Nitroguanin und 8-Oxodeoxyguanosin gebildet. Ersteres ist instabil und kann auch entfernt werden, wodurch eine sogenannte apurinische Stelle im DNA-Strang entsteht. Bei der DNA-Synthese kann Adenin mit 8-Oxodeoxyguanosin paaren, wodurch es zu einer G-T Transversion kommt. Diese Mutation kann zu einer Karzinogenese führen. (Phaniendra et al., 2014).

2.5 Exogene und endogene Schutzfaktoren

Damit es zu keiner Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der freien Radikale kommt, besitzt der Körper ein komplexes antioxidatives Schutzsystem, um der übermäßigen Produktion von ROS entgegenzuwirken. Dieses lässt sich in primär schützende und reparierende Mechanismen unterteilen. Erstere sind für die Beseitigung bereits gebildeter Oxidantien zuständig, damit es in weiterer Folge zu keiner zellulären Schädigung der Makromoleküle kommt, während die reparierenden Mechanismen, die bereits oxidierten, geschädigten und funktionell beeinträchtigten Bestandteile des Organismus entweder wiederherstellen oder durch Protein-, Membran-, DNA-Reparatur und Lipid-/Proteinabbau neu synthetisieren.

Zum primären Schutzsystem gehören sowohl endogene Enzyme wie die Superoxiddismutase, Bilirubin und das Glutathion-System, als auch exogene nicht enzymatische Antioxidantien,

wie Vitamin A, E und C dazu (Jacobi et al., 2005), wie die Zusammenfassung in Tabelle 2 zeigt. Bewegung, Ernährung und Alterung beeinflussen vor allem die endogenen enzymatischen Enzyme (Gomes et al., 2017).

Endogene Antioxidantien	Exogene Antioxidantien
Bilirubin	Vitamin C
Thiole:	Vitamin E
• Glutathion, Liponsäure	β-Carotine
NADPH/NADH	Polyphenole:
Coenzym Q10	• Flavanoide, Isoflavonoide
Harnsäure	Spurenelemente:
Enzyme:	• Zink und Selen
• MnSOD-, CuSOD, FeSOD-Superoxiddismutase	
• Fe-abhängige Katalase	
• Se-abhängige Glutathionperoxidasen	
Metallbindende Proteine:	
• Albumin (Kupfer)	
• Ferritin (Eisen)	

Tabelle 2: Beispiele für endogene und exogene Antioxidantien (Ganten et al., 2006/modifiziert)

2.5.1 Superoxiddismutase (SOD)

Die erste Immunabwehr zur Inaktivierung und Elimination der toxischen Sauerstoffabkömmlinge bildet die Superoxiddismutase. Die Aktivität der SOD ist einerseits bedingt durch die Konzentrationen der Spurenelemente, Kupfer und Zink (Cu/Zn-SOD im Zytoplasma und in der extrazellulären Flüssigkeit), und Mangan (Mn-SOD der Mitochondrien) (Kirkmann et al., 2023; Ganten et al., 2006). Diese Gruppe der Enzyme sind relevant für die Reduktion des toxischen Sauerstoffradikals in Wasserstoffperoxid (McCord und Edeas, 2005), wie auch das Schema in Abbildung 6 veranschaulicht.

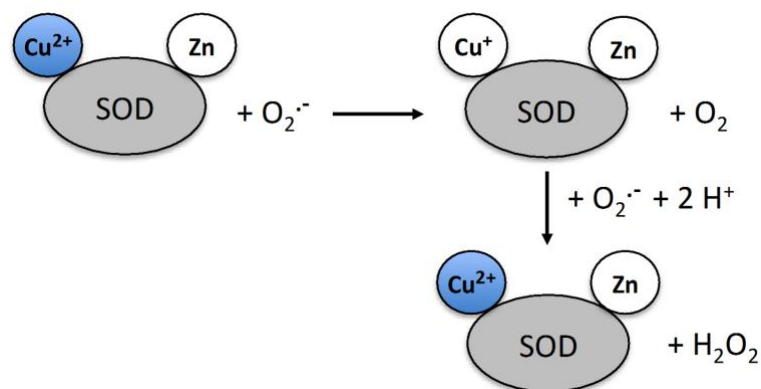


Abbildung 6: Zweischritt Oxidation-Reduktion des Superoxidradikals (Franco et al., 2012)

2.5.2 Katalase (KAT)

Das in den Peroxisomen und im Zytoplasma lokalisierte Enzym, Katalase (KAT), ermöglicht die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff, wie in Abbildung 7 ersichtlich. Sie besteht aus vier Untereinheiten und hat als Kofaktor ein Häm Molekül. Sie dient vor allem zum Schutz gegen den „respiratory burst“ (Ganten et al., 2006).

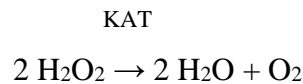


Abbildung 7: Reaktionsmechanismus der Katalase (Löffler et al., 2008 /modifiziert)

2.5.3 Glutathionperoxidase

Sowohl das Enzym Glutathionperoxidase als auch Glutathion (GSH) sind wichtige Bestandteile des antioxidativen Netzwerks. Während Glutathionperoxidase hauptsächlich für die Elimination von Lipidperoxiden zuständig ist, reagiert Glutathion mit reaktiven Sauerstoffspezies. Es ist ein Tripeptid, welches aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin besteht und ist auch ein Substrat der Glutathionperoxidase, wie im Diagramm der Abbildung 8 veranschaulicht. GSH wird somit durch die Glutathionperoxidase ins oxidierte Glutathion (GSSG) oxidiert. Das Verhältnis zwischen GSH/GSSG ist im Alter und nach intensiver körperlicher Belastung erniedrigt. Das Spurenelement Selen bildet einen wichtigen Cofaktor für dieses Enzym, folglich wird die Aktivität durch eine mangelhafte Zufuhr über die Ernährung reduziert (Kirkmann et al., 2023).

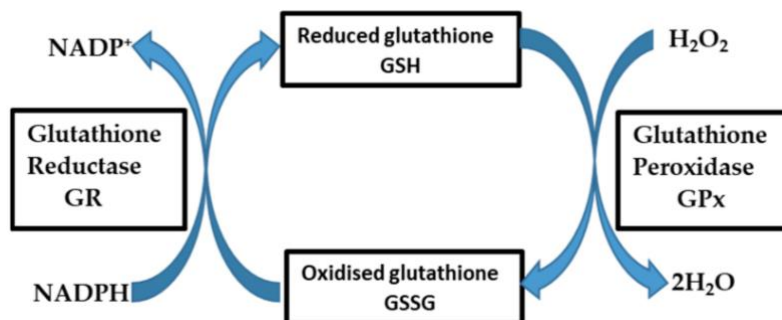


Abbildung 8: Redoxmechanismus des Glutathionsystems (Almau et al., 2020)

2.5.4 Alpha-Liponsäure (ALA)

Ein weiterer bedeutender Radikalfänger ist die Alpha-Liponsäure (ALA). Sie stellt ein starkes Antioxidans dar und übt vielfältige Schutzfunktionen gegen oxidative Schäden. ALA unterstützt weitere Antioxidantien wie Vitamin C und E, Coenzym Q10 und Glutathion in deren Regeneration. Aufgrund ihres amphiphilen Charakters befindet sich ALA sowohl im

Gewebe als auch in Flüssigkeiten. Die Strukturformel ist in Abbildung 9 veranschaulicht. Zudem kann ALA durch ihre vergleichsweise kleine Molekülgröße die Bluthirnschranke durchdringen und im Gehirn ihre protektiven Wirkungen entfalten (Kirkmann et al., 2023).

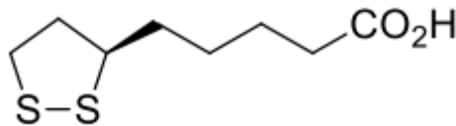


Abbildung 9: Amphiphile Struktur der ALA (Tripathi et al., 2023)

2.5.5 Coenzym Q10

Das Coenzym Q10 ist ein bedeutender Faktor des antioxidativen Schutzsystems. Es gehört zur Gruppe der endogenen Lipide, die an einer Reihe von enzymatischen Atemreaktionen in den Mitochondrien beteiligt sind (Liguori et al., 2018). Aufgrund der hydrophoben Struktur stellt das Coenzym einen starken Radikalfänger dar, der vor allem Peroxylradikale, welche in den Liposomenmembranen entstehen, abfängt (Knez et al., 2006). Es schützt primär die Zellmembran und das Hautgewebe vor der durch oxidativen Stress ausgelösten Lipidperoxidation und stabilisiert die Membran auch gleichzeitig. Q10 kann ebenfalls bereits oxidiertes Vitamin E regenerieren (Kirkmann et al., 2023).

2.5.6 Vitamine

Vitamine sind bedeutsame Antioxidantien, welche durch die Nahrung dem Organismus zugeführt werden sollten (Ji, 1999). Vitamin E gehört zur Gruppe der fettlöslichen Vitamine (siehe Abbildung 10) und kann sich dadurch in den Zellmembranen verankern und somit den Schutz vor Lipidperoxidation gewährleisten. Es wird dabei allerdings selbst oxidiert. Unter den acht verschiedenen Formen des Vitamin E besitzen Alpha- und Gamma Tocopherol das stärkste antioxidative Potenzial (Knez et al., 2006).

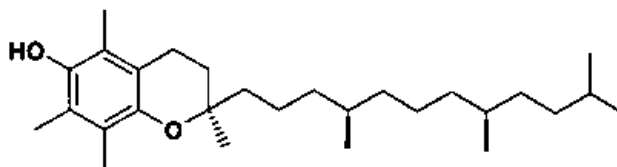


Abbildung 10: Chemische Struktur des Vitamin E (Ganten et al., 2006)

Ein weiteres antioxidativ wirkendes Vitamin ist die Ascorbinsäure, welche vor allem im Plasma und in interstitiellen Flüssigkeiten vorkommt (Knez et al., 2006). Es ist ein potenter

Radikalfänger und kann Proteine, Fettsäuren und DNA vor Oxidation schützen und auch die LDL-Oxidation unterdrücken (Kirkmann et al., 2023). Ascorbinsäure kann direkt mit dem Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$) und Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) interagieren und somit den Schaden der Erythrozytenmembran vorbeugen (Ji, 1999). Eine weitere zentrale Aufgabe von Vitamin C ist die Reduktion des Vitamin-E- Radikal, und somit die Regeneration zurück zum Vitamin E (Knez et al., 2006). Weiteres können Carotinoide, insbesondere das Betacarotin den Angriff von Sauerstoffradikale im Bereich des Intrazellularraums auf mehrfach ungesättigte Fettsäuren verhindern (Kirkmann et al., 2023).

2.6 Oxidativer Stress und sportliche Aktivität

Eine regelmäßige, nicht erschöpfende Bewegung ist einer der wirkungsvollsten Maßnahmen zur Vorbeugung vieler chronischer Erkrankungen, wie zum Beispiel Diabetes Mellitus und koronare Herzerkrankungen. Zu den positiven Gesundheitseffekten zählen unter anderem die Verbesserung des gesamten Lipidprofils, eine Erhöhung der Knochendichte und die Gewichtsabnahme (Viña et al., 2000).

Ein intensives Krafttraining und Ausdauertraining führt kurzfristig zu einem Anstieg der freien Radikale in der Skelettmuskulatur (Davies et al., 1982) und somit auch zur Muskelschädigung durch eine erhöhte Aktivität der Enzyme Creatinkinase und Lactatdehydrogenase (Viña et al., 2000). Allerdings wurde auch festgestellt, dass eine zu geringe Bewegungsaktivität zu einer erhöhten Produktion freier Radikale führt (Kondo, 1991). Sowohl bei körperlicher Aktivität als auch bei Inaktivität kommt es zu einer erhöhten Produktion von ROS durch eine systemische Anpassung der antioxidativen Kapazität des Organismus. Oxidativer Stress, welcher durch die Skelettmuskulatur entsteht, wird als „trainingsinduzierter oxidativer Stress“ bezeichnet und beruht auf ein vorübergehendes Redox-Ungleichgewicht. Während der Belastung entstehen ROS im Skelettmuskel durch den NOX2- Enzymkomplex, welcher sich in der Membran des Sakrolemmas, des Quertubulus und des sarkoplasmatisches Retikulum (SR) befindet. Ein wichtiger Schritt zur Aktivierung der Rezeptoren ist die Freisetzung von ATP über Pannexin bei der Depolarisation der Muskelfasern. Dies führt wiederum dazu, dass Calcium aus dem SR freigesetzt wird und die Calcium-abhängigen Proteinkinasen (PKC) aktiviert. Der NOX2-Komplex wird schlussendlich durch die Phosphorylierung der zytoplasmatischen Untereinheit p47/Phox durch PKC funktionsfähig, wodurch es zu einer Konformationsänderung und zur Kopplung von NOX2 an seine Untereinheit kommt (Gomes et al., 2017; Viña et al., 2000). Eine weitere Quelle für ROS während des Trainings ist die Aktivierung von Enzymen, wie der Phospholipase A2

(PLA2). Da das Endothel der Blutgefäße das Muskelgewebe versorgt, sind diese auch an der Entstehung von ROS beteiligt, wobei die Enzyme NADPH im sarkoplasmatischen Retikulum, endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase und Xanthinoxidase (XO) im Cytosol die größte Rolle spielen (Poblete-Aro et al., 2018; Powera et al., 2010). Letzteres katalysiert die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin. Allopurinol hemmt XO und verhindert somit die ROS-Produktion, wie aus der Abbildung 11 ersichtlich wird. Hypoxanthin entsteht nur durch den Abbau von ATP durch Adenosinmonophosphat (AMP), was nach körperlicher Belastung passiert (Viña et al., 2000).

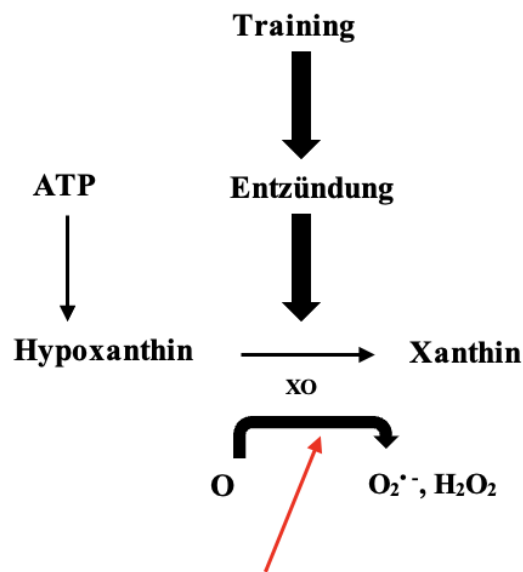


Abbildung 11: Entstehung von freien Radikalen durch Xanthinoxidase (Vina et al., 2000/modifiziert)

Biomarker für den oxidativen Stress nach dem Training wären Malondialdehyd (MDA) und Proteincarbonyle (PC), welche sich im Blut nach 24-48 h erhöhen (Poblete-Aro et al., 2018). Es wurde bewiesen, dass schon ein einmaliges Training mit einer gewissen Intensität bzw. Dauer die Anwesenheit von freien Radikalen im Organismus durch die mitochondriale Atmungskette erhöht. Es kommt vor allem zu einer erhöhten Lipidperoxidation, Glutathion- und Proteinoxidation. Aus diesem Grund wird empfohlen, dass ein kontinuierliches gering intensives Training durchgeführt wird (Gomes et al., 2017; Viña et al., 2000).

