



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Antioxidativer Status von Personen mit Gilbert’s Syndrom“

Verfasserin

Melanie Gierer

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, im September 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Ernährungswissenschaften

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

Vorwort

Mein Dank gilt Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner für die Möglichkeit am Institut für Ernährungswissenschaften erstmals in einem wissenschaftlichen Forschungsteam zu arbeiten und im Zuge einer Studie schließlich diese Diplomarbeit anzufertigen. Bedanken möchte ich mich auch für die exzellente Betreuung während meiner Zeit am Institut und dass er mir jederzeit beratend zur Seite stand.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Mag. Marlies Wallner für ihre fachliche und organisatorische Unterstützung. Durch ihr Engagement wurde die Studie, im Zuge derer ich diese Arbeit verfassen konnte erst ermöglicht. Zudem möchte ich mich für ihre fachliche Hilfe im Labor und anschließend bei der Auswertung und Anfertigen der Arbeit und ihre Geduld dabei herzlich bedanken.

Widmen möchte ich die Diplomarbeit meiner Familie, die mich bei dieser Arbeit und dem vorausgegangenem Studium nicht nur finanziell, sondern zugleich moralisch unterstützt haben. Durch ihr stetes Interesse an meinem Studium, ihre Geduld und ihr Verständnis für meine Vorhaben haben sie mir fortwährend beim Erreichen meiner Ziele geholfen.

Meinem Freund danke ich für die unendliche Geduld, die motivierenden Worte und seine Unterstützung in allen Belangen. Nicht zuletzt auch dank seiner fachlichen Hilfestellungen beim Erstellen sowie Korrekturlesen dieser Arbeit, war es mir möglich, diese fertig zu stellen.

Ein großer Dank gilt auch meinen Freunden, die mir immer helfen und mich in meinem Bestrebungen stützen und so unentbehrliche Begeiter darstellen.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, dass alle Stellen der Arbeit, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Quellen übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht sind und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Wien, den 14.09.2012 Melanie Gierer

Gleichheitsgrundsatz:

Zur besseren Lesbarkeit wurde in der vorliegenden Diplomarbeit darauf verzichtet, geschlechtsspezifische Formulierungen zu verwenden. Es wird jedoch mit Nachdruck darauf hingewiesen, dass bei der Verwendung der maskulinen Form beide Geschlechter angesprochen sind und keine Wertung oder Diskriminierung der nicht- genannten Form intuiert war. Im Studienkollektiv waren Frauen und Männer vertreten.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Die Physiologie und Pathophysiologie von Bilirubin	3
2.1.1	Synthese von Bilirubin - biochemische Grundlagen	3
2.1.2	Bioverfügbarkeit und Regulation der Bilirubinkonzentration	6
2.1.3	Pathophysiologie des Bilirubinstoffwechsels	6
2.1.3.1	Morbus Gilbert-Meulengracht	7
2.1.3.2	Weitere Hyperbilirubinämien	9
2.2	Oxidativer Stress	9
2.2.1	Was ist oxidativer Stress	9
2.2.1.1	Auf welche Weise können Radikale reagieren?	12
2.2.2	Biologische Bedeutung von oxidativem Stress	13
2.2.3	Biologische Bedeutung von Antioxidantien	15
2.3	Das antioxidative Potenzial von Bilirubin, Biliverdin und ihrer Enzyme	18
2.3.1	Wirkungsmechanismen von Bilirubin	18
2.3.1.1	Konjugiertes Bilirubin	20
2.3.1.2	Albumin-gebundenes Bilirubin	20
2.3.1.3	Unkonjugiertes Bilirubin	21
2.3.2	Wirkungsmechanismen anderer Gallenpigmente und Enzyme	24
2.3.2.1	Die Häm-Oxygenasen	24
2.3.2.2	Die Biliverdin-Reduktase	25
2.3.2.3	Biliverdin	26
2.4	Das Zusammenspiel von antioxidativ wirksamen Molekülen unter pathologischen Bedingungen	27
2.4.1	Bilirubin und kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs und andere, durch oxidativen Stress induzierte Erkrankungen	32

3	Material und Methoden	39
3.1	Studiendesign	39
3.1.1	Rekrutierung der Studienteilnehmer	39
3.1.2	Ein- bzw. Ausschlusskriterien	40
3.1.3	Studienteilnehmer	41
3.1.4	Zeitlicher Studienverlauf	42
3.1.5	Blutaufbereitung	42
3.2	Photometrische Methoden	43
3.2.1	Bestimmung von Vitamin C (L-Ascorbinsäure) im Plasma	43
3.2.1.1	Prinzip der Methode	43
3.2.1.2	Materialien und Geräte	44
3.2.1.3	Gebrauchslösungen	44
3.2.1.4	Durchführung	46
3.2.1.5	Auswertung der Messergebnisse	47
3.2.1.6	Qualität der Methode	47
3.2.2	Bestimmung von Glutathion im Vollblut	48
3.2.2.1	Prinzip der Methode	48
3.2.2.2	Materialien und Geräte	48
3.2.2.3	Gebrauchslösungen	49
3.2.2.4	Durchführung	50
3.2.2.5	Auswertung der Messergebnisse	51
3.2.2.6	Qualität der Methode	51
3.3	High Performance Liquid Chromatography HPLC	52
3.3.1	Bestimmung von Vitamin A, Vitamin E und Carotinoiden im Blutplasma	52
3.3.1.1	Prinzip der Methode	52
3.3.1.2	Materialien und Geräte	52
3.3.1.3	HPLC: Geräteeinstellungen	54
3.3.1.4	Durchführung	54
3.3.1.4.1	Chromatogramme	55
3.3.1.5	Auswertung der Messergebnisse	56
3.3.1.6	Qualität der Methode	57

3.3.2	Bestimmung von Ubichinon 50 im Blutplasma	58
3.3.2.1	Prinzip der Methode	58
3.3.2.2	Materialien und Geräte	58
3.3.2.3	HPLC: Geräteeinstellungen	59
3.3.2.4	Durchführung	59
3.3.2.5	Chromatographische Auftrennung	60
3.3.2.5.1	Chromatogramm	60
3.3.2.6	Auswertung der Messergebnisse	61
3.3.2.7	Qualität der Methode	61
3.3.3	Bestimmung von Vitamin K ₁ im Blutplasma	61
3.3.3.1	Prinzip der Methode	61
3.3.3.2	Materialien und Geräte	62
3.3.3.3	HPLC: Geräteeinstellungen	63
3.3.3.4	Gebrauchslösungen	63
3.3.3.5	Durchführung	64
3.3.3.6	Chromatographische Auftrennung	64
3.3.3.6.1	Chromatogramm	65
3.3.3.7	Auswertung der Messergebnisse	65
3.3.3.8	Qualität der Methode	66
3.4	Statistische Auswertung	66

4 Ergebnisse und deren Diskussion 68

4.1	Allgemeine Daten	68
4.2	Vitamin A und Carotinoide	70
4.2.1	Retinol	70
4.2.2	Lutein	72
4.2.3	β -Cryptoxanthin	75
4.2.4	Lycopin	77
4.2.5	α -Carotin	80
4.2.6	β -Carotin	83

4.3	Vitamin E	85
4.3.1	α -Tocopherol	85
4.3.2	γ -Tocopherol	88
4.4	Vitamin K ₁	91
4.5	Ubichinon 50	93
4.6	Vitamin C	96
4.7	Glutathion	98
4.8	Diskussion der Ergebnisse	101
4.8.1	Schlussbetrachtung	117

5 Zusammenfassung 119

6 Summary 122

Literaturverzeichnis	124
Abbildungsverzeichnis	139
Tabellenverzeichnis	142

Curriculum vitae 145

1 Einleitung und Fragestellung

Herz-Kreislaufkrankungen stellen die häufigsten Todesursachen weltweit dar: sie sind für durchschnittlich 30% der Todesfälle verantwortlich [Libby, 2012].

In Europa sind 48% der Todesfälle auf Herz-Kreislaufkrankungen zurückzuführen, wobei in der Europäischen Union jährlich 2 Millionen Menschen aufgrund koronarer Herzkrankungen versterben [Rayner et al., 2009].

In Österreich waren im Jahr 2010 laut Todesursachenstatistik der Statistik Austria Herz-Kreislaufkrankungen und Krebs die häufigsten Todesursachen zwischen dem 40.-70. Lebensjahr.

Obwohl seit den 1970er Jahren die Mortalitätsraten für Herz-Kreislaufkrankungen und Krebs um bis zu 30% gesunken sind, werden diese auch zukünftig das Erkrankungsspektrum und die Todesursachenstatistik anführen [Statistik Austria, Stand 24.05.2012].

Gerade deshalb ist und bleibt die Thematik Ursachen- und Präventionsforschung ein wichtiges und interessantes wissenschaftliches Gebiet und so gibt es bereits zahlreiche Studien in mannigfacher Ausführung, die sich dieser Thematik widmen.

Seit nun mehr als 20 Jahren werden in diesem Zusammenhang Gallenpigmente untersucht und ihrem proklamierten antioxidativen Potential wurde sich bereits in diversen Arbeiten verschiedener Autoren gewidmet, so auch dem Bereich der angeborenen Bilirubin-Stoffwechselstörungen, wie Morbus Gilbert-Meulengracht.

Die ersten Hypothesen zur antioxidativen Wirkung des Bilirubins wurden aber bereits im Jahr 1954 von den Autoren Bernard, Ritzel und Steiner formuliert.

Weitere epidemiologische Untersuchungen brachten schließlich Belege, dass Personen mit Gilbert's Syndrom einen erhöhten Schutz vor koronaren Herzerkrankungen und Krebs aufweisen. Zusätzlich konnten zellschützende, DNA-protective sowie entzündungshemmende Wirkungen der Gallenpigmente, vor allem in vitro nachgewiesen werden.

Da bis dato kaum Daten über oxidative DNA Schädigung von Personen mit Gilbert's Syndrom vorliegen, war es Ziel der vorliegenden Studie Informationen zur DNA-Stabilität bei Betroffenen mit Morbus Gilbert im Vergleich zu Nicht-Betroffenen zu erhalten.

Dafür sollte die antigenotoxische Wirkung von Bilirubin, basierend auf Ergebnissen aus präklinischen Untersuchungen und epidemiologischen Studien geprüft werden (siehe Kapitel 2.4).

Um mit einer Studie am Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien, Emerging Field „Oxidative Stress and DNA Stability“ zu prüfen, dass mäßig erhöhtes unkonjugiertes Bilirubin positive Effekte auf Indikatoren zur Beschreibung von oxidativen Schäden hat, wurden selektive Biomarker erhoben, um Aussagen zu oxidativem Stress, Entzündungsparametern, kardiovaskulären Parametern sowie dem Ernährungsstatus machen zu können. Diese Studie wurde in Kooperation mit der Griffith University Australia, der University of Queensland, Australia, dem Department of Pharmacognosy der Universität Wien sowie dem Department of Clinical Pharmacology der University Hospital, Kopenhagen (Dänemark) durchgeführt.

Diese Diplomarbeit befasst sich im Rahmen dieser Studie mit dem antioxidativen Status von Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zu einer Kontrollgruppe.

Um den antioxidativen Status aller Studienteilnehmer beurteilen zu können wurden folgende Parameter analysiert: Vitamin A, Vitamin C, Vitamin E, Vitamin K, ausgewählte Carotinoide, Glutathion und Ubichinon 50. Somit wurden sowohl Plasmakonzentrationen endogen synthetisierter Antioxidantien (Glutathion, Ubichinon 50), als auch exogen, mit der Nahrung zugeführter Antioxidantien (Vitamin A, Vitamin C, Vitamin E, Vitamin K, Carotinoide) in die Bewertung des Status miteinbezogen.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Physiologie und Pathophysiologie von Bilirubin

Da Literatur zum Thema Physiologie und Pathophysiologie der Gallenfarbstoffe, als auch zur Thematik des oxidativen Stresses und den Abwehrmechanismen des menschlichen Organismus bereits in mannigfacher Ausführung vorliegt, wird im Folgenden lediglich auf die, zum Verständnis relevanten Themengebiete eingegangen. So kann die zu Grunde liegende Literatur ausführlich und umfassend in anderen Arbeiten, Büchern und Studien, wovon einige in der Referenzliste dieser Arbeit zu finden sind, nachgelesen werden.

2.1.1 Synthese von Bilirubin - biochemische Grundlagen

Bilirubin entsteht als Produkt beim Abbau des Blutfarbstoffes Hämoglobin im retikuloendothelialen System und wird nach Konjugation in der Leber mit der Galle ausgeschieden (siehe Abbildung 1). Es zählt somit zu den Gallenfarbstoffen [Roy-Chowdhury et al., 2006; Darimont und Kullak-Ublick, 2008].

Im menschlichen Organismus werden täglich in etwa 250 - 400 mg Bilirubin gebildet [Stocker et al., 1987a; Stocker, 2004; Roy-Chowdhury et al., 2006].

80% des Bilirubins werden durch den Abbau alternder Erythrozyten gebildet, der Rest entsteht einerseits infolge ineffektiver Erythropoese und andererseits durch Degradierung von Hämenzymen und anderen Hämproteinen, wie Myoglobin oder Cytochrom P-450 [Iyanagi et al., 1998; Darimont und Kullak-Ublick, 2008].

Hämoglobin besteht aus 4 Tetrapyrrolringen, welche durch Methinbrücken verbunden sind und über 4 Stickstoffatome der Pyrrolringe ein zweiwertiges Eisenion als Komplex gebunden haben. Häm, welches zur Klasse der Porphyrine zählt, bildet dabei die prosthetische Gruppe, welche mit einer Proteinkette, dem Globin, verbunden ist [Roy-Chowdhury et al., 2006].

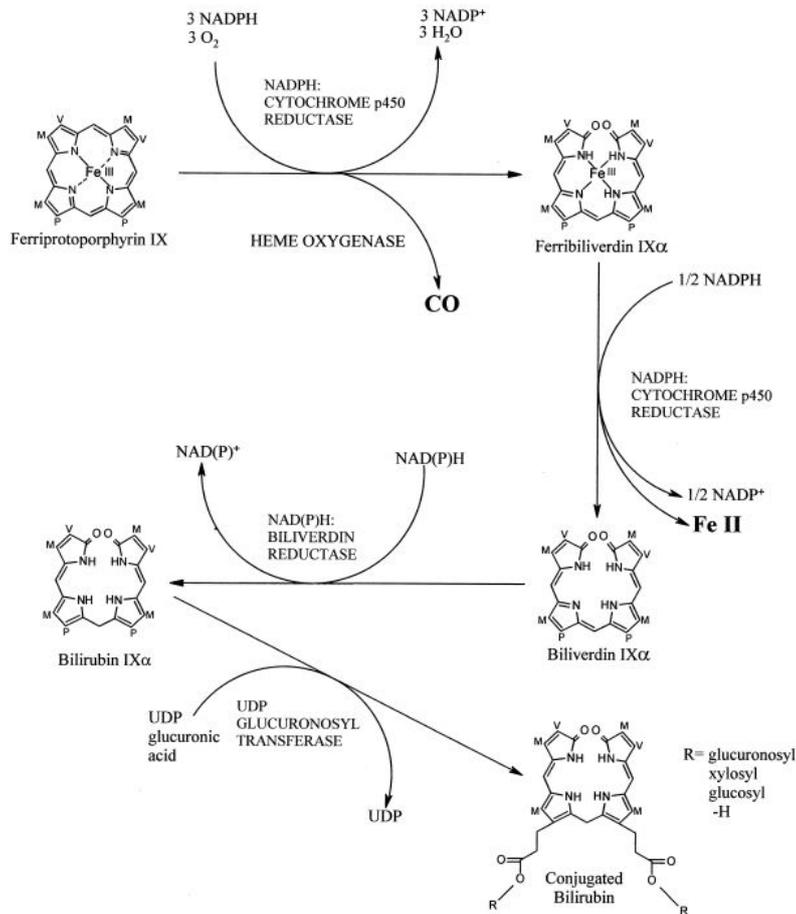


Abbildung (1) Abbau des Häms (Eisenprotoporphyrin IX) zu Bilirubin und dessen Konjugation mit Glucuronsäure (M = Methylgruppe, V = Vinylgruppe und P = Propionat) – modifiziert nach Ryter und Tyrell [2000]

Wie in Abbildung 1 gezeigt katalysiert den ersten Abbauschritt des Häms (Ferriprotoporphyrin IX) die Häm-Oxygenase, genau genommen die Häm-Oxygenase 1 [Doré et al., 1999] mit Hilfe eines reduzierenden Cofaktors, wie NADPH oder FAD und Sauerstoff. Dabei wird nach Abbinden des Globins die α -Methinbrücke gespalten und das Kohlenstoffatom als Kohlenstoffmonoxid (CO) abgelöst. Dabei entsteht zunächst ein Biliverdin-Eisenkomplex (Ferribiliverdin IX α), welcher in einer weiteren NADPH-abhängigen Reduktion das Eisenatom freisetzt [Ryter und Tyrell, 2000]. Das so entstandene Biliverdin IX α wird schließlich mittels der Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin IX α (das vorherrschende Isomer bei Erwachsenen) reduziert. Bei dieser zweiten enzymkatalysierten Re-

aktion dient entweder NADH oder NADPH als Elektronendonator [Iyanagi et al., 1998; Roy-Chowdhury et al., 2006].