Angesichts der Tatsache, dass sowohl ein dauerhaftes als auch ein einmaliges intensives Training zu einer Hochregulierung der ROS Produktion führt, spielt die Dauer und die Intensität des Trainings eine entscheidende Rolle. Ein optimaler Trainingsplan für die Steigerung des oxidativen und antioxidativen Gleichgewichts ist ein Training mit einer Intensität zwischen den beiden ventilatorischen Schwellenwerten (50-80% der maximalen Sauerstoffaufnahme, VO₂) zwei- bis dreimal pro Woche (Gomes et al., 2017).

3 Methodik

3.1 Studiendesign

Bei der BILIMETHEALTH-Studie handelt es sich um ein Projekt der Universität Wien, in dessen Rahmen die gesundheitlichen Effekte von Bilirubin untersucht wurden. Die Studie wurde im NuTraLab (Nutrition +Training +Laboratory) der Universität Wien in der Zieglergasse 6, 1070 Wien durchgeführt. Es handelt sich um eine monozentrische Fall-Kontrollstudie im Querschnittsdesign, welche von März 2023 bis Januar 2024 durchgeführt wurde. Zu den wichtigsten Parametern, die während und nach der Studie untersucht worden sind, gehörten die körperliche Leistungsfähigkeit, anthropometrische Messungen, sowie das Erfassen der FRAP-Konzentration.

Die vorliegende Studie widmet sich der Fragestellung, ob und inwieweit eine einmalige Ausdauerchallenge („exercise challenge“) den oxidativen Stress bei Personen mit leicht erhöhten Bilirubinspiegel (Gilbert Syndrom/Morbus Meulengracht) im Vergleich zu gesunden Probanden beeinflusst. Bei der Ausdauerchallenge handelte es sich um einen Stufenbelastungstest auf einem Fahrrad-Ergometer, wobei der Widerstand langsam gesteigert wird. Während der gesamten Dauer des Tests wurden die Atemgase mithilfe einer Atemgasanalyse und die Herzfrequenz mit einem Brustgurt gemessen. Beim Erreichen von RER (respiratory exchange ratio) =1,00, wurde der Test beendet.

Im Rahmen der Studie mussten die Teilnehmer*innen auch einen oralen Glukosetoleranztest durchführen. Nach der Einnahme einer Glukose Trinklösung erfolgte direkt zu Beginn und innerhalb von 3 Stunden insgesamt fünfmal eine Blutabnahme. In dieser Arbeit werden allerdings nur die Daten des Stufenbelastungstests einer Fahrradergometrie behandelt.

Beim ersten Besuch der Probanden wurden bei potenziellen Teilnehmern im Rahmen eines Eingangsgesprächs mit Studienärzten des NuTraLabs durch eine Blutprobe (insgesamt 25 ml) und einer Speichelprobe alle medizinischen Voraussetzungen geprüft. Weitere Ein- und Ausschlusskriterien (siehe Kapitel 3.2.1) wurden mittels Fragebogen überprüft.

Zur Durchführung der gegenständigen Studie liegt seitens der Ethikkommission der Universität Wien ein positiv beschiedenes Votum vor.

3.2 Rekrutierung und Zuteilung von Studienteilnehmenden

Die Rekrutierung erfolgte ab Februar 2023 durch eine Ausschreibung auf der Homepage unter <https://ssc-lebenswissenschaften.univie.ac.at/> und über soziale Medien. Für die Studienteilnahme wurde um die Unterfertigung einer Einwilligungserklärung ersucht. Die Teilnahme selbst erfolgte freiwillig.

Die Zuteilung fand basierend auf der Konzentration des unkonjugierten Bilirubins im Blut in die Fallgruppe (erhöhtes Bilirubin) oder Kontrollgruppe (physiologische Konzentration von Bilirubin) statt.

Um eine homogene Verteilung und auch repräsentative Daten zu erzielen, wurden die Gruppen nach Alter und Geschlecht stratifiziert. Die Studie wurde mit Erwachsenen im Alter zwischen 18 und 65 Jahren durchgeführt, wobei in den beiden Gruppen 50 % der Fälle mit ≤ 35 Jahre vertreten sein sollte und 50 % > 35 Jahre, um den potenziellen Störeinfluss von Lebensalter und Geschlecht auszuschließen. Zudem waren folgende Kriterien zur Studienteilnahme zu beachten.

3.2.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien:

- Frauen und Männer zwischen 18 und 65 Jahren
- Hobbymäßig sportlich aktiv (circa 2x/Woche)
- Bilirubin (Gilbert-Syndrom):
 - Gesamtbilirubin im Blut > 1.2 mg/dL ($20.4 \mu\text{M/L}$)
 - Unkonjugiertes, indirektes Bilirubin > 1 mg/dL ($> 17.1 \mu\text{M/L}$)
- Kontrollfälle: (kein Gilbert-Syndrom):
 - Gesamtbilirubin im Blut ≤ 1.2 mg/dL ($20.4 \mu\text{M/L}$)
 - Unkonjugiertes, indirektes Bilirubin ≤ 1 mg/dL ($\leq 17.1 \mu\text{M/L}$)
- Leberwerte, welche die obere Referenz nicht mehr als das Doppelte überschreiten

Ausschlusskriterien:

- Alter: über 65 Jahre, unter 18 Jahre
- Regelmäßiges Zigarettenrauchen
- Chronische Erkrankungen, wie schwerwiegende kardiovaskuläre Krankheiten, diabetische Folgeerkrankungen oder andere metabolische Erkrankungen
- Schwangerschaft und/oder Stillen

- Lebererkrankungen inklusive Hepatitis A und B
- Nierenerkrankungen
- Aktive Tumorerkrankungen
- Personen mit Organtransplantationen
- Instabiles Körpergewicht (± 5 kg Körpergewicht; selbst angegeben) innerhalb der letzten 3 Monate vor der Erstuntersuchung
- Billirubinfälle: (Gilbert-Syndrom):
 - Gesamtbilirubin im Blut ≤ 1.2 mg/dL (20.4 μ M/L)
 - Unkonjugiertes, indirektes Bilirubin ≤ 1 mg/dL (≤ 17.1 μ M/L)
- Kontrollen: (kein Gilbert-Syndrom):
 - Gesamtbilirubin im Blut > 1.2 mg/dL (20.4 μ M/L)
 - Unkonjugiertes, indirektes Bilirubin > 1 mg/dL (> 17.1 μ M/L)

3.2.2 Studienteilnehmende

Für die vorliegende Untersuchung hatten insgesamt 157 Personen im Alter zwischen 18 und 65 Jahren Interesse an der Studie, wobei die Versuchsplanung von Probanden mit Altersunterschieden von ± 2 Jahren zwischen den Gruppen und einer Geschlechtermatchung ausging. Schließlich konnten 90 Probanden mit vollständigen Protokollen in die Analysen eingeschlossen werden, wie das Flussdiagramm in Abbildung 12 veranschaulicht.

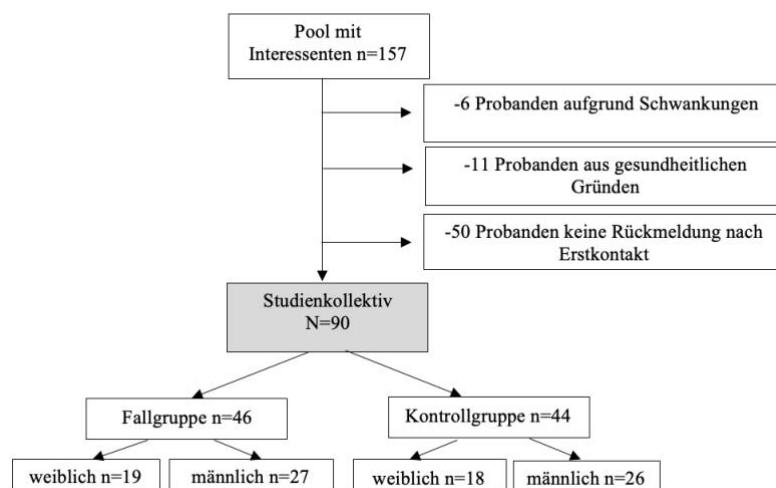


Abbildung 12: Studienkollektiv

3.2.3 Untersuchungsdurchführung und Studienverlauf

Beim ersten Besuch sollten die Studienteilnehmer nüchtern zur Eingangsuntersuchung mit den Studienärzten kommen, da die Bilirubinkonzentration im Serum bei Personen mit Gilbert's Syndrom durch das Fasten ansteigt (Owens und Sherlock, 1973).

Am Tag des Stufenbelastungstest („exercise challenge“) wurden Größe, Gewicht und die Körperzusammensetzung mithilfe der Bioimpedanzmessung sowie der Ruheumsatz und der Blutdruck (dreifache Messung in Ruhe) der Studienteilnehmer gemessen.

3.2.4 Ablauf der Exercise Challenge

Die Studienteilnehmer absolvierten danach die „exercise challenge“, welche aus dem sogenannten Fat_{max} - Test bestand. Der Stufentest begann abhängig von der körperlichen Leistung der Probanden entweder bei 30 W oder 40 W. Bei den ersten sieben Stufen wurde um 25 W alle vier Minuten gesteigert und ab der achten Stufe erhöhte sich die Leistung um 50 W alle zwei Minuten (Chrzanowski-Smith et al., 2020). Der Fitnesszustand wurde nach dem IPAQ (International Physical Activity Questionnaire) -Score berechnet. Der Test wurde beendet, wenn der RER 1,00 konstant erreicht wurde.

Die Teilnehmer sollten für 48h davor keinen Sport betreiben und am Vortag die festgelegten Ernährungsvorgaben einhalten. Sie sollten auf sehr kohlenhydratreiche Hauptmahlzeiten verzichten, keinen Alkohol konsumieren und den gewöhnlichen Konsum koffeinhaltiger Getränke einhalten. Zudem sollten die Teilnehmer in den letzten 12 Stunden vor der Untersuchung nichts essen und ausschließlich Wasser trinken.

Zudem wurde auch eine Urin-, Speichel und Blutprobe benötigt. Die Blutabnahme erfolgte zu zwei Zeitpunkten: vor und nach dem Belastungstest. Dies war notwendig, um das gesamte Blutbild zu ermitteln und im Rahmen dessen weitere Parameter zu untersuchen, welche Auskunft über den Fett- und Glukosestoffwechsel und über die Stressreaktion geben. Der Zeitaufwand pro Proband betrug etwa 2 Stunden.

Im Anschluss daran wurden die mit EDTA- behandelten Plasmaproben unter Lichtschutz auf Trockeneis mit einem Kraftfahrzeug zum Departement für Ernährungswissenschaften der Universität Wien transportiert.

3.2.5 Blutaufbereitung

Die Blutproben wurden während dem Studienzeitraum ausschließlich in EDTA-Röhrchen gesammelt. Die Aufbereitung erfolgte 20 Minuten nach Abnahme durch Zentrifugation bei 3330 rcf und 4° C für 15 Minuten.

3.3 Messmethode FRAP

Der FRAP (Ferric Reducing Ability of Plasma) Assay wurde 1996 von Benzie und Strain entwickelt und operationalisiert die antioxidative Kapazität von Blutplasma. Das Messprinzip beruht auf die Reduktion des Eisen- Tripyridyltriazin (Fe^{3+} -TPTZ) - Komplex zu Eisen (Fe^{2+}), wie auch die Abbildung 13 veranschaulicht. Diese einfache, kostengünstige Messmethode beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums nach der Reduktion aufgrund der Bildung eines blauen Farbkomplexes, welcher bei einer Wellenlänge von 593 nm photometrisch gemessen wird. Die Eisenreduktion muss im sauren Milieu bei einem pH-Wert von 3.6 stattfinden. Je mehr freie Radikale sich in der Probe befinden, desto intensiver ist die Farbe, da es zu einer verstärkten Komplexbildung kommt (Benzie und Strain, 1996). Die Farbintensität ist direkt proportional zur Konzentration der antioxidativen Gesamtkapazität (Munteanu und Apetrei, 2021).

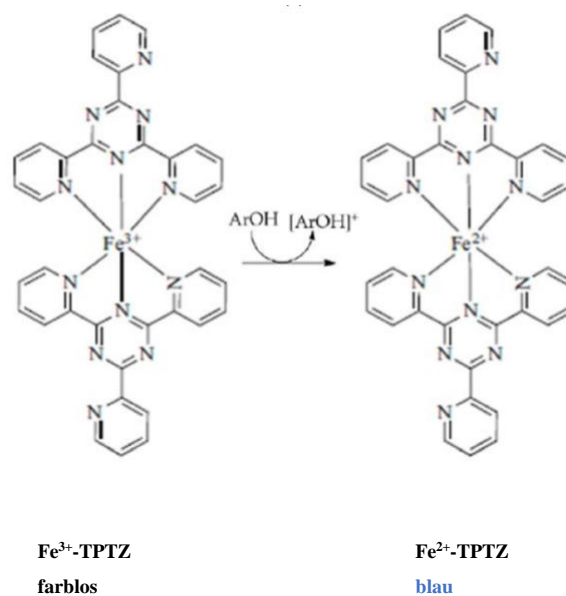


Abbildung 13: FRAP-Reaktionsprinzip (Munteanu und Apetrei, 2021/ modifiziert)

Der Reaktionsmechanismus, dem der FRAP-Assay unterliegt, basiert auf dem Prinzip des Ein- Elektron-Transitoren (SET, single electron transfer). Der SET-Mechanismus beruht auf der Fähigkeit der Antioxidantien ein Elektron zu übertragen, damit Metallionen, Carbonylgruppen und freie Radikale reduziert werden. Die Reaktivität der potenziellen Antioxidantien beruht ausschließlich auf dem Deprotonierungs- und Ionisierungspotenzial der reaktiven funktionellen Gruppen. Dies ist auch der Grund, warum die Reaktion sehr stark pH-abhängig ist (Munteanu und Apetrei, 2021).