Die reduzierenden Cofaktoren werden mit Hilfe der Cytochrom P450 Reduktase bereitgestellt [Ryter und Tyrell, 2000].

Somit wird wasserunlösliches indirektes (unkonjugiertes) Bilirubin gebildet, ein Anion, welches nach Freisetzen aus Milz, Leber oder Knochenmark im Blutplasma reversibel an Albumin gebunden wird, was den Transport im Blut ermöglicht [Brodersen, 1979; Darimont und Kullak-Ublick, 2008], und ein Passieren der Blut-Hirnschranke verhindert [Roy-Chowdhury et al., 2006].

Die Aufnahme in Hepatozyten erfolgt, nachdem es im sinusoidalen Raum von seinem Träger abdiffundiert [Halliwell und Gutteridge, 2007], mittels spontaner Diffusion durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran, selten auch via eines Carriers [Zucker et al., 1999].

In den Hepatozyten selbst kann eine Bindung von Bilirubin an das Z-Protein und Ligandin (Glutathione-S-Transferase) erfolgen, welche Bilirubin im Cytoplasma zum Endoplasmatischen Retikulum transportieren. An diesem erfolgt in weiterer Folge eine Umwandlung des Bilirubins mit Hilfe der Uridin-Diphosphat-Glucuronyltransferasen (UGTs) zum wasserlöslichen direktem Bilirubinmono- oder diglukuronid mittels Konjugation mit Glucuronsäure, Glucose, Xylose [Brodersen, 1979] oder Wasserstoff [Ryter und Tyrell, 2000] (siehe Abbildung 1).

Bilirubin ist fast ausschließlich Substrat der UDP-Glucuronosyltransferase 1A1, weist aber daneben geringe Affinität zur Isoform UGT1A4 auf [Iyanagi et al., 1998].

Das Glucuronid wird in die Gallenkanäle sezerniert und kann abschließend mit Hilfe eines ATP-abhängigen Anionentransporters [Iyanagi et al., 1998] in die Galle ausgeschieden werden, wo es im Gastrointestinaltrakt von der Mikroflora zu Urobilinogen und Urobilin umgewandelt und schließlich zu etwa 85% mit dem Stuhl ausgeschieden wird. 15% werden im Darm wieder deglukuroniert, resorbiert und enterohepatisch rezirkuliert [Stocker und Ames, 1987; Zucker et al., 1999; Darimont und Kullak-Ublick, 2008].

2.1.2 Bioverfügbarkeit und Regulation der Bilirubinkonzentration

Die physiologische Plasmakonzentration an Bilirubin liegt durchschnittlich zwischen 5–17 $\mu\text{mol/L}$ [Brodersen, 1979].

Jedoch gibt es sowohl geschlechtsspezifische, als auch altersgebundene Unterschiede, insofern, als dass Männer höhere Serumbilirubinkonzentrationen aufweisen und gleichermaßen Personen etwa ab dem achtzehnten Lebensjahr. Ähnliche Ergebnisse konnten für weiße Bevölkerungsgruppen im Vergleich zu dunkelhäutigen gefunden werden. Das heißt, dass letztgenannte niedrigere Levels an Serumbilirubin zeigen [Madhavan et al., 1997].

Bei einem physiologischen pH-Wert von 7,35-7,45 ist unkonjugiertes Bilirubin, als auch der Vorgänger Biliverdin, nicht wasserlöslich, wie auch unlöslich in polaren Lösungsmitteln [Brodersen, 1979; Iyanagi et al., 1998; Zucker et al., 1999]. Diese Eigenschaft ist auf die intramolekularen Wasserstoffbrücken zurück zu führen, welche ferner die feste Bindung an sein Transportprotein Albumin bewirken [Brodersen, 1979; Iyanagi et al., 1998]. Zudem sind Bilirubin und Biliverdin äußerst stabile Moleküle [Bulmer et al., 2008a].

Die Konzentration von Bilirubin im Serum wird durch drei Enzyme beziehungsweise Enzymklassen, nämlich die Häm-Oxygenasen, die Biliverdin-Reduktase und die UDP-Glucuronyltransferase (UGT) 1A1 im Wesentlichen geregelt [Ryter und Tyrell, 2000].

2.1.3 Pathophysiologie des Bilirubinstoffwechsels

Erkrankungen des Bilirubinstoffwechsels und der Gallebildung können entweder durch Störungen der Bilirubinkonjugation, Störungen der Bilirubinausscheidung oder aufgrund hereditärer Erkrankungen des Gallensäurenstoffwechsels und -transports auftreten [Darimont und Kullak-Ublick, 2008].

Da es bei diesen Störungen zur Beeinträchtigung der an der Bilirubinverstoffwechslung beteiligten Transportproteine und Enzyme kommt, entsteht als dessen Leitsymptom eine Hyperbilirubinämie [Darimont und Kullak-Ublick, 2008].

Bei hereditären Erkrankungen wird zwischen jenen mit erhöhtem indirektem (unkonjugiertem) Bilirubin als Hauptsymptom, zu denen auch Morbus Gilbert-Meulengracht

gezählt wird, und konjugierten Hyperbilirubinämien, welche mit erhöhtem direktem Bilirubin einhergehen, unterschieden [Darimont und Kullak-Ublick, 2008].

2.1.3.1 Morbus Gilbert-Meulengracht

Morbus Gilbert-Meulengracht, oder kurz Gilbert's Syndrom, gehört, wie bereits zuvor erwähnt zu den unkonjugierten Hyperbilirubinämien. Diese Syndrome zeichnen sich durch eine Störung der Glukuronidierungsaktivität durch eine um bis zu 70% verminderte Funktion des Enzyms UDP-Glucuronyltransferase 1A1 aus [Darimont und Kullak-Ublick, 2008].

Beim Gilbert's Syndrom kommt es, aufgrund einer homozygoten Mutation der TATAA-Promotorregion der UGT1A1-Gens zu einer Vermehrung der Anzahl der TA-Repeats in der TATA-Box von 6 auf 7, sodass hier ein Heptamer mit der Sequenz $A(TA)_7TAA$ vorliegt. Infolge dessen tritt eine verminderte Expression dieses Enzyms mit entsprechender Verminderung der hepatischen Glukuronidierungsaktivität auf [Hunt et al., 2001; Darimont und Kullak-Ublick, 2008].

Dieses Gen mit der Mutation für die TATAA-Promotorregion wurde schließlich als Haplotyp UGT1A1*28 bezeichnet [Roy-Chowdhury et al., 2006; Schwertner und Vitek, 2008] und wird autosomal rezessiv vererbt [Iyanagi et al., 1998].

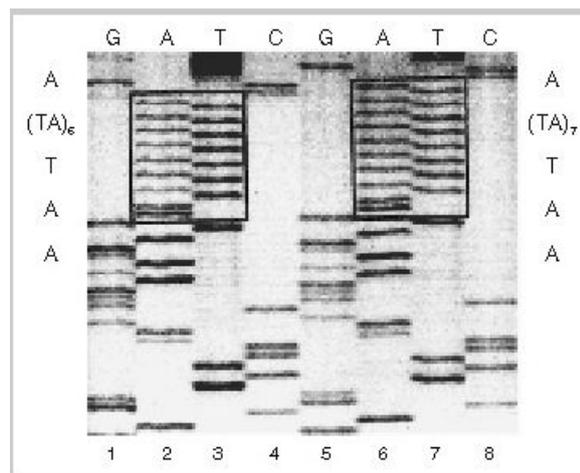


Abbildung (2) Länge der TATAA-Promotorregion des UGT1A1-Gens - ohne Mutation (links) und bei Gilbert's Syndrom (rechts) – modifiziert nach Bosma et al. [1995]

Zuätzlich zu dieser homozygoten Mutation gibt es eine zweite genetische Variation, nämlich eine heterozygot vererbbare Punktmutation, welche das Gilbert's Syndrom verursacht [Aono et al., 1995]. Diese wird autosomal dominant vererbt [Iyanagi et al., 1998].

Die Prävalenz von Morbus Gilbert-Meulengracht liegt Schätzungen zufolge zwischen 2 und 12% [Bosma et al., 1995] und tritt bei Männern häufiger auf, als bei Frauen. [Dumont und Kullak-Ublick, 2008; Libby, 2012].

Dieses doch relativ verbreitete Syndrom wurde erstmals 1901 von Gilbert und Lereboullet beschrieben und 1920 beziehungsweise 1939 von Meulengracht als eine Stoffwechselstörung, welche durch chronisch leicht erhöhte Konzentrationen an unkonjugiertem Bilirubin im Serum charakterisiert ist, beschrieben [Gilbert und Lereboullet, 1901; Meulengracht, 1939].

Morbus Gilbert-Meulengracht zeichnet sich demnach durch erhöhte Level an unkonjugiertem Bilirubin im Serum, bei gleichzeitig normalen Konzentrationen von konjugiertem Bilirubin aus. Weiters ist er durch Abwesenheit einer Lebererkrankung oder anderen Ursache, wie beispielsweise starke Hämolyse infolge großer Hämatome, charakterisiert [Owens und Sherlock, 1973].

Klinisch manifest wird diese Erkrankung meist im jungen Erwachsenenalter, da sich im Alter von etwa 18 Jahren die Bilirubinkonzentrationen stabilisieren und es bei Männern durch eine gesteigerte Testosteronausschüttung zu einer Verminderung der UGT-Aktivität und somit zu erhöhten Plasmabilirubinkonzentrationen kommt [Muraca und Fevery, 1984; Madhavan et al., 1997].

Weiters induzieren Vorgänge, wie körperlicher Stress, exzessiver Alkoholkonsum, febrile Infekte, bestimmte Medikamente und Fasten (das heißt eine Kalorienreduktion auf 400 kcal pro Tag für 72 Stunden [Lundh et al., 1972; Owens und Sherlock, 1973; Bensinger et al., 1973; Gollan et al., 1976]) die Hämoxxygenase, was wiederum zu einer milden nichthämolytischen Hyperbilirubinämie führen kann.

Im Fall des Fastens kann es zu einem zwei- bis dreifachen Anstieg der Plasmabilirubinkonzentration (unkonjugiert) im Vergleich zu Normwerten innerhalb von ein bis vier Stunden kommen, bei gleichzeitig unveränderten Werten von konjugiertem Bilirubin

[Lundh et al., 1972; Owens und Sherlock, 1973; Bensinger et al., 1973].

Personen mit Morbus Gilbert-Meulengracht weisen zumeist eine Konzentration an Gesamtbilirubin im Blut von mehr als 20,50 $\mu\text{mol/L}$ (bis zu 60 $\mu\text{mol/L}$ [Iyanagi et al., 1998]) mit überwiegendem Anteil an unkonjugiertem Bilirubin ($\geq 17,10 \mu\text{mol/L}$) auf.

2.1.3.2 Weitere Hyperbilirubinämien

Neben Morbus Gilbert-Meulengracht findet man eine Reihe anderer angeborener, desgleichen erworbener Hyperbilirubinämien, wie der prähepatische oder der intrahepatische Ikterus, oder der zuvor angesprochene Neugeborenenikterus, als auch das sogenannte Crigler-Najjar-Syndrom, das Rotor-Syndrom oder die eher selten auftretende Erkrankung Dubin-Johnson. Aus Mangel an Relevanz für die vorliegende Arbeit wird im Folgenden nicht näher auf diese anderen Störungen des Bilirubin-Metabolismus eingegangen.

2.2 Oxidativer Stress

2.2.1 Was ist oxidativer Stress

Nach Helmut Sies, welcher diesen Begriff im deutschsprachigem Raum eingeführt hat, resultiert „Oxidativer Stress“ aus einem Ungleichgewicht zwischen prooxidativen Vorgängen und antioxidativen Abwehrmechanismen im Organismus, sodass erstere überwiegen [Stocker und Keaney jr., 2004].

Unter pathologischen Bedingungen kann es entweder zu einer Überproduktion von reaktiven Verbindungen kommen, wodurch oxidative Stressreaktionen stattfinden können [Rizzo et al., 2010]. Oder es sind zu wenig Antioxidantien vorhanden, beziehungsweise die Anzahl ihrer bereits verbrauchten, sprich oxidierten Formen überwiegt, sodass oxidative Schäden ermöglicht werden [Stocker und Keaney jr., 2004].

Solche Vorgänge liegen einer Vielzahl von Erkrankungen zu Grunde.

Freie Radikale können oxidative Stressreaktionen induzieren. Sie sind Atome oder Moleküle, die mindestens ein ungepaartes Elektron aufweisen und somit sehr reaktionsfreu-

dig sind – sie sind bestrebt, einem anderen Molekül oder Atom Elektronen zu entreißen. [Stephens et al., 2009].

Sie werden in Zellen aller Organismen als Nebenprodukte des Metabolismus gebildet. Da Sauerstoff ubiquitär in biologischen Systemen vorkommt, stellt er die größte Quelle für Radikale dar. So entstehen aus Sauerstoff die sogenannten Reactive Oxygen Species, Radikale beziehungsweise reaktionsfreudige Moleküle, in denen das ungepaarte Elektron am Sauerstoffatom gebunden ist [Stephens et al., 2009]. Hauptentstehungsort sind die Mitochondrien, wo 1 bis 2% des dort umgesetzten Sauerstoffs nicht vollständig zu Wasser, sondern zu Superoxidanionen reduziert werden [Stocker und Keaney jr., 2004]. Daneben gibt es Radikale, die sich von Stickstoff-hältigen, von Chlor-hältigen, von Brom-hältigen oder von Schwefelverbindungen ableiten (siehe Tabelle 2.2.1) [Rizzo et al., 2010]. Außerdem zeigen nicht nur Moleküle mit ungepaarten Elektronen eine hohe Reaktivität. Diese Eigenschaft können bestimmte nicht-radikalische Substanzen gleichfalls aufweisen [Halliwell und Gutteridge, 2007].

Biologisch relevante Radikale sowie nicht-radikalische Verbindungen sind das Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$), das Hydroxylanion (OH^{\bullet}), Stickstoffmonoxid (NO^{\bullet}), sowie das Carbonatradikal ($CO_3^{\bullet-}$), Peroxynitrit ($ONOO^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Singulett-Sauerstoff (O_2^1) als auch Ozon (O_3) [Halliwell und Gutteridge, 2007; Stephens et al., 2009].

Die folgende Tabelle 2.2.1 gibt eine Übersicht der Nomenklatur an reaktiven Substanzen und einen Auszug deren wichtigster Vertreter.