Für die vorliegende Arbeit wurde die Methode für einen 96-Mikroplattenreader adaptiert, um eine schnelle und effiziente Bestimmung der antioxidativen Kapazität der Plasmaproben zu erzielen. Zudem wurde bei der Messung ein Absorptionsfilter mit einer Exzitationswellenlänge von 595 nm verwendet und es wurde ein verlängertes Reaktionsfenster von 6 Minuten gewählt, um ein präziseres Absorptionsmaximum zu erlangen (Valentini, 2009).

3.4 Materialien

Die Tabelle 3 zeigt jene Chemikalien, die zur Durchführung der Analysen erforderlich waren.

Reagenz	Chemische Formel	Hersteller
Chlorwasserstoffsäure	HCl	Riedel-de Haen, Germany
Di-Natrium-hydrogen-phosphat	Na ₂ HPO ₄	Fluka Chemicals, Schweiz
Eisen-(III)-chlorid- Hexahydrat	FeCl ₃ • 6 H ₂ O	Sigma-Aldrich, Deutschland
Eisen-(II)-sulfat- Heptahydrat	FeSO ₄ • 7 H ₂ O	Sigma-Aldrich, Deutschland
Essigsäure	CH ₃ COOH	Sigma-Aldrich, Deutschland
6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure (Trolox)	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	Eigenherstellung
Kaliumchlorid	KCl	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumacetat	C ₂ H ₃ NaO ₂	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumchlorid	NaCl	Sigma-Aldrich, Deutschland
Natriumhydroxid	NaOH	Sigma-Aldrich, Deutschland
Kaliumphosphat monobasisch	KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich, Deutschland
2,4,6-Tri(2-pyridyl) -s-triazin (TPTZ)	C ₁₈ H ₁₂ N ₆	Sigma-Aldrich, Schweiz

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten FRAP-Chemikalien

3.4.1 Probenaufbereitung

Die Plasmaproben der Probanden wurde mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Plasma behandelt und bei -70° C eingefroren. Bedeutend ist darauf zu achten, dass die Proben während der ganzen Laboruntersuchung auf Eis gelagert werden, damit diese konstant einer Temperatur von 4° C ausgesetzt sind. Es wurden stets 8 Plasmaproben aufgetaut und kurz vor dem Pipettieren sanft gevortext.

Zur Erfassung der antioxidativen Kapazität wurde eine Fe²⁺- Standardgerade mit bekannten Konzentrationen erstellt. Die Standards (S1-S7) waren jeden Tag frisch herzustellen unter

Verwendung der Eisen (II)-sulfat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$) Stammlösung und Aqua dest. (Aqua destillata), welche auf die Konzentrationen 2000, 1500, 1250, 1000, 500, 250, 100 μM verdünnt wurden, wie in Tabelle 4 angeführt.

Standardlösung	Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	Stammlösung (μl) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	Aqua dest. (μl)
S1	100	25	475
S2	250	62,5	437,5
S3	500	125	375
S4	1000	250	250
S5	1250	312,5	187,5
S6	1500	375	125
S7	2000	500	0

Tabelle 4: *Verdünnungsreihe zur Erstellung der Fe^{2+} - Standardgerade*

Die zweite Gerade, die ebenfalls täglich zu pipettieren war und auch in einem Konzentrationsbereich von 100 μM - 2000 μM lag, war die Positivkontrolle Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,-tetramethylchroman-2-carbonsäure), die in PBS verdünnt wurde, wie entsprechend in Tabelle 5 gezeigt. Trolox ist ein wasserlösliches Vitamin E-Analogon und ein potentes Antioxidans (Barclay et al., 2003). 1 mol Trolox reduziert 2 mol Fe^{3+} , d.h. dass das Vitamin E Analogon eine relative Aktivität von 2 hat und somit auch einen doppelt so hohen FRAP-Wert wie die Fe^{2+} -Stammlösung (Benzie und Strain, 1996).

Troloxreihe	Konzentration ($\mu\text{mol/l}$)	Troloxpur (μl)	PBS (μl)
T1	100	20	480
T2	250	50	450
T3	500	100	400
T4	1000	200	300
T5	1250	250	250
T6	1500	300	200
T7	2000	400	100

Tabelle 5: *Verdünnungsreihe zur Herstellung der Positivkontrolle*

3.4.2 Geräte und Einstellung

Die Analyse wurden mit dem FLOUstar optima, einem Mikroplattenleser der Firma BMG Labtech (Deutschland), durchgeführt. Die Absorptionsmessungen fanden bei einer Wellenlänge von 595 nm statt und die Temperatur des Gerätes wurde vor der Anwendung auf 37 °C erhöht. Die Plasmaproben wurden auf unbeschichteten 96-well-Mikrotiterplatten aufgetragen. Mithilfe des Programms MARS Datenanalyse Software (Version 2.41) wurden die Messungen ausgewertet. Die erforderlichen Labormaterialien sind in Tabelle 6 angeführt.

Geräte	Hersteller
FIUOstar optima	BMG Labtech, Deutschland
Mikrotiterplatten	Bibby Sterilin Ltd, U.K.
Wasserbad	Müller-Scherr Laborausrüstungs GmbH & Co KG, Österreich
pH- Messgerät	Metrohm, Schweiz
Elektrische Pipette 5-100µL	Eppendorf Austria GmbH, Österreich
Multipipette® E3 1µL- 50 ml	Eppendorf Austria GmbH, Österreich
Manuelle Pipette 5-50 µL	Biohit Deutschland GmbH, Deutschland
Manuelle Pipette 100-1000 µL	Starlab GmbH, Deutschland
Analysenwaage	Mettler Toledo GmbH, Österreich
Spatel	
Bechergläser	
Magnetrührer	
Messkolben	
Erlenmeyerkolben	
Vortex	

Tabelle 6: *Benötigte Labormaterialien und erforderliche Geräte für die FRAP-Analyse*

Die Tabelle 7 zeigt die Programmeinstellungen der MARS Datenanalyse Software (Version 2.41) am FLUOstar Optima für die FRAP-Analyse.


Einstellung der Software	Eingabe
Reader Configuration:	
Test-Setup	Absorbance
Configuration: light-wave-cable	Emission: white (empty) Excitation: red
Basic Parameters:	
Test name	FRAP
Microplate	Greiner 96 F-Bottom
Positions delay	0,5 s
Number of kinetic windows	1
Number of cycles	11
Number of flashes per well and cycle	20
Cycle time	36
Total measurement time	6m 08s
Measurement start time	1 s
Cycle time	36
Excitation filter	A 595
Emission filter	empty
Gain	1591
Well scanning	none
Pause before cycle	0
Temperature Control	37 °C...incubation on
Layout:	
Content	
	S = Standard C = Control B = Blank X = Samples
Index	Start value: 1, increase
Replicates	Number 1, horizontal
Reading direction	
Concentration, Volume, Shaking	
Mode	double orbital
Shaking width	7 mm
Frequency	300 rpm
Additional shaking	before first cycle
Shaking time	5 s

Tabelle 7: *Einstellung des Programms MARS Datenanalyse Software (Version 2.41) am FLUOstar Optima für die FRAP-Analyse*

3.4.3 Lösungsherstellung

pH Lösungen

- Salzsäure (0.5 mol/l)
 - Einwaage: 50 ml HCL (37%) + 950 ml Aqua dest.
 - Laborbedarf: Messkolben
 - Anmerkung: zuerst Aqua dest. vorlegen und danach die Säure dazugeben.
- Natronlauge (0.5 mol/l)
 - Einwaage: 20 g NaOH + 1000 ml Aqua dest.
 - Laborbedarf: Messkolben + Magnetrührer
 - Anmerkung: die Lösung kann bei Raumtemperatur gelagert werden.

FRAP-Reagenz

- Acetatpuffer 300 mmol/l
 - Einwaage: 3.1 g $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ + 8 ml CH_3COOH + 992 ml Aqua dest.
 - Laborbedarf: Messkolben, Pasteurpipette, Magnetrührer
 - Anmerkung: den pH-Wert auf 3.6 einstellen und im Kühlschrank bei 4° C lagern.
- TPTZ-Lösung 10mmol/l in 40 mmol/HCL
 - Einwaage: 0.312 g TPTZ+ 585 μl HCL (25%) + 100 ml Aqua dest.
 - Laborbedarf: Messkolben, Magnetrührer, Wägeschiffchen, Pipette
 - Anmerkung: die Lösung kann im Kühlschrank bei 4° C gelagert werden.
- Eisen (III)-Chlorid- Hexahydrat 20 mmol/l
 - Einwaage: 0.541 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ + 100 ml Aqua dest.
 - Laborbedarf: Wägeschiffchen, Messkolben, Magnetrührer
 - Anmerkung: die Lösung kann im Kühlschrank bei 4° C gelagert werden.

Standard- Lösung

- Eisen (II)- Sulfat- Heptahydrat 2000 $\mu\text{mol/l}$
 - Einwaage: 0.0556g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ + 100 ml Aqua dest.
 - Laborbedarf: Wägeschiffchen, Messkolben, Magnetrührer
 - Anmerkung: die Lösung wird für die Herstellung der Standardgerade benötigt, kann im Kühlschrank bei 4° C gelagert werden.

Kontroll-Lösung

- Trolox 2500 $\mu\text{mol/l}$
 - Einwaage: Trolox pur wurde verwendet (=Stammlösung)
 - Laborbedarf: 1.5 ml Eppis
 - Anmerkung: diese Lösung wird für die Herstellung der Positivkontrolle verwendet. Die 1.5 ml Aliquote werden bei -20°C aufbewahrt.
- Phosphate Buffered Saline (PBS)
 - Einwaage: $8.2\text{ NaCl} + 0.2\text{ g KCl} + 1.2\text{g Na}_2\text{HPO}_4 + 0.2\text{g KH}_2\text{PO}_4$
 - Laborbedarf: Becherglas, Messkolben, Pasteurpipette
 - Anmerkung: die Lösung wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Der pH-Wert musste allerdings täglich auf 7.4 eingestellt werden (mit 0.5 M HCl oder 0.5 M NaOH).

3.4.4 Untersuchungsdurchführung

Der erste Arbeitsschritt bestand darin, die kühl gelagerten Lösungen (Acetatpuffer, TPTZ-Lösung, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und PBS) für 2 Stunden bei Raumtemperatur stehen zu lassen. Für die Konzentrationsgerade (siehe Tabelle oben) der Positivkontrolle Trolox wurde PBS als Verdünnungsmedium verwendet. Hierfür wurde der pH-Wert des PBS auf 7.4 entweder mit Hilfe von 0.5 M HCl oder NaOH mit einer Pasteurpipette eingestellt. Die Standardgerade mit Eisensulfat wurde anschließend mit destilliertem Wasser auf die bereits angeführten gewünschten Konzentrationen verdünnt.

Daraufhin erfolgte die Herstellung des FRAP-Reagenzes, welches aus Acetatpuffer, TPTZ-Lösung und Eisen (III)-chlorid-Hexahydrat bestand. Es wurde die Tagesmenge des Reagenzes hergestellt, da man für zwei Mikrotiterplatten die 2.5-fache Menge benötigt. In einem 50ml Falcon Tube wurden 25 ml Acetatpuffer mit einer Multipipette, je 2.5 ml TPTZ-Lösung und Eisen (III)-chlorid-Hexahydrat mit einer Kolbenhubpipette pipettiert. Die Lösung wurde gevortext und während der ganzen Analyse im vorgeheizten Wasserbad bei einer Temperatur von 37°C aufbewahrt.

Im folgenden Schritt wurden 8 EDTA-Blutplasma-Proben aus dem -80°C Tiefkühler geholt. Es ist essentiell, dass die Plasma-Proben während des ganzen Messvorgangs auf Eis in Eisboxen gelagert sind. Die zu vermessenden Proben wurden kurz vor dem Pipettieren aufgetaut und gevortext. Mittels Rückwärtspipettieren wurden zuerst $10\text{ }\mu\text{l}$ Plasma in die Vertiefungen (Wells) der Mikrotiterplatte im Doppelansatz pipettiert. Bei jedem zweiten Well pipettierte man einen Blank (Blindwert), der ausschließlich aus $10\text{ }\mu\text{l}$ Wasser bestand. Dieser

Wert wurde bei den finalen Werten der Konzentrationen von der Software automatisch abgezogen. Nach der Zugabe von 30 µl Wasser und 300 µl der FRAP-Lösung in alle Wells (sowohl Blanks, Standard, Positivkontrolle und Probe) mit einer elektronischen Eppendorfpipette musste die Messung umgehend gestartet werden. Das Maximalvolumen per Well betrug 350 µl. Dieses Schema ist in Tabelle 8 angeführt.

Pro Well	Standard (µl)	Positivkontrolle (µl)	Blank (µl)	Probe (µl)
Fe ²⁺ -Lösung (100-2000 µmol/l)	10			
Trolox-Reihe (100-2000 µmol/l)		10		
EDTA- Plasma				10
Aqua dest.	30	30	40	30
FRAP-Reagenz	300	300	300	300

Tabelle 8: *Pipettierschema für 96-Well Mikroplatten*

Der Zeitraum zwischen dem Pipettieren des FRAP-Reagenzes und dem Beginn der Messung musste möglichst geringgehalten werden, damit die Reaktion nicht schon vor der Analyse beendet wird. Es wurden zuerst alle Probanden zu Zeitpunkt 1 (vor der „exercise challenge“) gemessen und anschließend zum zweiten Zeitpunkt (nach der „exercise challenge“).

Die Einstellung des Mikrotiterplattenreader, FLUOstar optima wurde dermaßen programmiert, dass die Platte im Gerät zuerst 5 Sekunden lang geschüttelt wird und die Absorptionsänderungen für 6 Minuten in einem Intervall von 36 Sekunden gemessen wird. Da die Messung einer Platte 6 Minuten dauerte, wurde die zweite Platte parallel mit den nächsten Plasmaproben pipettiert, um einen höheren Probendurchsatzrate zu erzielen. Pro Durchlauf werden je zwei Reihen befüllt.

Ebenso ist zu betonen, dass in den ersten zwei Reihen jeder neu pipettierten Mikrotiterplatte eine parallel angesetzte Fe(II)-Standardreihe oder auch die Positivkontrolle Trolox zur Quantifizierung der Konzentrationen pipettiert wurde. In Abbildung 14 befindet sich das Layout der befüllten 96-Well Mikrotiterplatten.