Vertreter	
Art der Verbindung	freie Radikale
Reactive oxygen species (ROS)	Superoxid $O_2^{\bullet-}$, Hydroxyl OH^\bullet , Hydroperoxyl HO_2^\bullet Carbonat $CO_3^{\bullet-}$, Peroxyl RO_2^\bullet , Alkoxyl RO^\bullet Kohlendioxid $CO_2^{\bullet-}$, Singuletsauerstoff $O_2^1\Sigma g^+$
Reactive nitrogen species (RNS)	Stickstoffmonoxid NO^\bullet , Stickstoffdioxid NO_2^\bullet , Nitrat NO_3^\bullet
Reactive chlorine species (RCS)	Atomares Chlor Cl^\bullet
Reactive bromine species (RBS)	Atomares Brom Br^\bullet
Reactive sulphur-derived species (RSS)	Thiyl RS^\bullet , Perthiyl RSS^\bullet
Carbon-centered radicals	C^\bullet (Radikale, deren ungepaartes Elektron am Kohlenstoffatom gebunden ist. Sie sind instabil und reagieren schnell mit O_2 zu Peroxylradikalen.)
Übergangsmetalle	Fe-Ionen, Cu-Ionen etc.

Tabelle (2.2.1) Nomenklatur reaktiver Verbindungen und Vertreter der einzelnen Klassen – modifiziert nach Stocker und Keane jr. [2004] und Halliwell und Gutteridge [2007]

Die Bildung freier Radikale dient im Organismus jedoch der Immunabwehr. Denn Leukozyten sowie Makrophagen, Monozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten produzieren im Zuge der zellulären Immunantwort in einem, als „respiratory burst“ bezeichneten Prozess freie Radikale, die dank ihrer bakteriziden Effekte Bakterien und andere Fremdstoffe inaktivieren [Halliwell und Gutteridge, 1984].

Zudem üben radikalische Verbindungen anhand der Vermittlung der Apoptose erheblichen Einfluss auf die körpereigene Tumorsuppression aus.

2.2.1.1 Auf welche Weise können Radikale reagieren?

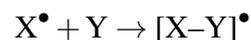
Im Falle dass zwei Radikale aufeinander treffen, wird über die beiden ungepaarten Elektronen eine kovalente Bindung eingegangen und es entsteht, im einfachsten Fall, ein zweiatomiges Produkt. Beispiel:



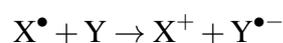
In Bezug auf biologische Systeme ist es meist so, dass anhand der prooxidativen Vorgänge im Körper Makromoleküle, wie Nukleinsäuren, Proteine, Kohlenhydrate und vor allem ungesättigte Fettsäuren angegriffen und in ihrer Struktur verändert werden, was in weiterer Folge zum Verlust ihrer ursprünglichen Funktionen führt. Dergleichen können auch Antioxidantien und Cofaktoren diverser Enzyme Ziel eines radikalischen Angriffs sein. [Stocker und Keaney jr., 2004; Halliwell und Gutteridge, 2007].

Dies kann grundsätzlich auf vier unterschiedliche Arten auftreten:

1. Das freie Radikal reagiert mit einem Molekül, sodass das Produkt weiterhin das ungepaarte Elektron trägt:

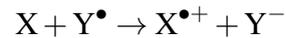


2. Ein Radikal gibt im Verlauf einer Reduktionsreaktion sein freies Elektron an seinen Reaktionspartner ab:

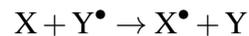


3. Ein Radikal reagiert mit einem Molekül so, dass es dieses oxidiert. Das heißt es nimmt ein Elektron von seinem Reaktionspartner auf, wodurch dieser ein ungepaartes

Elektron erhält:



4. Radikale können aber auch von ihrem jeweiligen Reaktionspartner ein Wasserstoffatom mit einem freien Elektron, meist aus C–H-Bindungen, abspalten. Daraus ergibt sich ein Reaktionsprodukt mit ebenfalls einem ungepaartem Elektron:



2.2.2 Biologische Bedeutung von oxidativem Stress

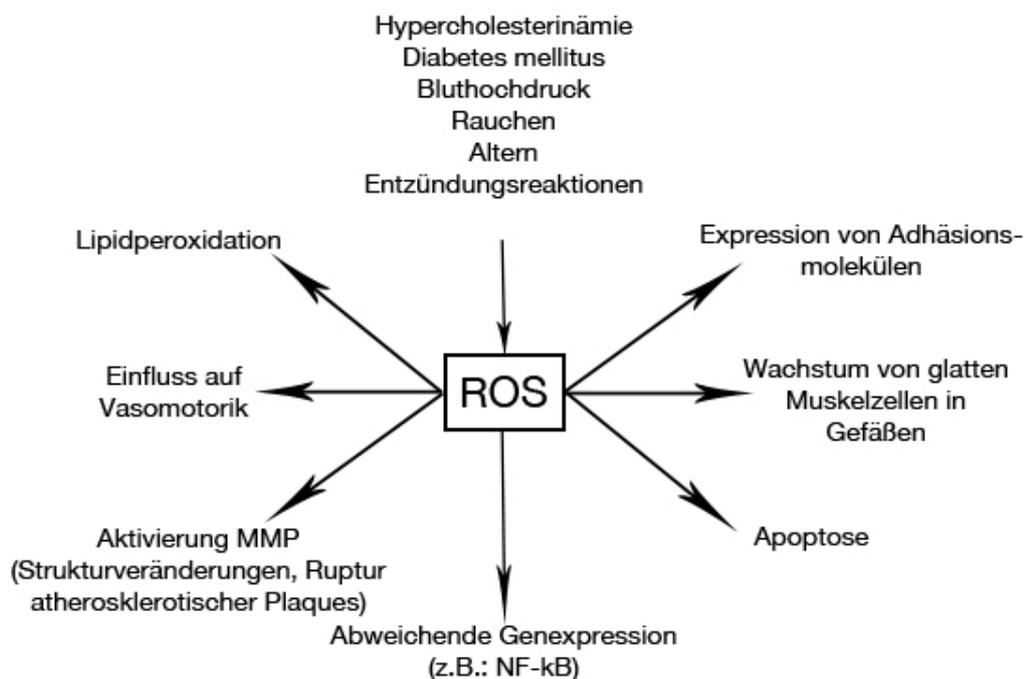


Abbildung (3) Ursachen und Folgen von oxidativem Stress – modifiziert nach Stephens et al. [2009]

Der Organismus ist reaktiven Agenzien ausgesetzt, die unterschiedlicher Herkunft sind, zum Beispiel aus Stoffwechselprozessen bei Diabetes mellitus oder Bluthochdruck, durch Entzündungsreaktionen oder auch durch Tabakrauch (siehe Abbildung 3).

Es können zunächst Epoxide, Aldehyde und Peroxide entstehen, welche unter Einfluss

bestimmter Faktoren, etwa freien Metallionen wie Kupfer- oder Eisenionen zu Radikalen beziehungsweise reaktiven Verbindungen (meist ROS) weiterreagieren. Die Auswirkungen von reaktiven Verbindungen auf den menschlichen Organismus sind sehr divergent (siehe Abbildung 3).

Es entstehen oxidative Schäden an der DNA, wie Strangbrüche und Modifikationen an Basen und Nucleotiden, woraus in weiterer Folge die Aktivierung des Cytochrom p53-Systems und Hemmung des Zellwachstums [Rizzo et al., 2010] oder eine abweichende Genexpression [Stephens et al., 2009] resultiert.

Infolge der Oxidation von Aminosäureresten entstehen Proteinaggregate und Proteinfragmente, was zum Funktionsverlust und der Deaktivierung von Enzymen sowie zur Störung von Signaltransduktionswegen führt. Diese Veränderungen können die Expression von Adhäsionsmolekülen, das Wachstum von glatten Gefäßmuskelzellen oder die Aktivierung von Matrix Metalloproteinasen (MMP) induzieren (siehe Abbildung 3).

Weiters kann durch Bindung an Sulfhydrylgruppen einiger Enzyme deren Funktion beeinträchtigt werden und es können die Strukturen des Zytoskelettes geschädigt werden.

Durch Oxidationsreaktionen von Kohlenhydraten mit Proteinen entstehen sogenannte „Advanced Glycation End-products“, reaktionsfreudige Zuckermoleküle, die eine Reihe pathologischer Effekte ausüben können. Dazu zählen die Steigerung der Gefäßpermeabilität, die Oxidation von Low Density Lipoproteinpartikeln und die Eigenschaft, oxidative Stressreaktionen zu begünstigen [Kalousová et al., 2005].

Die Oxidation durch freie Radikale verursacht zudem nicht nur den Abbau von Fettsäuren und deren Ester in Lebensmitteln, sondern auch in biologischen Membranen und Lipoproteinen (siehe Abbildung 3) und spielt somit eine entscheidende Rolle in einer Vielzahl von pathologischen Ereignissen. Dabei wird vorwiegend an den Doppelbindungen der Fettsäuren ein Elektron abgebunden, woraufhin an diesen Stellen molekularer Sauerstoff addiert wird. Es entstehen Peroxylradikale, welche wiederum einer benachbarten ungesättigten Fettsäure ein Elektron entziehen können. Dieser Vorgang setzt sich in einer Kettenreaktion fort, wodurch eine immer größer werdende Anzahl an Radikalen entsteht [Rizzo et al., 2010].

Nicht-radikalische Zwischenprodukte der Lipidperoxidation, die Lipidhydroperoxide, wirken cytotoxisch und auch sie können weiter zu Radikalen abgebaut werden und auf diese Weise eine Radikalkettenreaktion propagieren.

Aufgrund dieser Effekte wird insbesondere die Oxidation von LDL-Partikeln mit der Entstehung einer Reihe von Erkrankungen assoziiert, wie etwa Arthritis, Demenz und andere neurologischen Störungen. Bei der Entstehung von Krebserkrankungen [Halliwell und Gutteridge, 1984] und der Alterung des Menschen spielt oxidativer Stress gleichfalls eine erhebliche Rolle (siehe Abbildung 3) [Stephens et al., 2009; Rizzo et al., 2010].

Eine Imbalance zwischen pro- und antioxydativen Vorgängen entsteht zudem auch bei Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Bluthochdruck, sowie der Dysfunktion der Nieren. Es kommt unter diesen Bedingungen ebenso zu einer erhöhten Plasmakonzentration an oxidierten LDL-Partikeln, was mit der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht wird [Stephens et al., 2009].

Zusätzlich verursachen oxidierte Lipoproteine Schäden an Endothelzellen, wirken chemotaktisch auf Leukozyten und werden schließlich von Makrophagen im Zuge der zellulären Immunantwort endozytiert. Diese Prozesse bedingen jedoch weiters die Bildung sogenannter Schaumzellen, die Proliferation glatter Muskelzellen und die Erhöhung der Permeabilität von Gefäßen, Reaktionen, welche maßgeblich an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind [Stocker und Keaney jr., 2004; Rizzo et al., 2010].

Zudem können verschiedene Spezies reaktiver Verbindungen miteinander wechselwirken. So können reaktive Stickstoff-Spezies mit reaktiven Schwefelverbindungen derart interagieren, dass es zu einer intrazellulären Zunahme von S-Nitroso-Verbindungen und einer Abnahme an Thiolen kommt. Solche Reaktionen sind gleichfalls an vaskulären Veränderungen beteiligt [Stocker und Keaney jr., 2004].

2.2.3 Biologische Bedeutung von Antioxidantien

Aufgrund dieser verschiedenen Wirkungsweisen und Wirkorte von oxidativem Stress (siehe Kapitel 2.2.1) ist der menschliche Körper mit einer Reihe von Abwehrmechanismen ausgestattet und hat zudem ein äußerst komplexes Schutzsystem entwickelt, in dem verschiedenste antioxydativ wirksame Verbindungen zusammenarbeiten.

So haben die Autoren Halliwell und Gutteridge im Jahr 1984 den Begriff „Antioxidantien“ folgendermaßen definiert: „Jede Substanz, die in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen signifikant die Oxidation eines beliebigen Substrates verhindert oder einschränkt“ [Halliwell und Gutteridge, 2007].

Es interagieren also sehr unterschiedliche Verbindungen, wie Vitamine (A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C und E), Enzyme, wie die mitochondriale Superoxiddismutase, die Glutathion-Peroxidase (Mitochondrien), die Glutathion-S-Transferase (Zytoplasma) oder die Katalase (Peroxisomen), Spurenelemente (Kupfer, Zink, Selen), mitochondriale Proteine und zusätzlich exogen, mit der Nahrung aufgenommene Verbindungen, etwa Flavonoide, Tocopherole oder Carotinoide miteinander [Stephens et al., 2009].

Um adäquat auf oxidativen Stress reagieren zu können (siehe Abbildung 4), treten Antioxidantien in unterschiedlichen Formen in Erscheinung. So können sie divergente Eigenschaften aufweisen, je nachdem, ob sie endogenen oder exogenen Ursprungs beziehungsweise ob sie hydrophilen oder hydrophoben Charakters sind. Hierbei sollen die hydrophilen Vertreter das Cytoplasma jeder Zelle, sowie das Blutplasma vor Oxidation schützen, wohingegen hydrophobe Antioxidantien vorwiegend die Lipidperoxidation in den Zellmembranen inhibieren [Sies, 1997].

Prinzipiell wirken Antioxidantien anhand vier unterschiedlicher Mechanismen [Rizzo et al., 2010]:

1. Bindung von Metallionen in Form von Komplexen
2. „Scavengen“ oder „Quenchen“ freier Radikale sowie anderer reaktiver Verbindungen
3. Unterbrechung von Radikalkettenreaktionen
4. Reperatur von beschädigten Strukturen an Molekülen

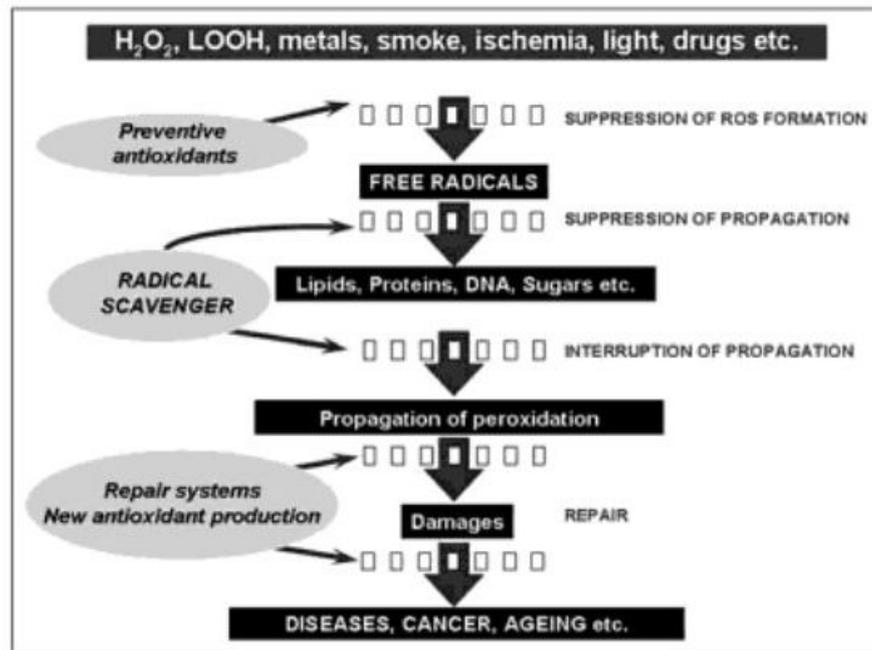


Abbildung (4) zeigt in welche Reaktionen Antioxidantien eingreifen können und auf welche Weise sie reagieren – modifiziert nach Rizzo et al. [2010]

2.3 Das antioxidative Potezial von Bilirubin, Biliverdin und ihrer Enzyme

Spätestens seit diverser Arbeiten der Autoren Stocker, Ames oder Neuzil wurden sowohl von Bilirubin, als auch von seiner wasserlöslichen Vorstufe dem Biliverdin, wie auch von den, an der Regulation des Bilirubin-Metabolismus beteiligten Enzyme protektive Wirkungen auf den menschlichen Organismus proklamiert, womit ihnen eine antioxidative Kapazität zugesprochen wurde.

2.3.1 Wirkungsmechanismen von Bilirubin

Bilirubin kann im menschlichen Organismus in drei unterschiedlichen, chemischen Formen, nämlich, frei im Blutplasma zirkulierend, an sein Transportprotein Albumin gebunden oder an ein hydrophiles Molekül konjugiert auftreten, welche verschiedene antioxidative Wirkungen ausüben [Stocker, 2004].

Der Vollständigkeit halber wird in diesem Kapitel auf die Wirkungen aller drei Formen eingegangen, wobei erwähnt werden sollte, dass im Besonderen die Effekte des unkonjugierten Bilirubins thematisch behandelt werden.

Folgende Tabelle soll eine Übersicht über die bedeutensten Eigenschaften der Gallenfarbstoffe bieten (siehe Tabelle 2.3.1):

Wirkungsweise/Wirkort	Gallenfarbstoff	Effekt	Schutz vor
anitmutagen	Bilirubin und Biliverdin	Nachweis durch AMES-Test	kardiovaskulären Erkrankungen und Krebs
antiapoptotisch	Bilirubin	reduziert/inhibiert Apoptose von Nervenzellen inhibiert oxidativen Stress	Zytokin-mediierte Entzündung Endothelschädigungen in Zerebralgefäßen
neuroprotektiv	Biliverdin Bilirubin und Biliverdin	vermindert das Ausmaß des Infarktes inhibieren Superoxidradikale	Reperfusionsschäden oxidativen Stress in Neuronalgefäßen
Herz-Kreislauf-System	Bilirubin	Resistenz gegenüber Vasokonstriktion bei der Gunn-Ratte inhibiert NADPH-Oxidase und reduziert die Bildung von Superoxidradikalen reduzieren Hyperplasie von Zellen der Intima	Angiotensin-II-induziertem Bluthochdruck Fehlfunktion der Endothelzellen in Gefäßen Hyperproliferation der glatten Muskel- zellen in Gefäßen
Lunge	Bilirubin und Biliverdin	hemmen in Modellversuchen Lungenschäden	Zellschädigungen der Lunge
antiinflammatorisch	Bilirubin	blockiert Lymphozyten in den Atemwegen bei Mäusen verringert NO- und TNF- α -Levels in Leberzellen verringert iNOS-Expression in Macrophagen	Entzündungen der Atemwege endotoxischen Wirkungen auf Leber
antithrombotisch	Bilirubin	hemmt Bildung von microvasculären Thromben	endotoxischen Wirkungen auf Leber Thromben, Embolien
Organtransplantationen	Bilirubin und Biliverdin	schützen Transplante vor oxidativen Schädigungen	Reperfusionsschäden und Abstoßungsreaktionen

Tabelle (2.3.1) Cytoprotektive Eigenschaften von Bilirubin und Biliverdin (verwendete Abkürzungen: iNOS inducible nitric oxide synthase, NO Stickstoffmonoxid, TNF- α tumor necrosis factor- α) – modifiziert nach Kapitulnik und Maines [2009]

2.3.1.1 Konjugiertes Bilirubin

Konjugiertes Bilirubin wirkt durch Unterbrechung von Radikalkettenreaktionen, weniger mittels direktem „Scavenging“ von Radikalen antioxidativ [Neužil und Stocker, 1993].

Des Weiteren vermag Bilirubin, anhand seines Systems an konjugierten Doppelbindungen und dem reaktiven, leicht abzugebenden Wasserstoffatom ungesättigte, langkettige Fettsäuren, sowie Vitamin A vor oxidativer Schädigung im Gastrointestinaltrakt zu schützen [Vítek und Schwertner, 2007].

Dadurch können die Zerstörung der Intestinalschleimhaut verhindert und eventuell mit der Nahrung aufgenommene Kanzerogene neutralisiert werden.

Die Lipidperoxidation betreffend, wirkt Bilirubin synergistisch mit α -Tocopherol antioxidativ, sodass oxidiertes Vitamin E schneller regeneriert werden kann [Stocker, 2004].

Aber auch die metabolische Vorstufe von Bilirubin, Biliverdin kann in mikromolaren Konzentrationsbereichen die Bildung von beispielsweise Linolsäure-Hydroperoxiden unterbinden [Stocker et al., 1987b].

Somit kann Bilirubin als endogen synthetisiertes Antioxidans sowohl Lipide, als auch Plasmaproteine vor oxidativen Schädigungen schützen [Stocker et al., 1987b; Neužil und Stocker, 1993].

Zusätzlich konnte von Arriaga et al. gezeigt werden, dass sowohl unkonjugiertes Bilirubin sowie Bilirubin-Monoglucuronid und Biliverdin antikomplementäre Effekte zeigen [Arriaga et al., 1999].

2.3.1.2 Albumin-gebundenes Bilirubin

Bilirubin, an Albumin gebunden, kann die von Peroxylradikalen induzierte Oxidation von Albumin-gebundenen Fettsäuren, als auch von Albumin selbst inhibieren und die Bildung von Protein-Carbonylverbindungen unterbinden [Stocker und Ames, 1987; Stocker et al., 1987a].

Dieser Effekt kann zudem durch Synergismus mit membrangebundenen α -Tocopherol verstärkt werden [Neužil und Stocker, 1993], nach beinahe vollständiger Oxidation der im Blutplasma enthaltenen Ascorbinsäure [Hunt et al., 2001].

So konnte weiters gezeigt werden, dass Albumin-gebundenes Bilirubin anhand dieser Mechanismen besonders Herzmuskelzellen vor ROS schützen kann [Wu et al., 1991b; Neužil und Stocker, 1993]. Ferner wurde anhand experimenteller Studien festgestellt, dass Biliverdin und Albumin-gebundenes Bilirubin Hepatozyten von Ratten sowie humane Erythrozyten vor oxidativer Schädigung bewahren [Wu et al., 1991a].

Zudem zeigt Bilirubin speziell gegenüber photooxidativen Schädigungen von Aminosäuren des Albumins protektive Effekte indem es das Abspalten von Resten verhindert und dadurch auch ihren oxidativen Abbau [Neužil und Stocker, 1993].

2.3.1.3 Unkonjugiertes Bilirubin

Demnach ist unkonjugiertes Bilirubin ein äußerst effektiver Radikalfänger, besonders von Singulett-Sauerstoff und kann durch Reaktion mit Superoxidradikalanionen und Peroxylradikalen in Liposomen und Zellembanen die Oxidation von Fettsäuren und daraus resultierende Radikalkettenreaktionen unterbrechen [Stocker und Ames, 1987; Stocker et al., 1987b].

Dies geschieht zum Einen durch Abgabe eines Wasserstoffatoms aus dem Tetrapyrrolring, wodurch es selbst zu einem Radikal oxidiert wird [Stocker et al., 1987a]. Dieses entstandene Kohlenstoffradikal ist jedoch durch Resonanz-Stabilisierung eher reaktionsträge und führt so eine Radikalkettenreaktion nicht fort – sie wird abgebrochen [Stocker et al., 1987b].

Zum Anderen wirkt Bilirubin über direkte Addition an das Radikalion reaktions-inhibierend, wodurch ein nicht-radikalischer Komplex gebildet wird [Stocker et al., 1987a,b] und ist dadurch in lipophilen Umgebungen mindestens ein ebenso effektives Antioxidans wie α -Tocopherol [Stocker und Ames, 1987]. Wu et al. konnten schließlich demonstrieren, dass unkonjugiertes Bilirubin ein 20fach stärkeres Oxidationsmittel als Trolox, ein Vitamin E-Analog, ist [Wu et al., 1994]. Dieses Ergebnis konnte in anderen Arbeiten bestätigt und zudem auch Biliverdin zugesprochen werden [Vítek und Schwertner, 2007].

Darüber hinaus kann unkonjugiertes Bilirubin speziell zu Beginn die Oxidation von LDL-Partikeln und die Bildung von Hydroperoxiden unterbinden. So entsteht eine geringere

Konzentration an α -Tocopherylradikalen [Neužil und Stocker, 1994].

Überdies fungiert unkonjugiertes Bilirubin als Substrat für Peroxidasen bei Anwesenheit von Hydrogenperoxiden oder organischen Hydroperoxiden, was wiederum einer Kettenfortpflanzung entgegen wirkt [Stocker und Ames, 1987].

Bilirubin, dessen Bildung von der Häm-Oxygenase-1 katalysiert wird, ist ein äußerst effizienter „Scavenger“ von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen [Jansen et al., 2010]. Bilirubin kann dadurch Dysfunktionen, etwa eine unzureichende Wiederherstellung der Durchblutung beispielsweise von Herzkranzgefäßen nach vorangegangenen ischämischen Ereignissen abschwächen [Clark et al., 2000b] und glatte Muskelzellen vor oxidativen Schädigungen schützen [Clark et al., 2000a].

Zusätzlich übt Bilirubin bereits in physiologischen Konzentrationsbereichen cytoprotektive Effekte aus. Dies geschieht zum Einen über Verminderung der Expression von Entzündungsmediatoren (TNF- α und Stickstoffmonoxid), was zu einer Abschwächung lokaler Gewebeschäden führt, und zum Anderen bewirkt Bilirubin eine Steigerung der Eicosanoidsynthese bei Anwesenheit von Lipopolysacchariden [Wang et al., 2004].

Bei diesen Reaktionen, vor allem mit Peroxyl-Radikalen, wird entweder ein Teil des Bilirubins selbst oxidiert und es entsteht Biliverdin [Stocker et al., 1987a], welches über die Biliverdin-Reduktase recycelt werden kann (siehe unter Punkt 2.3.2.2 und 2.3.2.3) [Baranãno et al., 2002; Liu et al., 2006] oder es wird der Tetrapyrrolring gespalten, wodurch farblose Abbauprodukte gebildet werden [Neužil und Stocker, 1993].

Des Weiteren konnte Bilirubin sowohl in „In-vitro-“ [Willis et al., 1996; Zelenka et al., 2012] als auch in „In-vivo“-Studien [Nakagami et al., 1993] antiinflammatorische Wirkung nachgewiesen werden. Durch vermehrte Expression der Häm-Oxygenasen konnte in betroffenen Geweben die Bilirubin-Konzentration erhöht und dadurch das Risiko für bleibende Gewebeschäden, durch schnelleres Abklingen der Entzündung, minimiert werden [Mayer, 2000; Bosma et al., 2003].

Diese Wirkung wird weiters durch Unterbinden von Signaltransduktionswegen zwischen

VCA-Molekülen [Keshavan et al., 2005], welche wiederum mit der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen, etwa Arthritis, Atherosklerose und möglicherweise Krebs, in Verbindung gebracht wird [Vítek und Schwertner, 2007], verstärkt.

Zusätzlich wurde ein negativer Zusammenhang zwischen Markern chronischer Entzündungsreaktionen, welche desgleichen an der Atherogenese beteiligt sind, und Serumbilirubin gefunden [Erdögan et al., 2006; Vítek und Schwertner, 2007], was fernerhin die proklamierte, antioxidative und entzündungshemmende Wirkung insbesondere von unkonjugiertem Bilirubin bezüglich der Atherogenese stützt.

In weiteren Experimentalstudien, allen voran der Autoren Milner und Větvička, konnten immunmodulierende Eigenschaften des Bilirubin nachgewiesen werden [Vítek und Schwertner, 2007].

Bulmer et al. 2007 konnten in weiterer Folge im Ames Salmonella Test zeigen, dass Gallenfarbstoffe, darunter Bilirubin, genotoxische Effekte verschiedener Mutagene in vitro spezifisch unterbinden.

Demnach übt Bilirubin zusätzlich antimutagene Wirkungen aus, und wirkt darüber hinaus antiviral sowie antiapoptotisch [Bulmer et al., 2008c].

Untersuchungen in Hinblick auf eine erhöhte Konzentration an Bilirubin im Blutplasma zeigten in Versuchen an Gunn-Ratten verminderte oxidative Schädigungen, eine geringere Konzentration an Lipidperoxiden, konjugierten Dienen und Protein-Carbonylverbindungen [Dennery et al., 1995] sowie Reduktion von vaskulären prooxidativen Vorgängen [Öllinger et al., 2005; Pflueger et al., 2005].

In einer aktuellen Experimentalstudie von Mancuso et al. 2012 konnte sowohl von Bilirubin, als auch von Biliverdin die Schutzwirkung gegenüber Peroxylradikal- und Peroxinitrit-induzierter Lipidperoxidation sowie oxidativen Schäden an Proteinen in Gehirnmikrosomen von Wistarratten bestätigt werden. In dieser Studie war ihre Wirkung zudem ausgeprägter, als jene von α -Tocopherol [Mancuso et al., 2012].

In Humanstudien konnte gleichermaßen ein direkter Zusammenhang zwischen Bilirubinlevels im Serum und der antioxidativen Kapazität festgestellt werden [Frei et al., 1988;

Bèlanger et al., 1997].

Dieser Zusammenhang konnte schließlich auch bei Personen mit Gilbert's Syndrom bestätigt werden [Vítek et al., 2002; Hagymási et al., 2003](siehe Kapitel 2.4.1).

In einer erst kürzlich publizierten Studie von Boon et al. 2012 konnten zudem bei Personen mit Gilbert's Syndrom signifikant erhöhte Konzentrationen an reduzierten Thiolverbindungen und Glutathion (GSH) gefunden werden. Zudem war der Status hinsichtlich oxidativen Stresses in der Gilbert's Syndrom-Gruppe signifikant besser und stand in einem positiven Zusammenhang mit den Bilirubinwerten, wohingegen die Konzentration an Carbonylverbindungen in umgekehrter Beziehung zu den Bilirubinlevels stehen. Die Konzentration an oxidierten LDL-Partikeln war in der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Diese Ergebnisse stützen die These, dass Bilirubin anhand dieser Mechanismen gegen die Entstehung von Atherosklerose präventiv wirkt [Boon et al., 2012].

2.3.2 Wirkungsmechanismen anderer Gallenpigmente und Enzyme

Wie bereits in Kapitel 2.3.1 erwähnt ist nicht nur Bilirubin als einziges Gallenpigment dazu in der Lage präventive, antioxidative Effekte im Organismus auszuüben. Zu diesen Prozessen und Reaktionen sind sowohl seine metabolische Vorstufe, das Biliverdin (siehe Tabelle 2.3.1), als auch die, an der Regulation des Bilirubinstoffwechsels beteiligten Enzyme sowie metabolische Zwischen- beziehungsweise Nebenprodukte befähigt [Kapitulnik und Maines, 2009].

2.3.2.1 Die Häm-Oxygenasen

So ist die Häm-Oxygenase 1, eine der beiden Isoformen, welche in Säugetierorganismen zu finden ist (siehe Kapitel 2.1.1), neben freien Häm-Molekülen [Jansen et al., 2010] durch verschiedene andere Faktoren induzierbar. Dazu gehören etwa oxidiertes Hämoglobin oder Stickstoffmonoxid, sowie cytotoxische Stimuli, wie Hydrogenperoxid und andere Sauerstoffradikale, Schwermetallionen sowie UV-Strahlen [Clark et al., 2000a; Vítek et al., 2002]. Entsprechend ist unter pathologischen Bedingungen oxidativer Stress als Hauptursache für die Aktivierung des Enzyms anzusehen [Cao et al., 2009]. So führen besonders oxidierte LDL-Partikel und atherosklerotische Läsionen zu einer gesteigerten

ten Expressionsrate der Häm-Oxygenase und folglich des Bilirubins [Clark et al., 2000a; Abraham und Kappas, 2005].

Zudem reguliert die Häm-Oxygenase 1 vermutlich über die Induktion der Biliverdinreduktase die Bildung von Bilirubin [Vítek und Schwertner, 2007], vor allem in Geweben in denen vermehrt reaktive Verbindungen produziert werden [Baranãno et al., 2002].

Darüber hinaus zieht ein Freisetzen von Eisenionen, welche beim Abbau von Hämolekülen entstehen (siehe Kapitel 2.1.1) eine Steigerung der Ferritinkonzentration nach sich. Dies führt wiederum zu einer gesteigerten Komplexbildung mit freien Eisenionen und folglich zu mehr Stabilität gegenüber oxidativen Stress [Ryter und Tyrell, 2000].