Platte 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Probe	Probe	Blank	Blank	Probe	Probe	Blank	Blank	Probe	Probe
B	Fe ²⁺ Standard 1	Fe ²⁺ Standard 1	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
C	Fe ²⁺ Standard 2	Fe ²⁺ Standard 2	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
D	Fe ²⁺ Standard 3	Fe ²⁺ Standard 3	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
E	Fe ²⁺ Standard 4	Fe ²⁺ Standard 4	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
F	Fe ²⁺ Standard 5	Fe ²⁺ Standard 5	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
G	Fe ²⁺ Standard 6	Fe ²⁺ Standard 6	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
H	Fe ²⁺ Standard 7	Fe ²⁺ Standard 7	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe

Abbildung 14: Layout der 96-Well Mikrotiterplatten. Fe²⁺ (Standardlösung), Blank, Plasmaproben

Die Darstellung in Abbildung 15 zeigt das Layout der befüllten 96-Well Mikrotiterplatte.

Platte 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	Probe	Probe	Blank	Blank	Probe	Probe	Blank	Blank	Probe	Probe
B	Trolox Kontrolle 1	Trolox Kontrolle 1	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
C	Trolox Kontrolle 2	Trolox Kontrolle 2	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
D	Trolox Kontrolle 3	Trolox Kontrolle 3	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
E	Trolox Kontrolle 4	Trolox Kontrolle 4	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
F	Trolox Kontrolle 5	Trolox Kontrolle 5	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
G	Trolox Kontrolle 6	Trolox Kontrolle 6	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe
H	Trolox Kontrolle 7	Trolox Kontrolle 7	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe	Probe

Abbildung 15: Layout der 96-Well Mikrotiterplatten. Trolox, Blank, Plasmaproben

3.4.5 Auswertung

Zur Bestimmung der Konzentrationen wurde eine Standardgerade aus der Differenz der Absorptionswerte der Standardlösung und des Blindwertes erstellt. Danach konnten die Messwerte der Probe auf die Kalibriergerade übertragen und die Konzentrationen ($\mu\text{mol/l}$), wie auch die Abbildung 16 zeigt, ermittelt werden.

Berechnung anhand der Fe^{2+} -Regressionsgeradengleichung:

$$\hat{Y}_i = k * x_i + d$$

y...Absorption

k...Anstiegskoeffizient

x...Konzentration der Fe^{2+} - Lösung in $\mu\text{mol/l}$

d...Konstante (Intercept-Parameter)

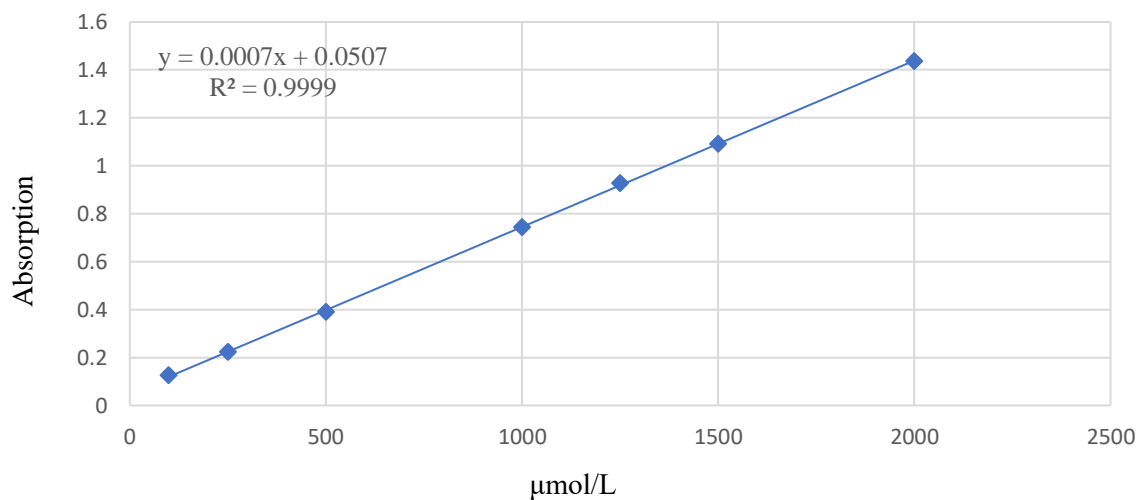


Abbildung 16: Fe^{2+} -Standardgerade zur Berechnung der FRAP-Konzentration in $\mu\text{mol/L}$

3.5 Datenmanagement und -sicherheit

Die gesammelten Daten wurden kontinuierlich auf Plausibilität und Richtigkeit für die nachfolgenden Analysen in einem Excel®-sheet eingetragen, um diese anschließend in eine SPSS-Matrix zu transformieren. Alle erhobenen Daten, Angaben und Informationen der Studienteilnehmer wurden streng vertraulich behandelt. Die erhobenen Protokolle wurden pseudonymisiert ausgewertet, d.h. durch eine Zuweisung einer ID-Nummer für die Analyse weitergegeben, sodass zwar relevante Informationen für die Untersuchung (Zuteilung zur

Fall- bzw. Kontrollgruppe) eindeutig sind, aber keine individuellen Rückschlüsse auf einzelne Personen möglich sind.

3.6 Statistische Analysen

Die deskriptiv- und inferenzstatistischen Auswertungen wurden anhand der Statistiksoftware IBM SPSS® 29.0.2 durchgeführt, wobei im schließenden Teil der Statistik das Signifikanzniveau mit $\alpha = 5\%$ – entsprechend der Irrtumswahrscheinlichkeit (Fehler 1.Art) – festgelegt wurde, womit ein Ergebnis im Rahmen der schließenden Statistik mit $p \leq 0.05$ als signifikant bezeichnet wird.

Zur Beurteilung der inhaltlichen Bedeutsamkeit von Ergebnissen wurden zudem die standardisierten Effektmaßen gemäß der Klassifikation nach Cohen (1988) herangezogen; für Ergebnisse im Rahmen von Varianzanalysen wurde die Effektgröße η^2 (eta-Quadrat) bzw. f herangezogen. Demnach werden η^2 -Werte $\geq .01$ (entsprechend $f \geq .10$) als klein, $\geq .06$ ($f \geq .25$) als mittelgroß und $\geq .14$ (entsprechend $f \geq .40$) als groß bezeichnet. Für die Effektgröße d (Cohen's Δ) im Kontext von t -Tests gelten Wertebereiche ≥ 0.20 als klein, ≥ 0.50 als moderat und ≥ 0.80 als deutlich (Cohen, 1988; Döring, 2022).

3.6.1 Deskriptive Statistik

Zur Beschreibung von metrischen Variablen wurden im Kontext der beschreibenden Statistik die Kennwerte arithmetisches Mittel (M), Standardabweichung (SD), Minimum (m), Maximum (max) sowie das alternative Lagemaß für schiefe Verteilungen, der Median (Md), und das entsprechende Streuungsmaß, der Interquartilsabstand (IQR) berechnet und angeführt. Zur Darstellung der Verteilung metrischer Messwerte wurden Balkendiagramme mit entsprechenden Fehlerindikatoren ($\pm 1 SD$) sowie Histogramme und Boxplots angefertigt. Ebenso wurden bivariate Streudiagramme erstellt, um den Zusammenhang zwischen zwei metrischen Variablen zu illustrieren.

Zur Charakterisierung von Kategorien nominal skalierten Variablen wurden die Häufigkeiten(n) sowie ihre entsprechenden Anteilswerte (%) ermittelt und angegeben. Zur Beschreibung der Beziehung von Kategorien dieses Variablentyps wurden auch Kreuztabellen verwendet.

3.6.2 Inferenzstatistik

Im Rahmen der schließenden Statistik war eine zweifaktorielle (2x2) gemischte Varianzanalyse (*mixed rmANOVA*) mit Messwiederholung, entsprechend dem Versuchsdesign, das

zentrale Verfahren der Wahl. Mit dieser Methode kann die gemeinsame Wirkung von zwei unabhängigen Faktoren auf eine abhängige, metrische, zumindest intervallskalierte und normalverteilte Variable untersucht werden. Als Prüfvoraussetzungen für den Einsatz einer ANOVA sind die Homogenität der Varianzen (mittels Levene-Tests) sowie die Normalverteilung der abhängigen Variablen zu untersuchen. Als Innersubjektfaktor (*factor within*), entsprechend der wiederholten Erfassung (vor und nach der Fahrrad-Challenge) und als Zwischensubjektfaktor (*factor between*) diene die zweistufige Gruppenbedingung, (Fall- vs. Kontrollgruppe) (Field, 2018). Der Vorteil einer zweifaktoriellen Varianzanalyse liegt darin, dass die mögliche Interaktion (Wechselwirkung) zwischen den beiden Faktoren auf Signifikanz geprüft werden kann. Bei einem signifikanten Interaktionseffekt kann davon ausgegangen werden, dass die beiden unabhängigen Variablen in einer überadditiven Weise zusammenwirken (Backhaus et al., 2018) und es ist zielführend, die beiden Faktoren in ihrer Wirkung auf die abhängige Variable mittels nachfolgender t-Tests differenziert zu beurteilen. Die Verteilungsannahme der Messwertreihen in den beiden Gruppen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit speziell mittels Kolmogorov-Smirnov-Tests geprüft (Field, 2018), kann aber bei Stichprobenumfängen ab etwa $n=30$ auch auf Grundlage der Gültigkeit des zentralen Grenzwerttheorems angenommen werden (Döring, 2022).

Zur Prüfung der Unterschiedlichkeit einer zumindest intervallskalierten, metrischen Messwertreihe im Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben wurde der Student's *t*-Test herangezogen. Hiermit wird analysiert, ob sich die beiden Gruppen hinsichtlich ihrer Mittelwerte dieses Merkmals signifikant voneinander unterscheiden. Dieses Verfahren ist nur unter Voraussetzung der Normalverteilung und der Varianzhomogenität der Daten zulässig, wobei die Homogenität der Varianzen durch den Levene-Test geprüft wird (Weiß, 2019). Sofern die Homogenität nicht angenommen werden konnte, war methodeneinheitlich der *t*-Test für heterogene Varianzen, der auch als „Welch-Test“ bezeichnet wird, zu verwenden. Diese Inferenzstatistik wird herangezogen, um auch das Alpha-Risiko einzuschränken und eine höhere Trennschärfe zu gewährleisten (Kubinger et al., 2009). Der Mann-Whitney U-Test wurde als Methode der Wahl bei schiefen Datenverteilungen verwendet, der sich in diesem Fall als robust gegenüber dieser Einschränkung verhält und dem *t*-Test vorzuziehen ist. Die Prüfgröße dieses Rangsummen-Verfahrens zum Vergleich von zwei unabhängigen Stichproben ist z-verteilt (Weiß, 2019)

Der t-Test für verbundene bzw. abhängige Stichproben wurde herangezogen, um für Daten mit Messwiederholung (sog. Messwertepaare) die Veränderung zwischen zwei Zeitpunkten

zu prüfen. Als Voraussetzung zur Anwendbarkeit dieser Inferenzstatistik gilt die Normalverteilungsannahme der metrischen Messwertdifferenzen (Weiß, 2019).

Der Zusammenhang zwischen zwei zumindest intervallskalierten und normalverteilten Variablen – im Rahmen dieser Studie zwischen den beiden FRAP-Konzentrationen – wurde mittels Koeffizient r der Produkt-Moment-Korrelation quantifiziert. Der Wert kann zwischen -1 und +1 liegen und drückt Richtung sowie Stärke des Zusammenhangs aus. Unter der Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen den beiden Variablen kann auch das Bestimmtheitsmaß R^2 , das den erklärten Varianzanteil angibt, ausgedrückt werden (Weiß, 2019).

Um auch den gemeinsamen Einfluss von Kovariaten bzw. Prädiktoren auf ein metrisches Kriterium (FRAP-Veränderung) untersuchen zu können, wurde eine multiple lineare Regression als Modellprüfung angewendet.

Mit dieser Inferenzstatistik kann der gemeinsame Erklärungswert von Kovariaten und Prädiktorvariablen für das Kriterium geprüft werden. Ebenso wird das Ausmaß der Modellanpassung der metrischen bzw. dichotome Prädiktoren anhand des multiplen Bestimmtheitsmaßes R^2 beurteilbar. Mit der Annahme eines linearen Zusammenhangs soll die Kriteriumsvariable aus den Kovariaten und Prädiktoren geschätzt werden. Das Ziel ist, diejenigen Faktoren in die Modellberechnungen einzuschließen, die einen signifikanten Einfluss auf das Kriterium ausüben und einen möglichst hohen Varianzanteil erklären. Zu den Voraussetzungen für die Durchführbarkeit der multiplen linearen Regression zählen annähernd normalverteilte Residuen der Prädiktorvariablen und ebenso die weitgehende Unkorreliertheit der Prädiktoren, d.h. keine Multikollinearität. Dies ist mittels des Toleranzkoeffizienten zu prüfen und dieser sollte je Prädiktor ≥ 0.2 liegen.

Zudem ist die Homoskedastizität notwendig, d.h. die Residuenstreuung in den verschiedenen Bereichen der unabhängigen Variablen soll gleichförmig sein. Bei der Ergebnisdarstellung werden zudem 95%-Konfidenzintervalle (KI) [Untere Grenze (UG); obere Grenze (OG)] als Bereichsschätzungen zur Angabe der Lage des Erwartungswert des unstandardisierten Regressionskoeffizienten B angeführt. Die Prüfgröße t je Prädiktor ergibt sich aus dem Quotienten B/SE , d.h. aus dem Verhältnis des unstandardisierten Regressionskoeffizienten zum Standardfehler. Die Beurteilung, ob und inwieweit den einzelnen Prädiktoren ein relevantes Gewicht im Rahmen des Modells zukommt, wird mit dem standardisierten Regressionskoeffizienten β möglich (Field, 2018).

4 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden zunächst die Stichprobeneigenschaften beschrieben und daran anschließend erfolgt die Darstellung der Analyseresultate zur Beantwortung der Fragestellung.

4.1 Stichprobe

Die Stichprobe umfasste 90 Personen, von denen – entsprechend dem Versuchsdesign vor und nach der Fahrrad-Challenge – die Bilirubin- Konzentrationen bekannt war. Die Zuteilung zu Fall- bzw. Kontrollgruppe sollte darüber hinaus gleichmäßig unter Berücksichtigung des Geschlechts und der beiden Altersstufen (≤ 35 / > 35 Jahre) erfolgen. Tabelle 9 zeigt die Verteilung der Teilnehmenden in der Fall- und Kontrollgruppe unter Berücksichtigung von Alter und Geschlecht.

Altersstufe	Geschlecht	Zuordnung		Gesamt
		Fallgruppe (FG)	Kontrollgruppe (KG)	
≤ 35 J.	männlich	13 (27,7%)	14 (29,8%)	27 (57,4%)
	weiblich	10 (21,3%)	10 (21,3%)	20 (42,6%)
	Gesamt	23 (48,9%)	24 (51,1%)	47 (100%)
> 35 J.	männlich	14 (32,6%)	12 (27,9%)	26 (60,5%)
	weiblich	9 (20,9%)	8 (18,6%)	17 (39,5%)
	Gesamt	23 (53,5%)	20 (46,5%)	43 (100%)
Gesamt	männlich	27 (30,0%)	26 (28,9%)	53 (58,9%)
	weiblich	19 (21,1%)	18 (20,0%)	37 (41,1%)
	Insgesamt	46 (51,1%)	44 (48,9%)	90 (100%)

Tabelle 9: Häufigkeiten und Anteilswerte (Zellenprozente) des Geschlechts der Teilnehmenden und der beiden Altersstufen bezüglich der Zuordnung zu Fall- und Kontrollgruppe

Demnach umfasste die Fallgruppe 46 (51,1%) und die Kontrollgruppe 44 (48,9%) der Teilnehmenden, während die Altersverteilung für bis zu 35-Jährige 47 (52,2 %) und für über 35-Jährige 43 (47,8%) Personen umfasste, womit jeweils eine Gleichverteilung angenommen werden kann. Ebenso unterlag das Geschlecht der Probanden einer nicht signifikant unterschiedlichen Verteilung, d.h. mit 58,9 % männlichen und 41,1 % weiblichen Teilnehmenden kann auf Grundlage des Tests zur Prüfung einer Gleichverteilung mit $\chi^2(1) = 2.844$, $p = .092$ noch von vergleichbaren Anteilswerten der Geschlechter ausgegangen werden. Auch

innerhalb der beiden Gruppen war das Verhältnis der beiden Geschlechter vergleichbar, wie das nicht signifikante Ergebnis des Chi-Quadrat-Tests zeigt, $\chi^2(1) = 0.001, p = .970$.

Somit kann eine ausgeglichene Zuteilung der Teilnehmenden bezüglich Geschlecht und Alter angenommen werden.

Nachfolgend sind die Stichprobeneigenschaften, beginnend mit dem Alter, unter Berücksichtigung der beiden Gruppen und des Geschlechts der Teilnehmenden, beschrieben, wie auch Tabelle 10 sowie die Darstellungen mittels Histogramm in Abbildung 18 anhand von Boxplots in Abbildung 18 zeigen.

Geschlecht	Fallgruppe	KG	Gesamt
weiblich $M \pm SD$ (n)	36,2 \pm 11,1 (19)	35,9 \pm 11,4 (18)	36,1 \pm 12,3 (37)
min - max	22,3 – 62,0	20,8 – 63,0	20,8 – 63,0
Md (IQR)	34,9 (28,0; 40,0)	31,8 (28,5; 40,3)	32,8 (28,5; 40,1)
männlich $M \pm SD$ (n)	36,8 \pm 14,1 (27)	36,2 \pm 12,4 (26)	36,5 \pm 13,2 (53)
min - max	19,3 – 59,4	21,2 – 61,1	19,3 – 61,1
Md (IQR)	35,2 (23,8; 52,1)	34,3 (25,2; 49,3)	34,7 (24,7; 50,6)
Gesamt $M \pm SD$ (n)	36,5 \pm 12,8 (46)	36,1 \pm 11,9 (44)	36,3 \pm 12,3 (90)
min - max	19,3 – 62,0	20,8 – 63,0	19,3 – 63,0
Md (IQR)	35,0 (24,7; 48,5)	33,3 (27,1; 43,6)	34,3 (26,1; 46,6)

Tabelle 10: Kennwerte des Lebensalters (Jahre) unter Berücksichtigung der Gruppen und Geschlechts der Teilnehmenden

Die Prüfung der Unterschiedlichkeit des Lebensalters bezüglich der beiden Gruppen sowie des Geschlechts mittels t-Tests zeigte jeweils keine signifikanten Unterschiede, p 's $> .05$.

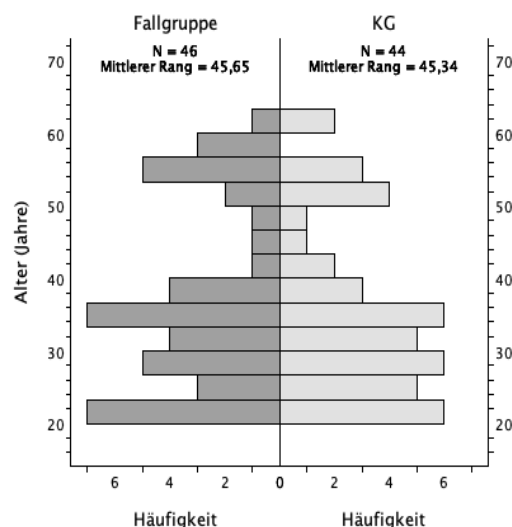


Abbildung 17: Altersstruktur der Teilnehmenden bezüglich der beiden Gruppen

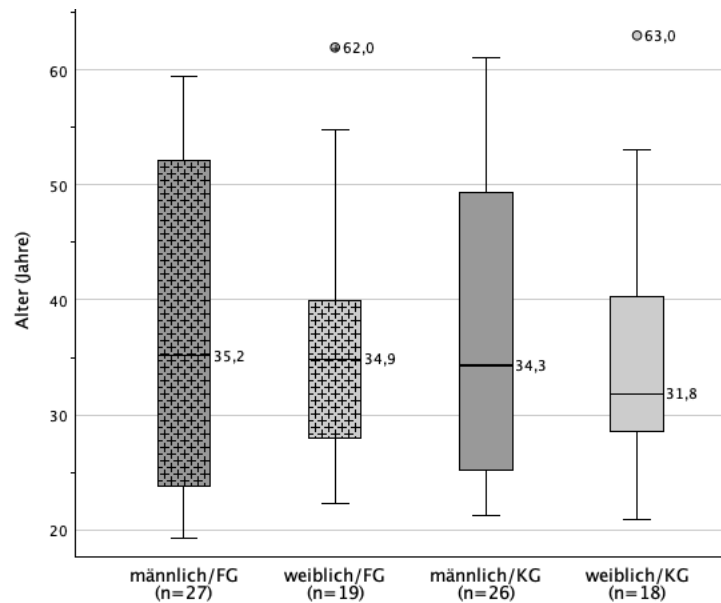


Abbildung 18: Altersverteilung unter Berücksichtigung der Gruppen und Geschlechts der Teilnehmenden

Ebenso wurden die anthropometrischen Größen BMI, HC-WC und FFM. zwischen den beiden Gruppen vergleichend gegenübergestellt. Die Normalverteilungsannahme der Messwertreihen in den beiden Gruppen konnte nach Prüfung durch Kolmogorov-Smirnov-Tests jeweils beibehalten werden, $p's > .05$, während die heterogenen Varianzen durch methodeneinheitliche Prüfung mittels Welch-t-Testung berücksichtigt wurden. Die Kennwerte sowie die Ergebnisse der Signifikanzprüfung zeigt Tabelle 11.

BMI	Fallgruppe (n=46)	KG (n=44)	Gesamt (N=90)	p-Wert
$M \pm SD$ (n)	$22,68 \pm 2,78$	$24,08 \pm 3,82$	$23,37 \pm 3,38$.053°
min – max	17,82 – 29,66	18,15 – 35,78	17,82 – 35,78	
Md (IQR)	22,57 (20,76; 24,20)	23,33 (21,51; 26,17)	22,89 (21,18; 24,72)	
HC-WC	n=46	n=43	n=89	
$M \pm SD$ (n)	,797 \pm ,064	,805 \pm ,068	,801 \pm ,066	.571
min - max	,691 - ,958	,706 – ,972	,691 - ,972	
Md (IQR)	,787 (,752; ,820)	,798 (,753; ,842)	,796 (,752; ,836)	
FFM (%)	n=46	n=44	N=90	
$M \pm SD$ (n)	76,22 \pm 7,35	74,75 \pm 11,62	75,50 \pm 9,64	.478
min - max	61,5 – 90,3	32,1 – 89,9	32,1 – 90,3	
Md (IQR)	76,6 (69,8; 80,8)	75,4 (69,5; 84,5)	76,1 (69,8; 82,7)	

° $p \leq .10$ (Tendenz)

Tabelle 11: Kennwerte der anthropometrischen Größen bezüglich der beiden Gruppen (n=gültige Datenprotokolle)

Auch die Prüfung der anthropometrischen Größen in vergleichender Gegenüberstellung der beiden Gruppen zeigte keine signifikanten Unterschiede, p 's $>.05$, sodass für die nachfolgenden Analysen von vergleichbaren Voraussetzungen in den beiden Gruppen ausgegangen werden kann.

4.2 Analyseresultate

In diesem Abschnitt wird zunächst der Frage nachgegangen, ob und inwieweit höhere Bilirubinwerte mit den zu T1 erhobenen Blutparametern HDL, Cholesterin, LDL und TG in einem Zusammenhang stehen. Zu diesem Zweck wurden die FG und KG und mittels Welch t-Tests (für HDL, Chol, LDL konnte die Normalverteilung der Messwerte angenommen werden) sowie U-Testung (für TG waren die schiefen Messwerteverteilungen zu beachten) einander gegenübergestellt.

HDL mg/dl	Fallgruppe (n=46)	KG (n=44)	Gesamt (N=90)	p-Wert (Effekt)
$M \pm SD$ (n)	61,11 \pm 12,50	57,77 \pm 10,61	59,48 \pm 11,67	
min – max	34 – 92	33 – 79	33 – 92	,175
Md (IQR)	59,0 (53,0; 66,0)	58,0 (51,5; 64,5)	59,0 (53,0; 66,0)	($d = 0,29$)
Chol mg/dl	n=46	n=44	N=90	
$M \pm SD$ (n)	158,7 \pm 31,5	169,8 \pm 28,7	164,1 \pm 30,5	
min - max	95 – 231	118 – 232	95 - 232	,084°
Md (IQR)	158,5 (133,0; 181,0)	170,0 (152,5; 185,5)	168,0 (142,0; 183,0)	($d = -0,37$)
LDL mg/dl	n=46	n=44	N=90	
$M \pm SD$ (n)	85,65 \pm 19,78	94,61 \pm 20,32	90,03 \pm 20,43	
min – max	49 – 138	56 – 143	49 – 143	,037*
Md (IQR)	87,5 (70,0; 98,0)	95,0 (80,5; 105,0)	91,5 (73,0; 104,0)	($d = -0,45$)
TG mg/dl	n=46	n=44	N=90	
$M \pm SD$ (n)	73,96 \pm 51,84	81,30 \pm 34,53	77,54 \pm 44,14	
min – max	34 – 359	33 – 217	33 – 359	,047*
Md (IQR)	63,0 (48,0; 79,0)	71,0 (56,0; 104,5)	64,5 (54,0; 91,0)	($d = -0,43$)

* $p \leq .05$, ° $p \leq .10$ (Tendenz)

Tabelle 12: Kennwerte der Blutparameter HDL, Chol und TG (mg/dl) bezüglich der beiden Gruppen

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass für die Fallgruppe mit erhöhtem Bilirubin keine signifikant höheren Werte bei HDL, jedoch tendenziell höhere Werte für die Kontrollgruppe bei Cholesterin und signifikant höhere Werte für LDL und TG mit kleinen Effekten angenommen werden können.

Zur Untersuchung der primären Fragestellung werden nachfolgend die Ergebnisse zur Prüfung der Veränderung der FRAP- Konzentration anhand der beiden Gruppen (Fallgruppe: Bilirubin erhöht vs. Kontrollgruppe: Bilirubin normal) dargelegt. Zunächst wurde die Veränderung von FRAP als Differenz sowohl absolut als auch in Prozent errechnet, wobei positive Werte auf eine Verbesserung im Sinne einer Zunahme von FRAP hinweisen. Als Ausgangswert mit 100% diente FRAP je Gruppe zu T1. Tabelle 13 zeigt die ermittelten FRAP- Konzentrationen mit den Kennwerten zu T1 und T2, das Ausmaß der Veränderung in den beiden Gruppen sowie die jeweilige Zunahme in Prozent.

Gruppe	T1	T2	Veränderung	Prozent	<i>p</i> -Wert
FG (n=46)	866,9 ± 169,4	923,4 ± 165,9	+56,5 ± 56,3	+6,5%	,420
min - max	543,9 – 1325,3	641,7 – 1305,1			
KG (n=44)	761,4 ± 139,9	808,0 ± 138,7	+46,6 ± 59,9	+6,1%	
min - max	507,0 – 1072,6	596,1 – 1153,0			
Gesamt (N=90)	815,3 ± 163,6	867,0 ± 163,0			
min - max	507,0 – 1325,3	596,1 – 1305,1			

Tabelle 13: Kennwerte ($M \pm SD$) sowie Spannweite (min-max) der FRAP-Konzentration ($\mu\text{mol/L}$) je Gruppe zu den beiden Erhebungszeitpunkten sowie absolute und relative (%) Differenzen

Die Prüfung der Unterschiedlichkeit der Veränderung in den beiden Gruppen mittel *t*-Test für unabhängige Stichproben zeigte ein nicht signifikantes Ergebnis, $p = .420$, wie auch die Abbildung 19 veranschaulicht.

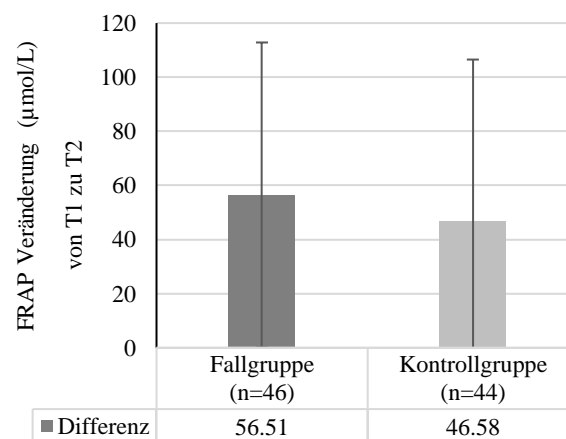


Abbildung 19: Mittlere Zunahmen der FRAP-Konzentration bezüglich der beiden Gruppen

Ebenso wurde der Unterschied der FRAP-Konzentration zwischen den beiden Gruppen sowohl zu T1 als auch zu T2 geprüft. Die entsprechenden *t*-Tests für unabhängige Stichproben zeigten zu T1 ($p = .002$, $d = 0.68$) und zu T2 ($p < .001$, $d = 0.75$) jeweils signifikant

höhere FRAP-Konzentrationen für die Fallgruppe mit moderaten Effekten, wie auch die Abbildung 20 veranschaulicht.