Während die Häm-Oxygenase 1 ubiquitär im Körper, dabei am häufigsten in der Milz vorhanden ist [Sedlak et al., 2009], kommt die Häm-Oxygenase 2 indessen vorwiegend im Gehirn und den Testes vor und wird kontinuierlich exprimiert. Diese konstitutive Form des Enzyms kann mittels gesteigerter Bilirubinproduktion vor Hydrogenperoxid-induzierter Neurotoxizität schützen. Darüber hinaus vermag Bilirubin bereits in Konzentrationsbereichen von einigen Nanomolar gegen 10.000fach höher konzentrierte Levels an H_2O_2 zu schützen [Doré et al., 1999].

Des Weiteren wurden potentiell antiproliferative Effekte der Hämoxigenase 1 auf die glatten Gefäßmuskelzellen, auf Zellen des Nierenepithels und auf Hepatozyten nachgewiesen [Vítek und Schwertner, 2007].

2.3.2.2 Die Biliverdin-Reduktase

Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung des Biliverdins in Bilirubin im Verlauf des Hämatabolismus (siehe Kapitel 2.1.1). Hinzu kommt die wesentliche Funktion als Transkriptionsfaktor auf DNA-Ebene, wodurch beispielsweise auch die Genexpression der Häm-Oxygenase 1 geregelt wird. Zusätzlich ist die Biliverdin-Reduktase dazu befähigt, als Signalmolekül zu agieren und cytoprotektive Effekte auszuüben [Kapitulnik und Maines, 2009]. Des Weiteren gewährleistet die Biliverdin-Reduktase durch Regeneration des, durch Oxidation im Zuge von Abwehrreaktionen gebildeten Biliverdins in einem Bilirubin/Biliverdin Redox-Zyklus die antioxidative Kapazität von Bilirubin (siehe Punkt 2.3.2.3) [Baranãno et al., 2002].

Die Biliverdin-Reduktase fungiert zudem als, durch oxidative Stressreaktionen induzierbarer, Transkriptionsfaktor. Es werden Gene für die Transkription der Häm-Oxygenase 1 sowie die Bildung von Faktoren für die Signaltransduktion, beispielsweise TGF- β und NF- κ B aktiviert [Vítek und Schwertner, 2007].

So wurden diesem Enzym darüber hinaus therapeutische Wirkungen zugesprochen, da in Zellen mit BVR-Mangel die Konzentration an reaktiven (Sauerstoff-)Verbindungen rasant ansteigt [Liu et al., 2006]. Folglich wirkt die Biliverdin-Reduktase in unterschiedlichen biologischen Systemen, nämlich der Mukosa des Gastrointestinaltraktes, den Nieren, dem zentralen und peripheren Nervensystem protektiv [Vítek und Schwertner, 2007].

2.3.2.3 Biliverdin

Biliverdin weist zum Teil dem Bilirubin ähnliche, zellschützende Eigenschaften auf. Das heißt, es kann sowohl kardioprotektiv [Öllinger et al., 2005] als auch antimutagen [Bulmer et al., 2008c] wirken, oxidativen Stress inhibieren und Schädigungen von Gefäßen [Öllinger et al., 2005] sowie der Lunge reduzieren. Gemeinsam mit Bilirubin wirkt Biliverdin Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen entgegen [Öllinger et al., 2007]. Weiters kann Bilirubin vermutlich über Biliverdin regeneriert werden, um so, bei Bedarf die antioxidative Kapazität des Bilirubins steigern zu können [Baranãno et al., 2002; Liu et al., 2006].

Jedoch wird diese Thematik in der vorliegenden Arbeit nicht weiter behandelt und es wurde davon abgesehen die im Zuge des Bilirubin-Metabolismus anfallenden Nebenprodukte, etwa Kohlenmonoxid zu besprechen, da diese ebenso in zahlreichen anderen Arbeiten ausführlich abgehandelt wurde und im Zuge dieser Arbeit das Hauptaugenmerk auf dem Pigment Bilirubin und seinem proklamierten antioxidativen Potential liegt.

2.4 Das Zusammenspiel von antioxidativ wirksamen Molekülen unter pathologischen Bedingungen

Wie bei allen Stoffwechselprozessen im menschlichen Organismus, ist nicht ein einzelnes Molekül allein fähig seine antioxidative Kapazität zu entfalten. Daher kann etwa Bilirubin Teil des komplexen Abwehrmechanismus gesehen werden, an dem unterschiedliche Substanzen, aber auch Enzym-Kaskaden wichtige Funktionen übernehmen [Neužil und Stocker, 1994]. Bilirubin selbst kann bis zu 10 % der gesamten antioxidativen Kapazität im Organismus bei physiologischen Plasambilirubin-Konzentrationen übernehmen [Frei et al., 1988].

Im Zuge der extrazellulären antioxidativen Abwehr arbeiten die Substanzen Glutathion, Ascorbinsäure, Vitamin E, Bilirubin, Harnsäure, Glucose sowie Ceruloplasmin, Albumin, Transferrin, Lactoferrin, Apolipoproteine und andere Serumproteine synergistisch zusammen. Zusätzlich bieten Erythrozyten und die darin vorkommende Superoxiddismutase Schutz vor reaktiven Verbindungen.

Das intrazelluläre Abwehrsystem besteht hauptsächlich aus den antioxidativen Enzymen des Glutathion-Redoxzyklus (Glutathion-Reduktase und Glutathion-Peroxidase), der Katalase, der Superoxid-Dismutase, der Glutathion-S-Transferase und der Hämoxigenasen, welche gleichermaßen durch Verknüpfung ihrer Reaktionen bei der Inaktivierung von reaktiven Verbindungen helfen.

So katalysiert zum Beispiel die Superoxiddismutase (SOD) jene Reaktion, in der Superoxidradikale in Wasserstoffperoxid umgewandelt werden, welches anschließend mittels der Katalase und Glutathionperoxidase zu Wasser und Sauerstoff reduziert wird [Stocker et al., 1987b] (siehe Abbildung 5).

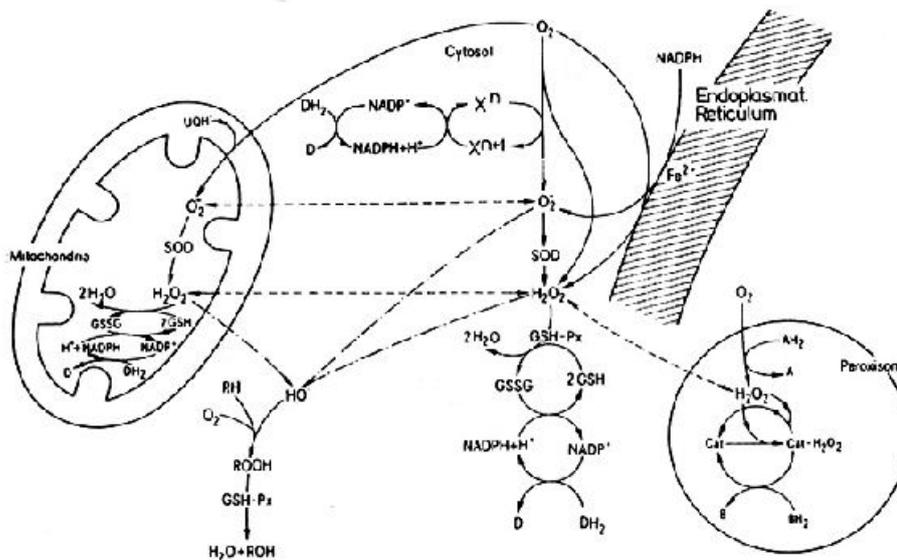


Abbildung (5) Das komplexe Zusammenspiel der antioxidativen Enzyme Katalase (Cat), Glutathion-Peroxidase (GSH-Px) und Superoxid-Dismutase (SOD) bei der intrazellulären Abwehr von oxidativem Stress – nach Otto-Knapp [2000]

Zudem können Vitamin E und C sowie Glutathion und β -Carotin auch intrazellulär gemeinsam mit Ubichinon-10 oxidativen Schädigungen der Zellen entgegen wirken. Weiters interagieren im Cytosol Ferritin und Metallothioneine sowie Enzyme, welche spezifisch mit schwefel-hältigen Verbindungen reagieren können [Sies, 1993; Stocker und Keaney jr., 2004; Halliwell und Gutteridge, 2007].

So wird in Gegenwart von Ascorbinsäure, die Oxidation von Bilirubin durch Peroxylradikale verhindert [Stocker et al., 1987a].

Derart wird bei einem oxidativen Angriff von Radikalen zuerst reduziertes Glutathion (GSH) verbraucht. Es kommt zur Konzentrationsabnahme dieser Verbindung und folglich zum Verbrauch der Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase und in weiterer Folge zur gesteigerten Expression der Häm-Oxygenase 1, was schlussendlich die Bildung/Regeneration von Bilirubin induziert [Tomaro und del C. Battle, 2002]. In reduzierter Form beruht das antioxidative Potential von Glutathion auf seiner Thiol-Gruppe, wodurch diese funktionellen Gruppen bei anderen Verbindungen, insbesondere

von Proteinen (Enzymen) im lipophilen Extrazellulärraum vor Oxidation geschützt werden [Sedlak et al., 2009].

Das heißt, dass Glutathion als Bestandteil eines Enzymsystems bei der Entgiftung von Peroxiden, vor allem von Lipidhydroperoxiden und Wasserstoffperoxid hilft [Elmadfa und Leitzmann, 2004].

In diesem System wird Glutathion zunächst durch die GSH-Peroxidase zu GSSG oxidiert. Die Regeneration des oxidierten Glutathions erfolgt anhand der Glutathion-Reduktase in einem NADPH-abhängigen Prozess. Zuletzt dient die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase der Regeneration des NADPH [Löffler und Brigelius-Flohé, 2007].

Die GSH-Peroxidase mit Glutathion als Cosubstrat ist ferner an der Regulation des Arachidonsäure-Stoffwechsels und damit an der Thrombozytenaggregation beteiligt [Elmadfa und Leitzmann, 2004].

Entsprechend wird beim oxidativen Abbau von Lipoproteinen mit Hilfe von α -Tocopherol zunächst eine Radikalkettenreaktion unterbunden, da die Tocopherolmoleküle Wasserstoffatome abgeben und so Fettsäuren nicht von Radikalen angegriffen werden. Die dadurch entstandenen Tocopherylradikale werden anschließend mittels Ascorbinsäure durch Übertragen des freien Elektrons auf das oxidierte Tocopherol oder Biliverdin, wodurch ein weit weniger reaktionsfreudiges, wasserlösliches Radikal oder Biliverdin entsteht, regeneriert. Dieses diffundiert schließlich aus dem Lipoproteinmolekül und wird durch Reaktion mit Ubichinonen stabilisiert [Neužil und Stocker, 1994].

Biliverdin wird, wie bereits unter Punkt 2.3.2.2 und 2.3.2.3 beschrieben, mit Hilfe der Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin reduziert.

Als wasserlösliches Antioxidans kann Vitamin C zusätzlich zum Schutz von hydrophilen Umgebungen den mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den Zellmembranen durch die synergistischen Reaktionen mit α -Tocopherol Schutz vor Oxidation bieten. Dabei stellt Ascorbinsäure, so wie Glutathion, Reduktionsäquivalente bereit [Frei et al., 1990].

Ihre Regeneration ist wiederum an das allgemeine zelluläre Redox-Potential des NADH- oder NADPH-Systems gekoppelt (siehe Abbildung 6) [Sies und Stahl, 1995].

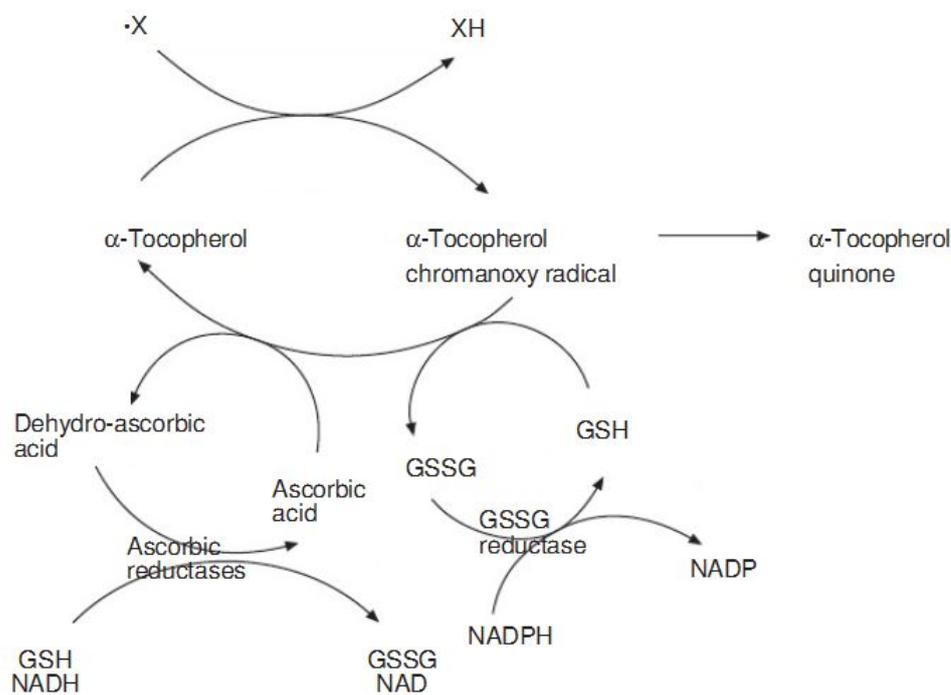


Abbildung (6) Die synergistischen Wirkungen von Ascorbinsäure, α -Tocopherol und Glutathion (GSH) bei der antioxidativen Abwehr freier Radikale (X^\bullet) – modifiziert nach Parke [1999]

Auch Harnsäure erfüllt in physiologischer Konzentration im Extrazellulärraum seine Aufgabe als sehr wirksames Antioxidans gegenüber wasserlöslichen Radikalen [Neužil und Stocker, 1994; Halliwell und Gutteridge, 2007].

Carotinoide sind fettlöslich und bestimmte Vertreter, etwa α -Carotin, γ -Carotin oder Lycopin sind dem α -Tocopherol entsprechend in höheren Konzentrationen in Lipoproteinpartikeln enthalten [Neužil und Stocker, 1994].

Lycopin ist der effektivste Fänger von Singulett-Sauerstoff [Sies und Stahl, 1995]. Aber auch α -Carotin und β -Carotin, sowie Zeaxanthin und β -Cryptoxanthin können äußerst effizient Singulett-Sauerstoff deaktivieren [Stahl und Sies, 2003].

Carotinoide reagieren weiters mit Peroxyl- oder Alkoxyradikalen und können zudem anhand photooxidativer Reaktionen angeregte Moleküle deaktivieren. So sind Lutein und Zeaxanthin jene Vertreter, die primär in der Makula des menschlichen Auges zu finden sind, da sie effektiv ultraviolettem Licht filtern können [Stahl und Sies, 2003] und so vor

photooxidativen Schäden schützen.

β -Carotin kann aufgrund seiner Fähigkeit der Resonanzstabilisierung und seiner Vielzahl an Doppelbindungen zwei Lipidperoxyl-Radikale gleichzeitig binden und so Zellmembranen sowie Lipoproteine vor Oxidation bewahren [Sies und Stahl, 1995].

Eine zusätzlich beachtliche Eigenschaft von Carotinoiden ist, dass für ihre Regeneration kein spezielles System notwendig ist, da sie nach Aufnahme des ungepaarte, freien Elektrons von einem Singulett-Sauerstoff-Molekül dessen Energie in Form von Wärme an ihre Umgebung wieder abgeben. Auf diese Weise kann ein Carotinoid-Molekül mehrere Singulett-Sauerstoff-Moleküle abfangen, bevor es selbst verbraucht ist [Sies und Stahl, 1995; Stahl und Sies, 2005].

Krebspräventive Effekte üben Carotinoide, insbesondere Lycopin zudem anhand der Beeinflussung von Signaltransduktionswege, der Expression von bestimmten Genen und Enzymen, der Signalvermittlung via gap junctions sowie mittels der Induktion von Phase I und II Enzymen aus [Stahl und Sies, 2005].

Hinsichtlich der Lipidperoxidation arbeiten β -Carotin und α -Tocopherol gleichfalls synergistisch zusammen. So wird bevorzugt Vitamin E oxidiert, um eine chemische Veränderung (Verlust der Doppelbindungen) des Carotinoids und folglich seinen Funktionsverlust zu verhindern [Sies und Stahl, 1995].

Umgekehrt kann β -Carotin [Kagan et al., 1992] Tocopherylradikale nicht reduzieren, was bedeutet, dass Carotinoide, gleich der Harnsäure nicht bei der Regeneration von Vitamin E helfen [Neužil und Stocker, 1994].

Hydrochinone, die reduzierten Formen der Ubichinone können durch Mitwirken bei der Regeneration von Tocopherol aus Tocopherylradikalen das Entfernen freier Radikale und Peroxide aus lipophilen Umgebungen, insbesondere aus Zellen und deren umgebenden Membranen erreichen [Frei et al., 1990; Elmadfa und Leitzmann, 2004]. Im frühen Stadium der Oxidation von Lipoproteinen ist der Schutz der Polyenfettsäuren beinahe vollständig durch Ubichinone gewährleistet [Stocker et al., 1991; Neužil und Stocker, 1994]. Durch Aufnahme des Elektrons bei der Regeneration von α -Tocopherol entsteht ein Semichinon-Radikal. Dieses reagiert wiederum sehr schnell mit Sauerstoff, wodurch ein Superoxid-Radikal gebildet wird. Dieses ist zwar im wässrigen Milieu dazu in der Lage oxida-

tiven Stress auszulösen, jedoch kann es nicht mit Lipiden zu reagieren. So wird indirekt die Lipidperoxidation unterbunden.

Zudem wird vermutlich die Ascorbinsäure mit Hilfe eines Coenzym-Q-abhängigen Elektronentransports entlang der Zellmembran in den Extrazellulärraum regeneriert [Frei et al., 1990].

2.4.1 Bilirubin und kardiovaskuläre Erkrankungen, Krebs und andere, durch oxidativen Stress induzierte Erkrankungen

So wurde schließlich 1994 von den Autoren Schwertner et al. erstmals in einer retrospektiven Humanstudie ein negativer Zusammenhang zwischen der Serumbilirubin-Konzentration und koronaren Herzerkrankungen (CHD) bei 877 Männern beschrieben. Seither gilt Serumbilirubin, gleich dem Rauchen, systolischen Blutdruck und HDL-Cholesterin als unabhängiger Risikofaktor für koronare Herzkrankheiten [Schwertner et al., 1994].

Auf Basis der Annahme, dass niedrige Konzentrationen an Bilirubin mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einhergehen, folgten eine Reihe weiterer Studien zu dieser Thematik.

So konnten die Resultate von Schwertner et al. 1994 in einer retrospektiven Fall-Kontrollstudie bei Frauen und Männern mit familiär aufgetretenen CHD [Hopkins et al., 1996] bestätigt werden. Desgleichen wurden von Levinson 1997 ein negativer Zusammenhang zwischen Serumbilirubin und Erkrankungen der Herzkranzgefäße nachgewiesen.

Aus den Ergebnissen einer Studie von Madhavan et al., nämlich dass Kinder, deren Eltern einen Herzinfarkt erlitten oder an Bluthochdruck leiden, durchschnittlich geringere Serumbilirubin-Konzentrationen aufweisen, als jene der Kontrollgruppe, konnte ferner abgeleitet werden, dass niedrige Werte für Serumbilirubin Kennzeichen oxidativen Stresses sind, und womöglich kardiovaskuläre Events induzieren [Madhavan et al., 1997].

Eine weitere Studie fand desgleichen einen Zusammenhang zwischen niedrigen Serumbilirubinkonzentrationen und dem Auftreten von koronaren Herzerkrankungen bei Männern [Hunt et al., 2001], sowie Lingenhel et al. 2008 bei Frauen und Männern.

In einer 1995 publizierten, im Zuge der British Regional Heart Study (BRHS) durch-

geführten prospektiven Analyse konnte gezeigt werden, dass geringe ($<7 \mu\text{mol/L}$) wie auch sehr hohe ($>12 \mu\text{mol/L}$) Serumbilirubinkonzentrationen (im Vergleich zu mittleren Levels mit $8\text{--}9 \mu\text{mol/L}$) mit einem um bis zu 30 % erhöhten Risiko für ischämische Herzkrankungen (IHD) einher gehen. Nachdem jedoch von jener Gruppe mit hohen Werten für Bilirubin Probanden mit erhöhten Leberenzymkonzentrationen ausgeschlossen wurden, konnte in dieser Gruppe die geringste Inzidenz für IHD nachgewiesen werden [Breimer et al., 1995].

In gleicher Weise brachten die Autoren Dejousse et al. nach Auswertung von Daten der Framingham Offspring Study, einer prospektiven Studie, Ergebnisse dafür hervor, dass höhere Werte für das Gesamtbilirubin mit einem, bei Männern, geringeren Risiko kardiovaskuläre Erkrankungen zu entwickeln, einen Herzinfarkt zu erleiden, sowie mit jeder anderen Form eines kardiovaskulären Events assoziiert ist. Bei Einteilung der Probanden in Quintilen bezüglich ihrer Serumbilirubinkonzentrationen (für Männer: $0,17\text{--}9,39$; $9,40\text{--}11,10$; $11,11\text{--}14,52$; $14,53\text{--}17,94$ und $17,95\text{--}66,69 \mu\text{mol/L}$) wiesen die Personen der vierten Quintile die geringste Mortalitätsrate auf [Djossé et al., 2001].

Zusätzlich konnte das proklamierte antioxidative Potential von Albumin [Neužil und Stocker, 1994, 1993] sowie von Serumbilirubin [Djossé et al., 2003] auch im Zusammenhang mit dem Herzinfarkttrisiko bestätigt werden.

Zudem konnte in weiteren prospektiven Fall-Kontroll-Studien [Wei et al., 2000a,c] der Zusammenhang von niedrigen Bilirubinkonzentrationen im Serum und einem erhöhten Risiko an koronaren Herzerkrankungen zu versterben beziehungsweise der Gesamtmortalität ermittelt werden.

Vítek et al. konnten schließlich erstmals in Humanstudien auch bei Personen mit Gilbert's Syndrom eine positive Korrelation zwischen Serumbilirubinkonzentrationen und der totalen antioxidativen Kapazität feststellen. In ihren Untersuchungen kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass bei Personen mit Gilbert's Syndrom mit einer Häufigkeit von 2% koronare Herzkrankheiten auftreten, im Vergleich zu einer Prävalenz von etwa 12% bei Personen mit physiologischen Bilirubinlevels [Vítek et al., 2002].

Dieser Zusammenhang zwischen leicht erhöhter Konzentration an Bilirubin und vermindertem Auftreten von Herz-Kreislaufkrankungen und der kardiovaskulären Mortalität

wurde zudem in anderen Untersuchungen [Hopkins et al., 1996; Wei et al., 2000a,c] gleichfalls nachgewiesen.

In einer weiteren prospektiven Studie konnte der zuvor proklamierte Zusammenhang ebenso bewiesen werden [Temme et al., 2001].

Die Autoren Novotný und Vítek konnten schließlich in einer Meta-Analyse 11 ausgewählter Studien [Novotný und Vítek, 2003] eine negative Korrelation zwischen Serumbilirubinlevels und dem Ausmaß beziehungsweise Schweregrad der Atherosklerose bei Männern ausarbeiten. Die Grenze, ab der sich diese positiven, präventiven Effekte zeigen ist eine Bilirubinkonzentration von $\geq 10 \mu\text{mol/L}$.

In weiteren Studien, etwa von Ishizaka et al. 2001 und später von Rantner et al. 2008, konnten bei Personen mit Erkrankungen der peripheren Gefäße durchschnittlich geringere Serumbilirubinwerte gemessen werden, was für einen protektiven Effekt mäßig erhöhter Serumbilirubinlevel in Hinblick auf vaskulärer atherosklerotischer Veränderungen spricht. Zu demselben Ergebnis kamen Autoren bei einer Studie, in welcher die Probanden mit Gilbert's Syndrom desgleichen eine geringere Prävalenz für atherosklerotische Veränderungen der Carotis zeigten [Vítek und Schwertner, 2007].

Überdies konnten beispielsweise von Erdöğün et al. 2006 Risikofaktoren für die Entstehung von Atherosklerose mit niedrigen Werten für Serumbilirubin in Verbindung gebracht werden.

Weiters konnten die Autoren Perlstein et al. 2008 nach Auswerten von Daten der National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 1999–2004) eine inverse Beziehung der Bilirubinkonzentration und peripheren arteriellen Verschlusskrankheit feststellen. Eine Analyse von Daten über Kinder und Jugendliche dieser Studie zeigte eine negative Korrelation der Werte für Serumbilirubin und der Prävalenz des Metabolischen Syndroms [Lin et al., 2009].

In einer anderen Querschnittsstudie wurden ebenfalls bei Patienten mit Metabolischem Syndrom geringere Bilirubinlevels im Plasma gemessen, im Vergleich normal gewichtiger Personen [Giral et al., 2010].

In einer prospektiven Studie an Männern und Frauen in Korea war des Weiteren das Risiko einen ischämischen Schlaganfall zu erleiden negativ korreliert mit der Höhe der Serum-

bilirubinonzentrationen bei den männlichen Probanden gebracht werden [Kimm et al., 2009].

Eine Querschnittstudie in China konnte indes einen Zusammenhang zwischen der Konzentration von Bilirubin im Serum und der arteriellen Gefäßsteifigkeit feststellen. So wurde mit sinkenden Bilirubinlevels ein signifikanter Anstieg der Gefäßverhärtung bei den männlichen Probanden beobachtet [Li et al., 2011].

Von den Autoren Lin et al. 2006 wurde nach Auswertung von Daten der Framingham Heart Study festgestellt, dass Personen mit Gilbert's Syndrom, basierend auf dem homozygoten UGT1A1*28-Allel, ein deutlich vermindertes Risiko für CVD aufweisen.

Diese Beobachtungen konnten in einer späteren Studie bestätigt werden und es wurde ferner ausgearbeitet, dass das UGT1A1-Gen in Zusammenhang mit CVD zu sehen ist und dass der TA-Repeat Polymorphismus mit einem erheblich reduzierten Risiko für CVD assoziiert ist [Lin et al., 2010].

Bulmer et al. 2008b konnten schließlich erstmals in einer Fall-Kontrollstudie Kennzeichen von oxidativen Stress und dem antioxidativen Status bei 9 Personen mit Gilbert's Syndrom und 12 Kontrollen untersuchen. Ihre Haupthypothese der positiven Korrelation von mäßig erhöhter Bilirubinkonzentrationen und Schutz vor Cu^{2+} -induziertem oxidativen Stress [Asad et al., 2001] im Serum konnte bestätigt werden. Das heißt, dass eine erhöhte antioxidative Kapazität und Resistenz gegenüber oxidativen Vorgängen im Serum zur geringeren Prävalenz von kardiovaskulären Erkrankungen bei GS beitragen [Bulmer et al., 2008b].

Tapan et al. 2011 konnten in ihren Untersuchungen bei Patienten mit Gilbert's Syndrom ebenso feststellen, dass unkonjugiertes Bilirubin negativ mit Markern atherosklerotischer Veränderungen, nämlich „small dense LDL-Cholesterol“, oxidierten LDL-Partikeln und „high sensitive C-reaktiven Protein“, korreliert.

In einer aktuellen Untersuchung konnten bei Probanden mit Gilbert's Syndrom erhöhte Werte für reduziertes Glutathion im Blutplasma sowie eine geringere Konzentration an Proteincarbonyl-Verbindungen im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe nachgewiesen werden [Boon et al., 2012]

In einer Kohortenstudie konnte Bilirubin darüber hinaus in Bezug auf Lungenerkrankun-

gen analysiert werden. Das Ergebnis war, dass bei Männern erhöhte Bilirubinlevel invers mit der Entstehung von Lungenkrebs sowie der Entwicklung einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung verbunden sind [Horsfall et al., 2011].

Jene Mechanismen, die an der Pathogenese der Atherosklerose von Herz- beziehungsweise peripheren Gefäßen beteiligt sind, können ebenfalls bei der Entstehung von bestimmten Krebserkrankungen eine erhebliche Rolle spielen.

So konnte im Verlauf weiterer Studien bei Personen, die an Krebs erkrankt waren, eine niedrige Konzentration an Serumbilirubin festgestellt werden [Vítek und Schwertner, 2007].

In der Studie von Temme et al. 2001 wurde ein solcher Zusammenhang, insbesondere Dickdarmkrebs betreffend nachgewiesen. Die Mortalität aufgrund von Tumorerkrankungen nahm mit steigenden Serumbilirubinlevels ab.

Bei weiteren Auswertungen der zuvor erwähnten Follow-up Studie hinsichtlich Krebserkrankungen, konnten die Autoren Wei et al. 2000b desgleichen eine negative Korrelation zwischen der Entstehung von Krebs und Serumbilirubinlevels erkennen.

In einer anderen 2004 publizierten Studie konnte überdies bei Probanden mit malignen Tumoren (nicht die Haut betreffend) signifikant geringere Werte für Serumbilirubin als in der gesunden Kontrollgruppe gemessen werden. Dieser Unterschied war zudem bei Personen mit früherer Anamnese eines Kolonkarzinoms am größten ausgeprägt [Zucker et al., 2004].

Diese Ergebnisse legen nahe, dass Personen mit Gilbert's Syndrom möglicherweise vor der Entwicklung bestimmter Krebserkrankungen geschützt sind.

In einer anderen Studie konnten des Weiteren signifikante Unterschiede bei Brustkrebspatientinnen bezüglich der Odds-Ratio der höchsten im Vergleich zur niedrigsten Quartile der Serumbilirubinkonzentration gemessen werden [Ching et al., 2002].

Ähnliche Effekte bezüglich Brustkrebspatientinnen konnten zudem bei Patientinnen mit dem Haplotyp UGT1A1*28 festgestellt werden [Sparks et al., 2004; Shatalova et al., 2005].

Eine Fall-Kontroll-Analyse von Daten der Nurses Health Study brachte weiters hervor,

dass Frauen mit Gilbert's Syndrom basierend auf einer Mutation der TATAA-Promotorregion des UGT1A1-Gens eine geringere Wahrscheinlichkeit aufweisen, an Gebärmutterkrebs zu erkranken [Duguay et al., 2004].

Es konnten zudem sowohl antiproliferative Effekte auf Brustkrebszellen [Vítek und Schwertner, 2007], als auch Wirkungen, welche die Apoptose von Dickdarmkrebszellen in vitro induzieren, für unkonjugiertes Bilirubin nachgewiesen werden [Keshavan et al., 2004].

So kann man annehmen, dass neben den bekannten antioxidativen Wirkungen von Bilirubin auch die publizierten antiproliferativen Effekte dieses Gallenpigments desgleichen mittels Modulation intrazellulärer Signaltransduktionswege, Einfluss auf Zellproliferation [Öllinger et al., 2005] sowie Apoptose bewirkt werden.

Aus einer Vielzahl weiterer Studien geht ferner hervor, dass Serum-Bilirubin mit einer geringeren Prävalenz für einige andere Erkrankungen assoziiert ist, sowie dass höhere Bilirubinkonzentrationen im Serum die Auswirkungen einer Reihe von Erkrankungen abschwächen können [Vítek und Schwertner, 2007].

So wurde beispielsweise festgestellt, dass Hyperbilirubinämie vor möglichen Komplikationen bei Neugeborenen, etwa Kreislaufversagen oder Atemproblemen schützen kann.