Zur Prüfung der Veränderung der FRAP zwischen den beiden Erhebungszeitpunkten T1 (pre) und T2 (post) als zweistufiger Innersubjektfaktor in Abhängigkeit der beiden Gruppen (normal vs. erhöht) als zweistufiger Zwischensubjektfaktor wurde entsprechend eine zweifaktorielle (2x2), gemischte Varianzanalyse berechnet. Die Prüfgröße zur Beurteilung der Interaktion zwischen den beiden Faktoren Zeit und Gruppe ergab mit $F(1,88) = 0.657$, $p = .420$ ein nicht signifikantes Ergebnis, sodass die Haupteffekte Zeit ($F(1, 88) = 70.745$, $p < .001$, $\eta^2 = .45$) und Gruppenfaktor ($F(1, 88) = 11.931$, $p < .001$, $\eta^2 = .12$) differenziert zu interpretieren waren. Demnach kann insgesamt eine Zunahme von FRAP mit einem deutlichen Effekt und ein durchgängig moderater Unterschied zwischen den beiden Gruppen zu T1 und T2 abgeleitet werden. Die ermittelten FRAP-Kennwerte vor und nach der Fahrrad-Challenge bezüglich der beiden Gruppen veranschaulicht Abbildung 20.

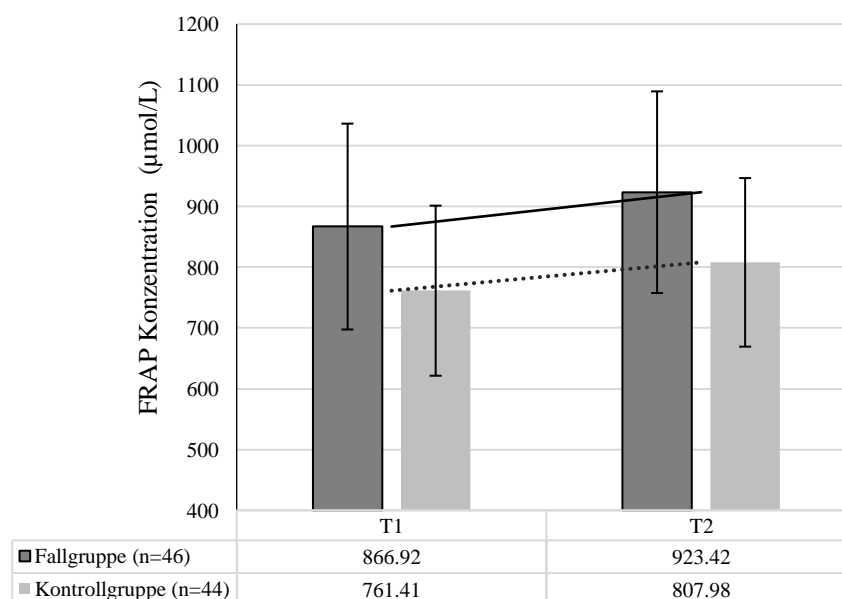


Abbildung 20: Ermittelte FRAP-Konzentrationen ($M \pm 1$ SD) unter Berücksichtigung der beiden Gruppen zu T1 und T2

Anhand der Prüfung der Veränderung der FRAP zwischen T1 und T2 bezüglich (getrennt) der beiden Gruppen mittels t-Test für abhängige Stichproben zeigte sich für die FG ($p < .001$, $d = 1.00$) eine deutliche und für die KG ($p < .001$, $d = 0.78$) eine moderate, jeweils signifikante Zunahme. Aus der Veränderung der FRAP in der KG und FG kann daher eine Differenz der Effekte von $d = 0.22$ zu Gunsten der FG mit erhöhtem Bilirubin abgeleitet werden, die als

kleiner Nettoeffekt bezeichnet werden kann. Demnach kann der FG ein schwacher Effekt für eine höhere Veränderung gegenüber der KG zugeschrieben werden.

Darüber hinaus wurden zur Beurteilung der individuellen Veränderung des FRAP in den beiden Gruppen die Produkt-Moment-Korrelationen berechnet. Je höher der Koeffizient r ausfällt, desto eher ist auf eine Einheitlichkeit der Veränderung zu schließen. Insgesamt konnte mit $r(90) = .94$, 95%-KI [.91; .96] eine vergleichsweise sehr homogene Veränderung verzeichnet werden. Zudem zeigten sich gruppenspezifisch für die FG mit $r(46) = .94$, 95%-KI [.90; .97] und für die KG mit $r(44) = .91$, 95%-KI [.84; .95] ähnlich hohe Werte. Es konnten in der FG 40/46 (87%) FRAP-Zunahmen und 6/46 (13%) FRAP-Abnahmen verzeichnet werden. In der KG waren 37/44 (84,1%) Zunahmen und 7/44 (15,9%) Abnahmen zu beobachten.

Die Abbildung 21 zeigt das Ausmaß der individuellen Veränderungen, wobei der Punkteschwarm im bivariaten Streudiagramm durch den Verlauf der linearen Regressionsfunktion idealtypisch veranschaulicht wird und zur Darstellung des Zusammenhangs der FRAP-Konzentrationen zu T1 und T2 dient.

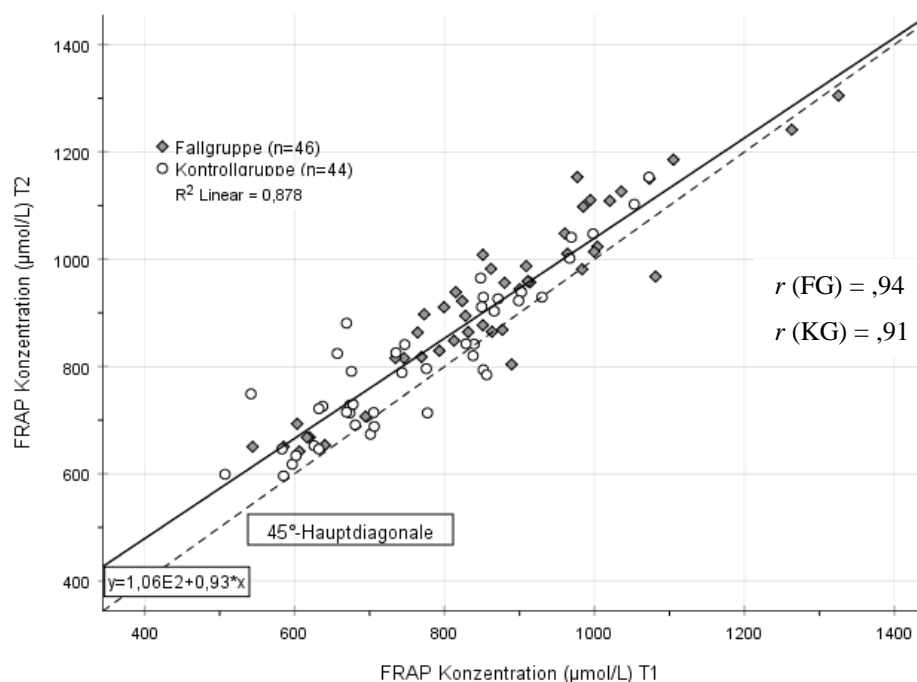


Abbildung 21: Bivariates Streudiagramm für den Zusammenhang der FRAP-Konzentrationen zu T1 und T2 unter Berücksichtigung der beiden Gruppen

Anhand der Regressionsfunktion $\hat{Y}_i = (1,06 \cdot 10^2) + 0,93 \cdot x_i$ kann beispielsweise für eine FRAP-Konzentration von $x_i = 800 \mu\text{mol/L}$ zu T1 ein Wert von $\hat{Y}_i = 850 \mu\text{mol/L}$ zu T2 erwartet werden und eine durchschnittliche Zunahme von 6,3% abgeleitet werden. Die 45°-

Hauptdiagonale zeigt als Linie wiederum jenen Bereich an, wo keine Veränderung von FRAP auftrat, während insgesamt jene 85,6 % Personen, die sich links oberhalb dieser Diagonale befinden eine Zunahme zu verzeichnen hatten.

Um auch den Zusammenhang des am Tag der Fahrrad-Challenge erhobenen unkonjugierten Bilirubins mit der FRAP-Veränderung beurteilen zu können, wurde der Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern untersucht. Dementsprechend veranschaulicht das bivariate Streudiagramm in Abbildung 22 die Beziehung zwischen diesen beiden Messgrößen anhand der Regressionsgeraden und der zugehörigen linearen Geradengleichung.

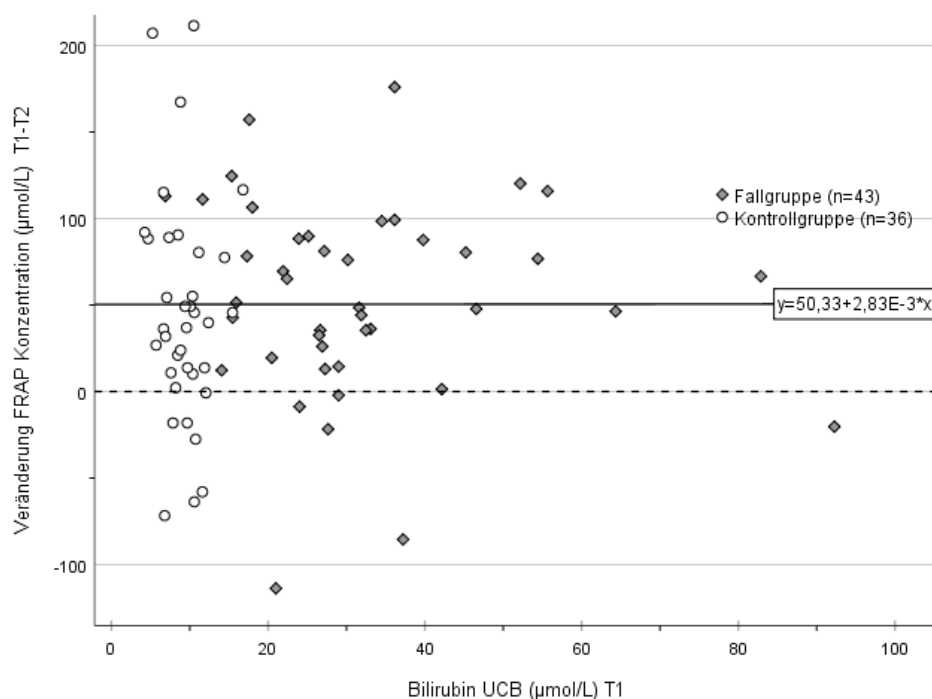


Abbildung 22: Bivariates Streudiagramm für die Beziehung zwischen Bilirubin am Tag der Fahrrad-Challenge und FRAP-Veränderung unter Berücksichtigung der beiden Gruppen aufgrund der zuvor erfolgten Einteilung mit Regressionsgerade (n=79 gültige Protokolle)

Es kann angenommen werden, dass das unkonjugierte Bilirubin ($\mu\text{mol/L}$) und die FRAP-Veränderung in keinem Zusammenhang stehen. Der entsprechende Koeffizient der Produkt-Moment-Korrelation fiel entsprechend mit $r(79) = .001$, $p = .994$ nicht signifikant aus, womit die beiden Messgrößen als voneinander unabhängig anzusehen sind. Anhand der Regressionsfunktion $\hat{Y}_i = (50.33 + 2.83E^{-3} * x_i)$ kann beispielsweise für eine UCB-Konzentration von $x_i = 17 \mu\text{mol/L}$ zu T1 eine FRAP-Veränderung im Sinne einer Zunahme von $\hat{Y}_i = 50.4 \mu\text{mol/L}$ zwischen T1 und T2 erwartet werden.

Schließlich wurde im Rahmen einer Modellprüfung mittels multipler linearer Regression die Möglichkeit der Vorhersage des Ausmaßes der FRAP-Veränderung anhand der Kovariaten Geschlecht [dichotom; (0) *weiblich*, (1) *männlich*], Lebensalter [metrisch; Jahre] sowie BMI [metrisch; kg/m²], Taillen-Hüftumfang [HC-WC; metrischer Quotient] und der fettfreien Körpermasse [FFM; metrisch %] und der anhand des unkonjugierten Bilirubinwerts vorgenommenen Gruppeneinteilung [dichotom; (1) *FG*, (2) *KG*] geprüft. Die Aufnahme der Prädiktoren in die Modellprüfung erfolgte blockweise in drei hierarchischen Schritten, beginnend mit Geschlecht und Lebensalter und im letzten Modellschritt sind schließlich alle Kovariaten und Prädiktoren gemeinsam berücksichtigt. Anzumerken ist, dass für einzelne fehlende Werte von Prädiktoren (z.B. HC-WC) die in SPSS verfügbare Methode zur regressionsanalytischen Schätzung der mittleren Messwerte angewendet wurde.

Modellschritt und Prädiktor	Nicht stand. Koeffizienten		Stand. Koeffizient β	Prüf- größe t	p -Wert	95%-KI B	
	B	SE				UG	OG
1	(Konstante)	42,695	20,062	2,128	,036	2,820	82,570
	Geschlecht	-8,533	12,503	-,073	-,682	-,497	-33,385
	Alter (Jahre)	,343	,504	,073	,681	,498	-,658
2	(Konstante)	-107,88	177,301	-,608	,545	-460,464	244,701
	Geschlecht	5,007	21,784	,043	,230	,819	-38,313
	Alter (Jahre)	,336	,639	,071	,526	,600	-,935
	BMI (kg/m ²)	3,267	3,441	,191	,949	,345	-3,576
	HC-WC (Quotient)	-6,772	173,599	-,008	-,039	,969	-351,992
	FFM (%)	,985	1,234	,164	,798	,427	-1,469
3	(Konstante)	-108,46	177,155	-,612	,542	-460,812	243,896
	Geschlecht	6,626	21,818	,057	,304	,762	-36,770
	Alter (Jahre)	,295	,640	,062	,461	,646	-,977
	BMI (kg/m ²)	4110	3,528	240	1,165	,247	-2,907
	HC-WC (Quotient)	-15,935	173,667	-,018	-,092	,927	-361,352
	FFM (%)	1,111	1,238	,185	,897	,372	-1,352
	Gruppe (FG, KG)	-13,737	12,870	-,119	-1,067	,289	-39,336

Tabelle 14: *Koeffizienten der Prädiktoren im Modell für das Kriterium FRAP-Veränderung (N=90)*

Das Ergebnis der Modellprüfung zeigte keinen signifikanten Erklärungswert der Kovariaten und Prädiktoren für das Kriterium FRAP-Veränderung, p 's $>.05$. Das entsprechende Bestimmtheitsmaß R^2 für den gesamten Erklärungswert erreichte 3,7 %.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob Personen, die einen leicht erhöhten Bilirubinspiegel bei einem einmaligen Ausdauertraining aufweisen, vor der überschüssigen Entstehung freier Radikale geschützt sind im Vergleich zu einer Kontrollgruppe mit einer physiologischen Bilirubinkonzentration im Blut. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Veränderung der antioxidativen Kapazität von weiteren Sekundärparametern abhängt.