Zudem gibt es Ergebnisse aus verschiedenen Studien, welche niedrige Konzentrationen an Bilirubin mit dem Auftreten von rheumatoider Arthritis, systemischen Lupus erythematosus und Wegner granulomatosis in Verbindung bringen und sie sind möglicherweise mit mentalen Erkrankungen assoziierbar.

Bilirubin nimmt zudem womöglich Einfluss auf den menschlichen circadianen Rhythmus und es gibt Hinweise aus Studien mit Patienten, welche den Genotyp beziehungsweise Phenotyp des Gilbert's Syndrom aufweisen, die auf eine negative Korrelation zwischen niedrigen Serumbilirubinlevels und Schizophrenie deuten [Vítek und Schwertner, 2007].

Vermehrte Ausscheidung von Biopyrrinen, Oxidationsprodukte des Bilirubin, wurde beispielsweise in Zusammenhang mit Koronaren Herzerkrankungen, Herzinsuffizienz, Atopischer Dermatitis, Sepsis, Stress nach operativen Eingriffen, Schizophrenie und Depressionen, akuten psychologischen Stressbelastungen sowie Morbus Alzheimer nachgewie-

sen [Vítek und Schwertner, 2007].

Diese Studien legen nahe, dass der Verbrauch von Bilirubin bei oxidativen Stressreaktionen einen jener Hauptwege darstellt, über den Bilirubin vor oxidativen Schäden schützen kann.

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Die vorliegende Studie untersucht physiologische Effekte bei Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zu Personen, welche eine physiologische Konzentrationen an Bilirubin aufweisen.

Es handelt sich um eine Fall-Kontroll-Studie im Querschnittsdesign, an der Betroffene und Nicht-Betroffene teilnahmen.

Vor Beginn der Hauptphase der Studie wurde bei potentiellen Teilnehmern die Leberwerte und das Gesamtbilirubin sowie unkonjugiertes Bilirubin gemessen. Weitere Ein- bzw. Ausschlusskriterien (siehe unter Kapitel 3.1.2) sollten mittels Fragenbogen überprüft werden.

Zu Beginn der Hauptphase der Studie folgte eine weitere Blutabnahme, es wurde Urin gesammelt und ein Mundschleimhautabstrich durchgeführt. Hierfür waren für die Teilnehmer zwei Termine angesetzt.

Die notwendigen Blutabnahmen, sowohl für die Voruntersuchung, als auch in der Hauptphase der Studie sowie der Mundschleimhautabstrich wurden von Mitarbeitern an der Universitätsklinik für Klinische Pharmakologie im Allgemeinen Krankenhaus der Stadt Wien (AKH) durchgeführt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Stadt Wien genehmigt (Ref. No.: 274 / 2010).

3.1.1 Rekrutierung der Studienteilnehmer

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer erfolgte mit Hilfe von Ärzten am Allgemeinen Krankenhaus der Stadt Wien, als auch durch Plakate und Informationsbroschüren an der Universitätsklinik, in diversen Arztpraxen und Instituten der Universität Wien, sowie Apotheken. Weiters wurden Studienanzeigen in einigen wissenschaftlichen Diskussionsplattformen und Zeitungen geschaltet. Die Teilnehmer erhielten eine Aufwandsentschädigung

in der Höhe von 50 Euro.

Bei Einschluss in die Studienpopulation und nach unterzeichnen einer Einverständniserklärung seitens der Teilnehmer erfolgte die Zuweisung in die Fallgruppe (Betroffene) oder Kontrollgruppe (Nicht-Betroffene) anhand der, bei der Voruntersuchung erhaltenen Daten für Gesamtbilirubin beziehungsweise unkonjugiertes Bilirubin (siehe 3.1.2).

3.1.2 Ein- bzw. Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien

- 20-80 Jahre
- Gesamtbilirubin im Blut höher als $20,52 \mu\text{mol/L}$ (1,2 mg/dl) bei Gilbert's Syndrom
- Unkonjugiertes Bilirubin im Blut höher als $17,10 \mu\text{mol/L}$ (1 mg/dl) bei Gilbert's Syndrom
- Gesamtbilirubin im Blut kleiner als $20,52 \mu\text{mol/L}$ (1,2 mg/dl) in der Kontrollgruppe
- Unkonjugiertes Bilirubin im Blut kleiner als $17,10 \mu\text{mol/L}$ (1 mg/dl) in der Kontrollgruppe
- γ - Glutamyltranspeptidase im Blut (GGT) $<39 \text{ U/l}$ bei Frauen und $<66 \text{ U/l}$ bei Männern
- Alanin- Aminotransferase im Blut (ALT) $<35 \text{ U/l}$ bei Frauen und $<50 \text{ U/l}$ bei Männern
- Aspartat- Aminotransferase im Blut (ALT) $<35 \text{ U/l}$ bei Frauen und $<50 \text{ U/l}$ bei Männern
- Moderates Bewegungsverhalten

Ausschlusskriterien

- Jünger als 20 Jahre oder älter als 80 Jahre
- Kardivaskuläre Erkrankungen/ Herzerkrankungen
- Hepatitis B oder C

- Jede andere Form einer Lebererkrankung
- Cholelithiasis
- Hämolyse
- Chronische Nierenerkrankungen
- Akute/vergangene Tumorerkrankungen
- Diabetes Mellitus
- Personen mit Organtransplantaten
- Supplementierung mit Antioxidantien innerhalb der letzten 4 Wochen vor der ersten Blutabnahme
- Medikamenteneinnahme innerhalb der letzten 5 Wochen vor der ersten Blutabnahme, welche die Leberwerte beeinflussen könnten (z.B.: Probenecid und Rifampicin)
- Raucher >5 Zigaretten/Tag
- Alkoholkonsum von >7 Gläsern/Woche
- LeistungssportlerInnen (>10 Stunden Training/Woche)

3.1.3 Studienteilnehmer

Insgesamt 100 Personen im Alter zwischen 20 und 80 Jahren konnten als Studienteilnehmer rekrutiert werden, wobei mehr Männer an der Studie teilnahmen. Bei 38 Personen wurden Konzentrationen an unkonjugiertem Bilirubin von $>17\mu\text{mol/L}$ mit Hilfe der High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) gemessen, woraufhin die Zuweisung zur Fallgruppe erfolgte. Weitere 38 Teilnehmer wurden anschließend der Kontrollgruppe zugewiesen.

Bei den anderen 24 Personen konnte aufgrund ihrer nicht eindeutig zuzuordnenden Bilirubinkonzentrationen keine Einteilung in eine der beide Gruppen vorgenommen werden.

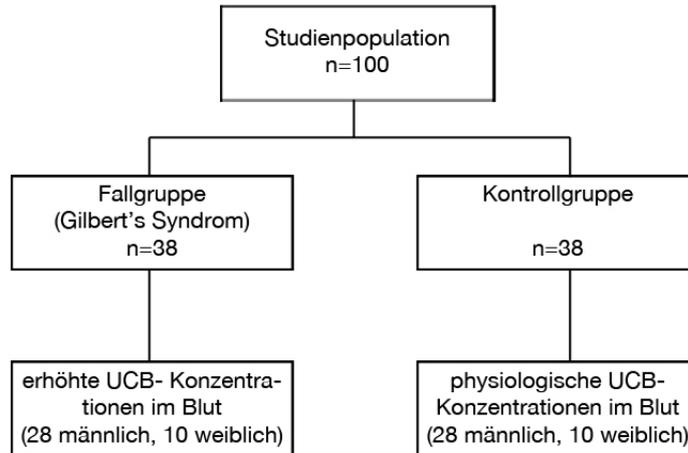


Abbildung (7) Einteilung des Studienkollektivs in eine Fallgruppe (Personen mit Gilbert's Syndrom) und Kontrollgruppe (Personen ohne erhöhte Bilirubinlevel) anhand ihrer UCB-Level (siehe Merkmale unter Punkt 3.1.2)

3.1.4 Zeitlicher Studienverlauf

Die Studienteilnehmer sollten am Tag vor der Blutabnahme zwischen 09:00 Uhr und 17:00 Uhr nicht mehr als 400 kcal zu sich nehmen und anschließend bis zur Blutabnahme fasten, da die Konzentration von Bilirubin im Serum durch Fasten ansteigt [Owens und Sherlock, 1973].

Für sämtliche Untersuchungen wurden den nüchternen Studienteilnehmern am nächsten Tag im Verlauf des Vormittages die bereits unter Punkt 3.1 genannten Proben entnommen, wobei das Blut entweder in mit Lithium-Heparin und EDTA beschichteten Röhrchen oder Serumröhrchen abgenommen wurde. Im Anschluss daran wurden die Proben unter Lichtschutz zum Department für Ernährungswissenschaften transportiert und durch ein Coding-System gelabelt, sodass die Proben eindeutig, aber anonymisiert gekennzeichnet waren. Den Autoren war dabei jedoch nicht bekannt, zu welcher der beiden Gruppen die Teilnehmer zugeordnet waren.

Danach konnte mit der Blutauflbereitung und den einzelnen Untersuchungen begonnen

werden.

Die Proben wurden von April bis September 2010 gesammelt.

3.1.5 Blutaufbereitung

Für die Analyse von Glutathion wurde Vollblut aus den entsprechenden Röhrchen mit Heparin verwendet, da dank dieser Beschichtung die Gerinnung des Blutes verhindert wird. Die Analyse von Vitamin C erfolgte in Heparin-Plasma, welches man durch 15-minütiges Zentrifugieren des Vollblutes bei 1000 U/min erhält. Beide Untersuchungen wurden photometrisch am selben Tag der Blutabnahme durchgeführt.

Der quantitative Nachweis von Vitamin A, Vitamin E, Vitamin K, der Carotinoide und Ubichinon 50 erfolgte chromatographisch im späteren Verlauf der Studie, ebenfalls in Heparin-Plasma.

Dafür wurden die Blutabnahmeröhrchen zunächst kühl gelagert, danach 10 Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert, das Plasma abgenommen und in Eppendorf-Cups pipettiert. Die Proben wurden anschließend mit Stickstoff begast und bis zu den weiteren Analysen bei -80°C gelagert.

Sonstiges: Der Variationskoeffizient wurde bei allen Parametern anhand dieser Formel berechnet:

$$VK = \frac{\text{Standardabweichung}}{\text{Mittelwert}} * 100$$

3.2 Photometrische Methoden

3.2.1 Bestimmung von Vitamin C (L-Ascorbinsäure) im Plasma

3.2.1.1 Prinzip der Methode

Der Nachweis von Vitamin C im Blutplasma erfolgt mit Hilfe der Methode nach Day, Williams und Marsh (1979). Diese Methode beruht darauf, dass L-Ascorbinsäure Eisen(III)-Ionen reduzieren kann, und dabei selbst zu L-Dehydroascorbinsäure oxidiert wird. Die

entstandenen Eisen(II)-Ionen reagieren anschließend mit 2,4,6-Tripyridyl-s-Triazin (TPTZ) zu einem Farbkomplex, dessen Menge photometrisch gemessen werden kann.

Da der Gehalt dieses Komplexes äquivalent zum Gehalt an Eisen(II)-Ionen und somit auch zum Gehalt an L-Ascorbinsäure ist, lässt sich dadurch die Menge an Vitamin C im Plasma quantifizieren [Day et al., 1979].

3.2.1.2 Materialien und Geräte

Die folgend aufgelisteten Reagenzien wurden für den Nachweis von Vitamin C verwendet:

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
Aqua bidest.	-	-
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemicals	143032
Eisen(II)-chlorid Anhydrat	Merck KGaA	2317294
Essigsäure	Fluka Analytical	60320
meta-Phosphorsäure	Sigma-Aldrich Chemicals	04103
Methanol chromasolv	Merck KGaA	60300100X
Natriumacetat Anhydrat	Sigma-Aldrich Chemicals	0001442913
Salzsäure (HCL)	Carl Roth GmbH	63314
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma-Aldrich Chemicals	33731
2,4,6-Tripyridil-s-Triazin (TPTZ)	Fluka Analytical	100902759

Tabelle (3.2.1) Reagenzien zum Nachweis von Vitamin C

Folgende Geräte wurden bei dieser Methode verwendet:

- Hitachi U-1100 Spectrophotometer (UV/VIS) und Kunststoff-Makroküvetten VWR International GmbH
- Präzisionswaage und pH-Meter
- Zentrifuge, Heraeus Megafuge 40, Thermo Scientific und Vortex Heidolph REAX 2000

- Ultraschallbad Brandelin Sonorex und Magnetrührer -Marke-
- Kolbenhubpipetten diverser Voluminer, Pasteurpipetten, diverse Glasmaterialien

3.2.1.3 Gebrauchslösungen

- TPTZ-Lösung [0,048 M]: es werden 0,750 g 2,4,6-Tripyridil-s-Triadzin mit 0,1 N HCL auf 50 ml aufgefüllt.
(diese Lösung ist 6 Monate bei 4-8°C (im Kühlschrank) haltbar, lichtempfindlich)
(für eine 0,1 N HCL-Lösung werden 10ml der konzentrierten HCL (37% ig) auf 100ml mit aqua bidest. aufgefüllt)
- Eisen(III)-Chlorid-Lösung [0,02 M]: es werden 0,324 g FeCl₃ -Anhydrat mit 0,2 N HCL auf 100 ml aufgefüllt.
(diese Lösung ist 3 Monate bei Raumtemperatur haltbar)
(für eine 0,2 N HCL-Lösung werden 40 ml der konzentrierten HCL (37% ig) auf 200 ml mit aqua bidest. aufgefüllt)
- Acetat-Puffer: es werden 410 g Natrium-Acetat in heißem aqua bidest. gelöst und auf 1000 ml damit aufgefüllt [5 M] + 125 ml 5 M Essigsäure um den pH-Wert auf 5,90 ± 0,10 einzustellen + 225 ml Methanol.
(diese Lösung ist 3 Monate bei Raumtemperatur haltbar)
(für eine 5 M Essigsürelösung werden 72 ml konzentrierter Essigsäure auf 250 ml mit aqua bidest. aufgefüllt)
- Ascorbinsäure-Stocklösung [100 mg/dl]: es werden 100 mg L-Ascorbinsure mit 20 ml 3% iger (w/v) Metaphosphorsäure gemischt und anschlie?ss end auf 100 ml mit aqua bidest. aufgefüllt.
(diese Lösung ist maximal 3 Monate bei 4-8°C (im Kühlschrank) haltbar, lichtempfindlich)
(für eine 3% ige meta-Phosphorsäurelsung werden 3 g meta-Phosphorsäure in 100 ml aqua bidest. aufgelöst)

Der Ascorbinsäure-Arbeitsstandard, das Farbreagenz und die Trichloressigsäurelösung sind am jeweiligen Untersuchungstag immer frisch herzustellen.

- Ascorbinsäure-Arbeitsstandard [2 mg/dl]: es werden 1,0 ml des Ascorbinsäure-Arbeitsstandards auf 50 ml mit aqua bidest. aufgefüllt.
- Trichloressigsäure-Lösung [0,615 M]: es werden 2,5 g Trichloressigsäure auf 25 ml mit aqua bidest. aufgefüllt.
- Farb-Reagenz: es werden 0,125 ml TPTZ-Lösung + 0,1 ml Fe(III)Cl₃ -Lösung in etwa 12 ml vorgelegtem Acetat-Puffer gelöst und dann auf 25 ml mit Acetat-Puffer aufgefüllt.

3.2.1.4 Durchführung

Für die Auswertung der Messergebnisse anhand linearer Regression wird eine Kalibrationsgerade nach folgendem Verdünnungsschema erstellt:

Reagenzien	Standard 1 0,125 [mg/dl]	Standard 2 0,250 [mg/dl]	Standard 3 0,500 [mg/dl]	Standard 4 1,000 [mg/dl]	Standard 5 2,000 [mg/dl]
Arbeitsstandard [ml]	1,0 Std 2	1,0 Std 3	1,0 Std 4	1,0 Std 5	2,0
Aqua bidest. [ml]	1,0	1,0	1,0	1,0	-

Tabelle (3.2.2) Verdünnungsreihe der Standards von Vitamin C

Bei dieser Methode wurde ein durchschnittlicher Korrelationskoeffizient $R^2 = 0,9999$ erzielt.