Die Testmethode FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) ist ein einfaches und prinzipiell unkompliziertes Verfahren zur Bestimmung der antioxidativen Kapazität im Plasma. Je höher die erhobene FRAP-Konzentration ($\mu\text{mol/L}$) ist, desto stärker ausgeprägt sind die antioxidativen Schutzmechanismen des Organismus und desto effektiver ist somit die Bekämpfung freier Radikale und deren schädlichen Folgen.

Im Zuge der statistischen Analysen wurde festgestellt, dass die Gilbert-Syndrom Fallgruppe bereits vor der Durchführung des Ausdauertrainings höhere FRAP-Konzentrationen aufweisen, was positiv mit den erhöhten unkonjugierten Bilirubinkonzentrationen zusammenhängt, diese Beobachtung spiegelt sich auch in bisherigen Studien wider (Wagner et al., 2021). Diese Erkenntnis bestätigt, dass Personen mit Gilbert Syndrom stärker ausgeprägte antioxidative Schutzmechanismen aufgrund des antioxidativen Potenzial des Bilirubins besitzen, wie in auch in zahlreichen vergangenen Studien gezeigt werden konnte (Cui et al., 2023).

Darüber hinaus wurde der Zusammenhang hinsichtlich der Zunahme der FRAP-Konzentration und weiteren Parametern in den Gruppen untersucht. Der BMI Wert war zwar unabhängig vom Geschlecht in der GS-Gruppe niedriger, korrelierte aber nicht mit der Zunahme der antioxidativen Kapazität. Allerdings verläuft das Resultat übereinstimmend zu den in der Literatur gefundenen Beobachtungen und eine mild erhöhte Bilirubinkonzentration kann als präventiver Faktor für zahlreiche chronische, metabolische Erkrankungen angesehen werden (Jenko-Praznika et al., 2013; Wallner et al 2013a, b; Wagner et al., 2021).

Zudem zeigte sich eine positive Korrelation zwischen einer erhöhten Konzentration an Bilirubin und dem Lipidprofil der Probanden. Demnach hängen die HDL-Werte positiv und die LDL-, Cholesterin- und Triglyceride- negativ mit einer erhöhten Konzentration an unkonjugierten Bilirubin zusammen. Dies konnte ebenfalls in vorangegangenen Studien festgestellt werden und kann als weiterer Beleg für ein niedrigeres Risiko bei Personen mit

dem Gilbert Syndrom, einer Stoffwechselveränderung zu erkranken, angesehen werden (Mölzer et al., 2016).

Ebenso wurden die möglichen Korrelationen zwischen der FRAP-Veränderung und dem Alter, dem Geschlecht und mehrerer anthropometrischer Messgrößen (BMI, HC-WC, FFM) der Probanden geprüft. Hierzu wurden ausschließlich die Daten zum ersten Messzeitpunkt T1 miteinbezogen. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der entsprechenden Modellprüfung, dass das Ausmaß der FRAP-Veränderung in keinem statistisch relevanten Zusammenhang mit den Kovariaten Alter und Geschlecht, noch mit den angeführten anthropometrischen Größen im Zusammenhang steht.

Interessanterweise besteht eine hohe Korrelation zwischen der FRAP Konzentration zum ersten Zeitpunkt der Messung (vor der Exercise Challenge) und zum zweiten Zeitpunkt der Messung (nach der Exercise Challenge). Somit ist eine Vorhersage der Zunahme der FRAP-Konzentration möglich, was aber wiederum darauf hindeutet, dass die Zunahme der Veränderung nicht mit den Bilirubinkonzentrationen erklärbar ist.

Es ist bekannt, dass sportliche Belastung zu einem Anstieg der freien Radikale im Blut führt, wodurch es zu einer Erhöhung der antioxidativen Gesamtkapazität kommt (Davies et al., 1982).

Die Resultate dieser Masterarbeit zeigen, dass eine Zunahme der FRAP-Konzentration in der Fallgruppe um 56,5 $\mu\text{mol/L}$ (6,5%) und in der Kontrollgruppe um 46,6 $\mu\text{mol/L}$ (6,1%) zu beobachten war, womit ein kleiner Effekt für ein höheres Ausmaß von $d = 0,22$ zu Gunsten der FG angenommen werden kann.

5.1 Limitationen

Eine Einschränkung der vorliegenden Studie waren einzelne fehlende Daten bei HC-WC; diese konnten jedoch im Rahmen der Modellprüfungen durch regressionsanalytische Messwertschätzungen importiert werden.

6 Abstract

Eine intensive körperliche Belastung ist mit einer erhöhten Produktion freier Radikale verbunden. Freie Radikale sind allerdings auch für viele physiologische Prozesse bedeutsam, wie die Stärkung des Immunsystems und die Beibehaltung der Homöostase. Der Körper besitzt zahlreiche antioxidative Schutzmechanismen, um die negativen Auswirkungen freier Radikale zu kompensieren. Wenn es zu einem Ungleichgewicht zwischen freien Radikalen und den natürlichen antioxidativen Abwehrmechanismen des Körpers kommt, werden die Makromoleküle oxidativ verändert und funktionell beeinträchtigt, was zur Pathogenese vieler Stoffwechselerkrankungen führen kann.

In diesem Kontext spielt Bilirubin als potentes Antioxidans eine wesentliche Rolle. Zahlreiche Studien konnten bereits die Bedeutung von Bilirubin im Zusammenhang mit enzymatischen Schutzmechanismen des Körpers bestätigen. Durch das antioxidative als auch antiinflammatorische Potenzial von Bilirubin haben jene Personen mit einer leicht erhöhten Konzentration an Bilirubin (Gilbert Syndrom) ein niedrigeres Risiko an chronischen Erkrankungen, wie z.B. Diabetes Mellitus 2, Arteriosklerose aber auch verschiedenen Krebserkrankungen, zu erkranken.

Um diese Erkenntnisse zu bestätigen, wurde eine Fall-Kontroll-Studie zu zwei Erhebungszeitpunkten durchgeführt, wobei Personen mit Gilbert Syndrom (leicht erhöhte Bilirubinkonzentration) und die Kontrollgruppe Probanden mit physiologischen Bilirubinkonzentrationen darstellten. Das Ziel der vorliegenden Studie war gemäß der Fragestellung, die antioxidative Kapazität bei einem einmaligen Fahrrad-Challenge zwischen den beiden Gruppen zu vergleichen. Es wurde somit untersucht, ob die Fallgruppe durch das antioxidative Potenzial des Bilirubins vor der Entstehung freier Radikale besser geschützt ist. Die antioxidative Kapazität im Plasma wurde mittels des FRAP-Assays gemessen. Es konnten insgesamt 90 Personen eingeschlossen werden und diese wurden in eine Fall- bzw. Kontrollgruppe, basierend auf ihrem unkonjugierten Bilirubinspiegel, eingeteilt.

Mittels statistischer Analysen konnte festgestellt werden, dass die Fallgruppe bereits eine höhere FRAP-Konzentration aufwies und diese nach dem Ausdauertraining im Vergleich zur Kontrollgruppe etwas vermehrt anstieg.

7 Summary

Intense physical exercise is associated with an increased production of free radicals. Free radicals which are important for many physiological processes, such as strengthening the immune system and maintaining homeostasis. The body has numerous antioxidant protection mechanisms to compensate for the negative effects of free radicals. When there is an imbalance between free radicals and the body's natural antioxidant defense mechanisms, macromolecules are oxidatively altered and functionally impaired, leading to the pathogenesis of many metabolic diseases.

In this context, bilirubin plays an important role as a potent antioxidant. Many studies have already confirmed the importance of bilirubin for enzymatic protective mechanisms of the body. Due to the antioxidant and anti-inflammatory potential of bilirubin, people with a slightly increased concentration of bilirubin have a lower risk of suffering from many diseases, such as diabetes mellitus 2, arteriosclerosis and various cancers.

To confirm this knowledge, a case-control study was conducted in a cross-sectional design, with the cases being people with Gilbert's syndrome (=slightly elevated bilirubin concentration) and the control group being subjects with physiological bilirubin concentrations. The aim of this study was to compare the antioxidant capacity during a single cycling challenge between the two groups. It was thus investigated whether the case group is better protected against the formation of free radicals by the antioxidant potential of bilirubin. The antioxidant capacity in plasma was measured using the FRAP assay. In this study, 90 participants were included and divided into the case and control groups based on their unconjugated bilirubin levels.

Statistical analysis showed that the case group already had a higher FRAP concentration and that this increased slightly more after endurance training compared to the control group.

8 Literaturverzeichnis

Afanas'ev, I." Signaling and Damaging Functions of Free Radicals in Aging—Free Radical Theory, Hormesis, and TOR." *Aging and Disease*, vol 1., no.2, 2010, pp. 14.

Alamu, O., et al. "Differential sensitivity of two endothelial cell lines to hydrogen peroxide toxicity: Relevance for in vitro studies of the blood–brain barrier." *Cells*, vol. 9, no. 2, 10 Feb. 2020, p. 403, <https://doi.org/10.3390/cells9020403>.

Aono, S., et al. "Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome." *The Lancet*, vol. 345, no. 8955, Apr. 1995, pp. 958–959, [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)90702-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)90702-5).

Arias, I. M. "Chronic unconjugated hyperbilirubinemia without overt signs of hemolysis in adolescents and adults*." *Journal of Clinical Investigation*, vol. 41, no. 12, 1 Dec. 1962, pp. 2233–2245, <https://doi.org/10.1172/jci104682>.

Asad, S. F., et al. "Prooxidant and antioxidant activities of bilirubin and its metabolic precursor biliverdin: A structure–activity study." *Chemico-Biological Interactions*, vol. 137, no. 1, July 2001, pp. 59–74, [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(01\)00209-5](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(01)00209-5).

Barnes, P.J. (2020) "Oxidative stress-based therapeutics in COPD", *Redox Biology*, 33, p. 101544. doi: 10.1016/j.redox.2020.101544.

Backhaus, K. et al. "Multivariate Analysenmethoden: eine anwendungsorientierte Einführung." Springer Gabler. 15.Auflage, 2018

Benzie, I. F.F., and J.J. Strain. "The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': The FRAP assay." *Analytical Biochemistry*, vol. 239, no. 1, July 1996, pp. 70–76, <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>.

Bergmann, K., et al. "Association of serum total bilirubin with traditional and novel cardiovascular risk factors in apparently healthy subjects". *Folia Medica Copernicana*, vol 3, no.1, March 2015, pp. 26-31.

Bonett, R., et al. "The structure of Bilirubin." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, vol. 202, no. 1147, June 1978, pp. 249–268, <https://doi.org/10.1098/rspb.1978.0066>.

Bosma, P. J., et al. "The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDP-glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome." *New England Journal of Medicine*, vol. 333, no. 18, Nov. 1995, pp. 1171–1175, <https://doi.org/10.1056/nejm199511023331802>.

Brieger, K., et al. "Reactive oxygen species: From health to disease." *Swiss Medical Weekly*, vol.142, no. w13659, Aug. 2012, <https://doi.org/10.4414/smw.2012.13659>.

Burchell, B., and R Hume. "Molecular genetic basis of Gilbert's syndrome." *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 14, no. 10, Oct. 1999, pp. 960–966, <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.1999.01984.x>.

Ching, S., et al. "Serum levels of micronutrients, antioxidants and total antioxidant status predict risk of breast cancer in a case control study." *The Journal of Nutrition*, vol. 132, no. 2, Feb. 2002, pp. 303–306, <https://doi.org/10.1093/jn/132.2.303>.

Chrzanowski-Smith, O. J., et al. "The day-to-day reliability of peak fat oxidation and Fatmax." *European Journal of Applied Physiology*, vol. 120, no. 8, June 2020, pp. 1745–1759, <https://doi.org/10.1007/s00421-020-04397-3>.

Cohen, J. "Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences." L. Erlbaum Associates, 2. Auflage, 1988, p.273 ff.

Conti, C. P. S. "Bilirubin: The toxic mechanisms of an antioxidant molecule." *Archivos argentines de pediatria*, vol. 119, no. 1, Feb. 2021, <https://doi.org/10.5546/aap.2021.eng.e18>.

Creeden, J. F., et al. "Bilirubin as a metabolic hormone: The physiological relevance of Low Levels." *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, vol. 320, no. 2, Feb. 2021, pp. 16-59, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00405.2020>.

Crigler, J F Jr, and V A Najjar. "Congenital familial nonhemolytic jaundice with kernicterus." *Pediatrics* vol. 10, no.2, 1952, pp. 169-80.

Cui, Y., et al. "Toward nanotechnology-enabled application of bilirubin in the treatment and diagnosis of various civilization diseases." *Materials Today Bio*, vol. 20, June 2023, p. 100658, <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100658>.

Darimont, J. und Kullak-Ublick, G A. "Erkrankungen des Bilirubinstoffwechsels und der Gallenbildung." 1. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, 2008, pp. 1681-1683.

Davidson, A R., et al. "Reduced caloric intake and nicotinic acid provocation tests in the diagnosis of Gilbert's syndrome." *BMJ*, vol. 2, no. 5969, May 1975, pp. 480–480, <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5969.480>.

Davies, K. J.A., et al. "Free radicals and tissue damage produced by exercise." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 107, no. 4, Aug. 1982, pp. 1198–1205, [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(82\)80124-1](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(82)80124-1).

Döring, N. "Forschungsmethoden Und Evaluation in Den Sozial- Und Humanwissenschaften." Springer Berlin, 6. Auflage, 2022, pp. 471 ff.

Duguay, Y., et al. "The functional UGT1A1 promoter polymorphism decreases endometrial cancer risk." *Cancer Research*, vol. 64, no. 3, Feb. 2004, pp. 1202–1207, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-3295>.

Ehmer, U., et al. "Rapid allelic discrimination by taqman PCR for the detection of the Gilbert's syndrome marker UGT1A1*28." *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 10, no. 6, Nov. 2008, pp. 549–552, <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080036>.

Faul, F. et al. "G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, Behavioral, and Biomedical Sciences." *Behavior Research Methods*, vol 39, no 2, May 2007, pp. 175-191, <https://doi.org/10.3758/bf03183146>.

Franco, M. C., et al. "Superoxide dismutase and oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis." *Current Advances in Amyotrophic Lateral Sclerosis*, Sept. 2013, <https://doi.org/10.5772/56488>.

Field, A. "Discovering Statistics using IBM SPSS Statistics. North American Edition." SAGE, 2018, pp. 643 ff.

Ganten, D. et al., “Molekularmedizinische Grundlagen von Para- Und Autokrinen Regulationsstörungen.” Springer Berlin Heidelberg, 2006, pp. 159-194.

Gilbert, A. und Lereboulett, P. “La cholemie simple familiale. “ *Semaine med* , no 21, 1901, pp. 241-248.

Gomes, M. J., et al. “Skeletal muscle aging: Influence of oxidative stress and physical exercise.” *Oncotarget*, vol. 8, no. 12, Jan. 2017, pp. 20428–20440, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14670>.

Gossauer, A. “Catabolism of Tetrapyrroles”. *CHIMIA*, vol. 48, no. 9, Sept. 1994, p. 352, <https://doi:10.2533/chimia.1994.352>.

Halliwell, B. und J. M. Gutteridge. “Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease.” *The Biochemical journal* vol. 219, no. 1, 1984, pp. 1-14, <https://doi:10.1042/bj2190001>.

Hansen, T. W., et al. “Molecular physiology and pathophysiology of bilirubin handling by the blood, liver, intestine, and brain in the newborn.” *Physiological Reviews*, vol. 100, no. 3, July 2020, pp. 1291–1346, <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2019>.

Hayashi, S., et al. “Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene.” *Gene*, vol. 336, no. 2, July 2004, pp. 241–250, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.04.002>.

Heinecke JW et al. “Dityrosine, a specific marker of oxidation, is synthesized by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide system of human neutrophils and macrophages. *The Journal of biological chemistry*, vol. 268, no. 6, 1993, pp. 4069–4077.

Heinrich, P. et al., “Löffler/Petrides: Biochemie und Pathobiochemie.” 10.Auflage, Springer Medizin Verlag, p. 502.

Hensley, K. et al., “Reactive oxygen species and protein oxidation in aging: A look back, a look ahead.” *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 397, no. 2, Jan. 2002, pp. 377–383, <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2630>.

Hunt, S. C., et al. “Association of plasma bilirubin with coronary heart disease and segregation of bilirubin as a major gene trait: The NHLBI Family Heart Study.”

Atherosclerosis, vol. 154, no. 3, Feb. 2001, pp. 747–754, [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(00\)00420-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(00)00420-2).

Jacobi, G. et al., “Kursbuch Anti-Aging.“ Georg Thieme Verlag, 2005, pp. 82-88.

Jeney, V., et al. “Natural history of the bruise: Formation, elimination, and biological effects of oxidized hemoglobin.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2013, 2013, pp. 1–9, <https://doi.org/10.1155/2013/703571>.

Jenko-Pražnikar, Zala, et al. “Serum bilirubin levels are lower in overweight asymptomatic middle-aged adults: An early indicator of metabolic syndrome?” *Metabolism*, vol. 62, no. 7, July 2013, pp. 976–985, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2013.01.011>.

Ji, L.L. “Antioxidants and oxidative stress in Exercise”, *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, vol. 222, no. 3, 1999, pp. 283–292. doi:10.1046/j.1525-1373.1999.d01-145.x.

Kirkamm, R., et al. “Spezielle Labordiagnostik für präventive und komplementäre Medizin.“ 2. Auflage, Elsevier GmbH, 2023, pp. 273-278.

Knez, W.L., et al. “Ultra-endurance exercise and oxidative damage: implications for cardiovascular health.” *Sports Medicine*, vol. 3, no. 5, 2006, pp. 429–441. doi:10.2165/00007256-200636050-00005.

Kobayashi, A., et al. “Synergetic antioxidant and vasodilatory action of carbon monoxide in angiotensin II–induced cardiac hypertrophy.” *Hypertension*, vol. 50, no. 6, Dec. 2007, pp. 1040–1048, <https://doi.org/10.1161/hypertensionaha.107.097006>.

Koolman J und Röhm KH. Taschenatlas:Biochemie 5. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2018, p. 200.

Kondo, H., et al. “Oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization.” *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 142, no. 4, Aug. 1991, pp. 527–528, <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1991.tb09191.x>.

Kubinger, K. et al. “Nachrichten aus Instituten und Institutionen.” *Psychologische Rundschau*, vol. 60, no. 1, Jan. 2009, pp. 26-27, <https://doi.org/10.1026/0033-3042.60.1.60>.

Levitt, D., and M., Levitt. “Quantitative assessment of the multiple processes responsible for bilirubin homeostasis in health and disease.” *Clinical and Experimental Gastroenterology*, vol. 7, Sept. 2014, p. 307-328, <https://doi.org/10.2147/ceg.s64283>.

Liguori, I., et al. “Oxidative stress, aging, and diseases.” *Clinical Interventions in Aging*, vol. 13, Apr. 2018, pp. 757–772. doi:10.2147/cia.s158513.

Löffler, E., et al. “Biochemie und Pathochemie. Untersuchung der antikanzerogenen Wirkung von Biliverdin, Biliverdin-Dimethylester, Stercobilin und Urobilin auf HepG2-Zellen.“ 8. Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2007, pp. 621-627.

Löffler, G. “Basiswissen Biochemie mit Pathochemie.“ 7. Auflage, Springer Medizin Verlag, 2008, p. 178.

Lothar, T. “Labor Und Diagnose: Indikation Und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik.“ 8. Auflage, 2. Band, TH-Books Verlagsgesellschaft, 2012, pp.1266-1273.

Madhavan, M., “Serum bilirubin distribution and its relation to cardiovascular risk in children and young adults.” *Atherosclerosis*, vol. 131, no. 1, May 1997, pp. 107–113, [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(97\)06088-7](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(97)06088-7).

Manta, B., et al. “Regulated methionine oxidation by monooxygenases.” *Free radical biology and medicine*, vol.109, 2017, pp.141–155, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.010>.

Martin, M., “Das Standardlabor in der naturheilkundlichen Praxis.“ 4. Auflage, Elsevier GmbH, Urban und Fischer Verlag, 2014, pp. 243-247.

Maruhashi, T., et al. “Bilirubin and endothelial function.” *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, vol. 26, no. 8, Aug. 2019, pp. 688–696, <https://doi.org/10.5551/jat.rv17035>.

McCord, J.M. und Edeas, M.A. ‘SOD, oxidative stress and human pathologies: A brief history and a future vision’, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 59, no. 4, Mar. 2005, pp. 139–142. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2005.03.005>.

Mölzer, C., et al. “Characteristics of the heme catabolic pathway in mild unconjugated hyperbilirubinemia and their associations with inflammation and disease prevention.” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, Apr. 2017, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00933-y>.

Mölzer, C. et al. “Features of an altered AMPK metabolic pathway in Gilbert’s syndrome, and its role in Metabolic Health.” *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, 21 July 2016, <https://doi.org/10.1038/srep30051>.

Munteanu, I. G., et al. “Analytical methods used in determining antioxidant activity: A Review.” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 7, Mar. 2021, p. 3380, <https://doi.org/10.3390/ijms22073380>.

Muraca, M. und J. Fevery. “Influence of sex and sex steroids on bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activity of rat liver.” *Gastroenterology*, vol. 87, no. 2, Aug. 1984, pp. 308–313, [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(84\)90705-4](https://doi.org/10.1016/0016-5085(84)90705-4).

Murthy, D. G., et al. “The utility of rifampin in diagnosing Gilbert’s syndrome.” *American Journal of Gastroenterology*, vol. 96, no. 4, Apr. 2001, pp. 1150–1154, <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2001.03693.x>.

Neubauer, O., et al., “No indication of persistent oxidative stress in response to an ironman triathlon.” *Medicine and science in sports and exercise*, vol. 40, no.12, Dec. 2008, pp. 2119–2128, <https://doi.org/10.1249/MSS.0b013e3181824dab>.

Owens, D., and S. Sherlock. “Diagnosis of Gilbert’s syndrome: Role of reduced Caloric Intake Test.” *BMJ*, vol. 3, no. 5880, Sept. 1973, pp. 559–563, <https://doi.org/10.1136/bmj.3.5880.559>.

Phaniendra, A., et al., “Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases.” *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, vol. 30, no.1, July 2015, pp. 11–26. <https://doi.org/10.1007/s12291-014-0446-0>.

Pingitore, A., et al. “Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports.” *Nutrition*, vol. 31, no. 7–8, Feb. 2015, pp. 916–922, <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.02.005>.

Poblete-Aro, C., et al. “Efecto del Ejercicio Físico sobre marcadores de estrés oxidativo en pacientes con diabetes mellitus Tipo 2.” *Revista Médica de Chile*, vol. 146, no. 3, Mar. 2018, pp. 362–372, <https://doi.org/10.4067/s0034-98872018000300362>.

Powers, S.K., et al. "Reactive oxygen species are signalling molecules for skeletal muscle adaptation." *Experimental Physiology*, vol. 95, no. 1, 15 Dec. 2009, pp. 1–9, <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2009.050526>.

Schmid, R. "Gilbert's syndrome - a legitimate genetic anomaly?" *The New England Journal of Medicine*, vol. 333, no. 18, Nov. 1995, pp. 1217–1218, <https://doi.org/10.1056/nejm199511023331812>.

Sen, C.K. "Antioxidants in exercise nutrition.", *Sports Medicine*, vol. 31, no.13, 2001 pp. 891–908. <https://doi.org/10.2165/00007256-200131130-00001>.

Sies, H. "Oxidative eustress: On constant alert for redox homeostasis.", *Redox Biology*, vol. 41, May 2021, p. 101867. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101867>.

Silbernagl, S., und Despopoulos, A. "Taschenatlas der Physiologie." 6. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003, p.250.

Tapan, S. et al. "Decreased small dense LDL levels in Gilbert's syndrome." *Clinical Biochemistry*, vol. 44, no. 4, Mar. 2011, pp. 300–303, <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2010.12.003>.

Temme, E. H.M., et al. "Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population", vol.12, no. 10, Dec. 2001, pp. 887–894, <https://doi.org/10.1023/a:1013794407325>.

Thomsen, H. F. et al. "Diagnosis of Gilbert's syndrome. Reliability of the caloric restriction and phenobarbital stimulation tests." *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, vol. 16, no. 5, Aug. 1981, pp. 699–703, <https://doi.org/10.3109/00365528109182033>.

Tripathi, A. K. et al. "Molecular and therapeutic insights of alpha-lipoic acid as a potential molecule for disease prevention." *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 33, no. 2, Feb. 2023, pp. 272–287, <https://doi.org/10.1007/s43450-023-00370-1>.

Valentini, J. "Entwicklung einer Mikrotiterplatte basierten Methode zur Bestimmung der Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP). Diplomarbeit an der Universität Wien, 2009, pp. 28-32.

Viña, J., et al. “Free radicals in exhaustive physical exercise: Mechanism of production, and protection by antioxidants.” *IUBMB Life*, vol. 50, no. 4–5, Oct. 2000, pp. 271–277, <https://doi.org/10.1080/713803729>.

Vítek, L. “Bilirubin and atherosclerotic diseases.” *Physiological Research*, vol. 66, no. 1, Apr. 2017, pp. S11-S20, <https://doi.org/10.33549/physiolres.933581>.

Vítek, L., und Harvey A. Schwertner. “Protective effects of serum bilirubin on peripheral vascular disease.” *Annals of Hepatology*, vol. 7, no. 1, Jan. 2008, pp. 94–95, [https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)31897-6](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)31897-6).

Vítek, L., und Harvey A. Schwertner. “The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases.” *Advances in Clinical Chemistry*, vol. 43, 2007, pp. 1–57, [https://doi.org/10.1016/s0065-2423\(06\)43001-8](https://doi.org/10.1016/s0065-2423(06)43001-8).

Vitek, L., und J. Donald Ostrow. “Bilirubin chemistry and metabolism; harmful and protective aspects.” *Current Pharmaceutical Design*, vol. 15, no. 25, Sept. 2009, pp. 2869–2883, <https://doi.org/10.2174/138161209789058237>.

Vítek, L. “Bilirubin as a signaling molecule.” *Medicinal Research Reviews*, vol. 40, no. 4, Feb. 2020, pp. 1335–1351, <https://doi.org/10.1002/med.21660>.

Wagner, Karl-Heinz et al. “Diagnostic criteria and contributors to Gilbert’s syndrome.” *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, vol. 55, no. 2, Feb. 2018, pp. 129–139, <https://doi.org/10.1080/10408363.2018.1428526>.

Wagner, Karl-Heinz et al. “Looking to the horizon: The role of bilirubin in the development and prevention of age-related chronic diseases.” *Clinical Science*, vol. 129, no. 1, Apr. 2015, pp. 1–25, <https://doi.org/10.1042/cs20140566>.

Wagner, K.-H., et al. “Oxidative stress and related biomarkers in Gilbert’s syndrome: A secondary analysis of two case-control studies.” *Antioxidants*, vol. 10, no. 9, Sept. 2021, p. 1474, <https://doi.org/10.3390/antiox10091474>.

Wallner, M. et al. “Protection from age-related increase in lipid biomarkers and inflammation contributes to cardiovascular protection in Gilbert’s syndrome.” *Clinical Science*, vol. 125, no. 5, 10 May 2013, pp. 257–264, <https://doi.org/10.1042/cs20120661>.

Wallner, M. et al. "Haem Catabolism: A novel modulator of inflammation in gilbert's syndrome." *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 43, no. 9, 19 July 2013, pp. 912–919, <https://doi.org/10.1111/eci.12120>.

Wang, X., et al. "Bilirubin metabolism: Applied Physiology." *Current Paediatrics*, vol. 16, no. 1, Feb. 2006, pp. 70–74, <https://doi.org/10.1016/j.cupe.2005.10.002>.

Winterbourn C. C, und A. J Kettle. "Redox reactions and microbial killing in the neutrophil phagosome." *Antioxidants and redox signaling*, vol.18, no.6, 2013, pp.642660, <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4827>.

Weiß, C. et al. "Basiswissen Medizinische Statistik." 7. Auflage, Springer Verlag GmbH, 2019, pp. 147 ff.

Yao, J. K., et al. "Abnormal age-related changes of plasma antioxidant proteins in schizophrenia." *Psychiatry Research*, vol. 97, no. 2–3, Dec. 2000, pp. 137–151, [https://doi.org/10.1016/s0165-1781\(00\)00230-4](https://doi.org/10.1016/s0165-1781(00)00230-4).