Probenaufarbeitung

Um das Probenplasma zu gewinnen, wird das Vollblut bei 1000 U/min 15 Minuten lang zentrifugiert und das Plasma für die weitere Aufbereitung abpipettiert.

Die Probenansätze werden nach folgendem Pipettierschema erstellt:

Die Ansätze werden 5 Minuten lang bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert, um mit Hilfe der TCA-Lösung Proteine zu fällen und anschließend 10 Minuten lang bei 2000

Reagenzien [ml]	Leerwert	Standard	Probe
Aqua bidest.	0,5	-	-
Standard 1-5	-	0,5	-
Probenplasma	-	-	0,5
TCA-Lsg	1,0	1,0	1,0

Tabelle (3.2.3) Pipettierschema für die Testansätze von Vitamin C

U/min zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wird abgenommen und in das vorgelegte Farbragenz pipettiert.

Reagenzien [ml]	Leerwert	Standard	Probe
Farbreagenz	1,25	1,25	1,25
Plasmaüberstand	0,5	0,5	0,5

Tabelle (3.2.4) Fortsetzung: Pipettierschema für die Testansätze von Vitamin C

Nach erneuter Inkubation von einer Minute und Durchmischen am Vortexer, erfolgt die sofortige Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm.

3.2.1.5 Auswertung der Messergebnisse

Mittels der in Tabelle (3.2.2) ermittelten Kalibriergeraden mit bekannten Konzentrationen konnten die Ascorbinsäure-Konzentrationen der Proben in mg/dl direkt berechnet werden.

3.2.1.6 Qualität der Methode

Die Analysengenauigkeit wird durch Berechnung des Variationskoeffizienten anhand einer 10er-Bestimmung ermittelt - der Variationskoeffizient dieser Methode betrug: Inter-VK = 0,84 %.

Zur Sicherung einer konstanten Qualität wurden pro Blutaufbereitungstag einzelne Proben im Doppelansatz analysiert und daraus ein mittlerer Variationskoeffizient berechnet: Intra-VK = 1,15 %.

3.2.2 Bestimmung von Glutathion im Vollblut

3.2.2.1 Prinzip der Methode

Die Bestimmung von Glutathion im Vollblut erfolgt nach der von Beutler et al. (1963) erarbeiteten Methode. Dabei wird durch Hämolyse das Glutathion aus den Erythrozyten freigesetzt. Das Prinzip besteht in der Oxidation des Glutathions (GSSG) durch 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) und der Abspaltung der Sulfhydrylgruppe des reduzierten Glutathions (GSH), bei gleichzeitiger Reduktion der DTNB zur 2-Nitro-5-thio-benzoesäure (TNB), wodurch eine Farbreaktion erzeugt wird, welche bei einer Wellenlänge von 412 nm photometrisch gemessen werden kann. [Beutler et al., 1963]



Da der Gehalt dieses Farbkomplexes äquivalent zum Gehalt an Glutathion ist, lässt sich durch Miteinbeziehen des Hämatokritwertes die Menge an Glutathion in den Erythrozyten quantifizieren.

3.2.2.2 Materialien und Geräte

Die folgend aufgelisteten Reagenzien wurden für den Nachweis von Glutathion benötigt:

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
Aqua bidest.	-	-
5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB)	Sigma-Aldrich Chemicals	28545126
L-Glutathion (reduziert)	Sigma-Aldrich Chemicals	42515
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH	92652
Natriumcitrat	Sigma Aldrich Chemicals	180450
Natriumphosphat dibasich (wasserfrei)	Sigma Aldrich Chemicals	71640
meta-Phosphorsäure	Sigma-Aldrich Chemicals	04103
Natrium- EDTA	Riedel de Haën	31434

Tabelle (3.2.5) Reagenzien zum Nachweis von Glutathion

Folgende Geräte wurden bei dieser Methode verwendet:

- Hitachi U-1100 Spectrophotometer (UV/VIS) und Kunststoff-Makroküvetten VWR International GmbH
- Präzisionswaage und pH-Meter
- Vortex Heidolph REAX 2000
- Ultraschallbad Brandelin Sonorex und Magnetrührer
- Faltenfilter Rotilabo, Glastrichter, Kolbenhubpipetten diverser Voluminer, Pasteurpipetten, diverse Glasmaterialien

3.2.2.3 Gebrauchslösungen

- Phosphatlösung [0,3mol/l]: es werden 42,588 g Dinatriumhydrogenphosphat mit aqua bidest. auf 1000ml aufgefüllt.
(diese Lösung ist 3-6 Monate bei Raumtemperatur haltbar)
- Fällungslösung: es werden zuerst 300g Natriumchlorid in einen 1000ml Messkolben überführt und mit aqua bidest. bedeckt; währenddessen werden 2 g Natrium-EDTA in ca. 100 ml aqua bidest. auf dem Magnetrührer gelöst; die beiden Lösungen werden dann vereint und mit aqua bidest. bis 1000 ml aufgefüllt.
(diese Lösung ist 3-6 Monate bei Raumtemperatur haltbar)

Der L-Glutathion-Arbeitsstandard und das Farbreagenz sind am jeweiligen Untersuchungstag immer frisch herzustellen.

- L-Glutathion-Arbeitsstandard [60 mg/dl]: es werden 15 mg L-Glutathion (reduziert) in 25ml aqua bidest. gelöst.
- Farbreagenz: es werden 10 mg DTNB + 250 mg Natriumcitrat in 25ml aqua bidest. aufgelöst.

3.2.2.4 Durchführung

Für die Auswertung der Messergebnisse anhand linearer Regression wird eine Kalibrationsgerade nach folgendem Verdünnungsschema erstellt:

Reagenzien	Standard 1 3,75 [mg/dl]	Standard 2 7,50 [mg/dl]	Standard 3 15,00 [mg/dl]	Standard 4 30,00 [mg/dl]	Standard 5 60,00 [mg/dl]
Arbeitsstandard [ml]	1,0 Std 2	1,0 Std 3	1,0 Std 4	1,0 Std 5	2,0
Aqua bidest. [ml]	1,0	1,0	1,0	1,0	-

Tabelle (3.2.6) Verdünnungsreihe der Standards von Glutathion

Bei dieser Methode wurde ein durchschnittlicher Korrelationskoeffizient $R^2 = 0,9999$ erzielt.

Probenaufarbeitung

Da die GSH-Konzentration direkt im Vollblut der Probanden photometrisch ermittelt wird, ist keine Aufbereitung der Proben erforderlich.

Die Probenansätze werden nach vorsichtigem Durchmischen der Proben nach folgendem Pipettierschema erstellt:

Reagenzien [ml]	Leerwert	Standard	Probe
Aqua bidest.	2,0	1,8	1,8
Standard 1-5	-	0,2	-
Vollblut	-	-	0,2
Fällungs-Lsg	3,0	3,0	3,0

Tabelle (3.2.7) Pipettierschema für die Testansätze von Glutathion

Die Ansätze werden 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend über Trichter und Faltenfilter filtriert. Aus diesem Filtrat wird nun je 1 ml entnommen und folgende Reagenzien werden hinzugegeben.

Reagenzien [ml]	Leerwert	Standard	Probe
Filtrat	1,0	1,0	1,0
Phosphat-Lsg	4,0	4,0	4,0
Farbreagenz	0,5	0,5	0,5

Tabelle (3.2.8) Fortsetzung: Pipettierschema für die Testansätze von Glutathion

Nach intensivem Durchmischen der Ansätze am Vortex erfolgt die sofortige Messung photometrisch bei einer Wellenlänge von 412 nm.

3.2.2.5 Auswertung der Messergebnisse

Mittels der in Tabelle (3.2.6) ermittelten Kalibriergeraden mit bekannten Konzentrationen können die L-Glutathion-Konzentrationen der Proben in mg/dl Vollblut direkt berechnet werden. Um die GSH- Konzentration in den Erythrozyten in mg/dl zu erhalten, muss anschließend der jeweilige Hämatokritwert miteinbezogen werden. Dies kann man mit Hilfe folgender Formel berechnen:

$$GSH_{Erythrozyten}[mg/dl] = \frac{GSH_{Vollblut}[mg/dl] * 100}{Haematokrit[\%]}$$

3.2.2.6 Qualität der Methode

Die Analysengenauigkeit wird durch Berechnung des Variationskoeffizienten anhand einer 10er-Bestimmung ermittelt - der Variationskoeffizient dieser Methode betrug:

Inter-VK = 2,46 %.

Zur Sicherung einer konstanten Qualität wurden pro Blutaufbereitungstag einzelne Proben im Doppelansatz analysiert und daraus ein mittlerer Variationskoeffizient berechnet:

Intra-VK = 0,96 %.

3.3 High Performance Liquid Chromatography HPLC

Alle im Zuge dieser Studie anhand der Flüssigkeitschromatographie untersuchten Parameter wurden mittels Reversed Phase-HPLC bestimmt. Die Funktionsweise dieses Verfahrens beruht auf der Verwendung einer polaren mobilen und einer unpolaren stationären Phase, sodass die Eluenten in der mobilen Phase löslich sind und Wechselwirkungen mit der stationären Phase eingehen können und dadurch verschiedene Retentionszeiten erzielt werden.

3.3.1 Bestimmung von Vitamin A, Vitamin E und Carotinoiden im Blutplasma

3.3.1.1 Prinzip der Methode

Modifiziert nach der Methode von Jakob & Elmadfa, 1995 erfolgt die Bestimmung von Vitamin A (Retinol) und Vitamin E (α -Tocopherol und γ -Tocopherol) mittels Reversed Phase-HPLC mit nachfolgender UV-Detektion. Der quantitative Nachweis der Carotinoide (Lutein, Cryptoxanthin, Lycopin, α -Carotin und β -Carotin) wird mittels Reversed Phase-HPLC und anschließender Fluoreszenz-Detektion durchgeführt.

Beide Methoden beruhen auf der chromatographischen Auftrennung der einzelnen Parameter auf Grund ihrer unterschiedlichen Polarität [Jakob und Elmadfa, 1995].

3.3.1.2 Materialien und Geräte

Die folgend aufgelisteten Reagenzien wurden bei dieser Methode verwendet:

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
Aqua bidest.	-	-
Ammoniumacetat	Merck KGaA	-
Ethanol (96%) p.a.	Merck KGaA	438122583748
Hexan	Merck KGaA	40020191913
Acetonitril für HPLC	Merck KGaA	1415130807
Dichlormethan für HPLC	Merck KGaA	602004003
Methanol chromasolv für HPLC	Merck KGaA	60300100X
Referenzlösung β -Carotin	Chromosystems Instruments	0026/0027

Referenzlösung Retinol + α -Tocopherol	Chemicals GmbH Immundiagnostik AG	KC 1600KO
--	--------------------------------------	-----------

Tabelle (3.3.1) Reagenzien zum Nachweis von Vitamin A, Vitamin E und Carotinoiden im Plasma

Folgende Geräte wurden für die Bestimmung von Vitamin A, Vitamin E und Carotinoiden verwendet:

- Braunglaseprouvetten mit Glasstopfen
- Mischrad, Stuart Scientific
- Vortex-Rüttler, KA Labortechnik, KS 125 basic
- Zentrifuge, Heraeus Megafuge 40, Thermo Scientific
- Wasserbad, GFL
- HPLC: LaChrom Merck Hitachi
 - Säule: LiChrospher 100, RP-18 (5 μ m), Merck
 - Autosampler L-7250, Hitachi
 - Pumpe L-7100, Hitachi
 - Säuleöfen L-7300, Hitachi
 - Interface D-7000, Hitachi
 - UV-Detektor L-7400, Hitachi und Fluoreszenzdetektor F1050
 - Software: EZChrom Elite, Version 3.2

3.3.1.3 HPLC: Geräteeinstellungen

Mobile Phase:	72% Acetonitril (A) (250 mg Ammoniumacetat in 10 ml Aqua bidest. auflösen und in 1L Acetonitril mischen) 10% Methanol (B) 18% Dichlormethan (C)
Injektionsvolumen:	100 μ l
Flow:	0,8 bzw. 1,4 ml/min
Säulentemperatur:	20°C
Wellenlänge:	UV-Detektor Retinol: 325 nm, Carotinoide: 450 nm Fluoreszenzdetektor Tocopherole: Excitationswellenlänge (Ex) 295 nm Emissionswellenlänge (Em) 330 nm
Laufzeit pro Plasmaprobe:	25 min

Zeit t [min]	Laufmittelzusammensetzung	Flow [ml/min]
0	A: 72% B: 10% C: 18%	0,8
10	A: 72% B: 10% C: 18%	0,8
11	A: 72% B: 10% C: 18%	1,4
24	A: 72% B: 10% C: 18%	1,4
25	A: 72% B: 10% C: 18%	0,8

Tabelle (3.3.2) Laufmittelzusammensetzung und Flussrate (Flow) pro Zeiteinheit für die Analysen von Vitamin A, Vitamin E und den Carotinoiden im Plasma (A: Acetonitril, B: Methanol, C: Dichlormethan)

3.3.1.4 Durchführung

Nach Auftauen des Heparin-Plasmas werden in Braunglaseprouvetten 1000 μ l der Probe mit 1 ml Ethanol zur Fällung der Proteine, sowie 100 μ l Ethyl-Apo-Carotinat & Tocol als Interner Standard versetzt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 5 ml Hexan und das

Vortexen der verschlossenen Eprouvetten für ungefähr drei Minuten. Danach werden die Probenansätze 30 Minuten am Mischrad gemischt und schließlich drei Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert, sodass die gefällten Bestandteile sedimentieren und die Hexanphase mit den gelösten fettlöslichen Bestandteilen einen Überstand bildet.

Für die Analyse von Vitamin A, Vitamin E und der ausgewählten Carotinoide werden nun 500 μl dieses Überstandes abpipettiert und im Wasserbad bei rund 40 °C unter Stickstoffbegasung bis zur Trockene abgedampft.

Der Rückstand wird für die Analyse in 200 μl mobiler Phase (Zusammensetzung wie zum Zeitpunkt $t=0$, siehe Tabelle 3.3.2) resuspendiert.

Es werden 170 μl der gut gevortexten Resuspension in ein Vial mit Inlett pipettiert und mit Hilfe der RP-HPLC analysiert. Dabei wurden die Carotinoide bei einem Extinktionsmaximum von 450 nm und Vitamin A bei 325 nm detektiert.

Die chromatographische Auftrennung der Tocopherole (Ex: 295 nm und Em: 330 nm) wurde mittels Fluoreszenz-Detektor ermittelt.

3.3.1.4.1 Chromatogramme

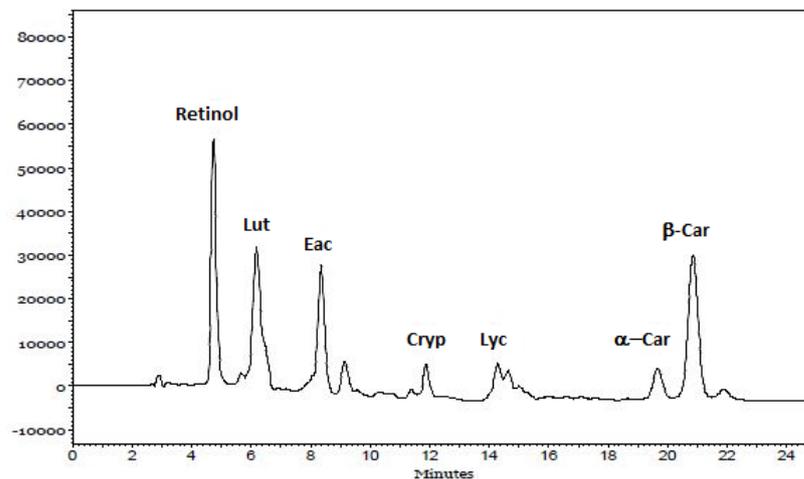


Abbildung (8) Chromatogramm von Retinol, Lutein, Ethyl-Apo-Carotinat, β -Cryptoxanthin, Lycopin, α -Carotin und β -Carotin

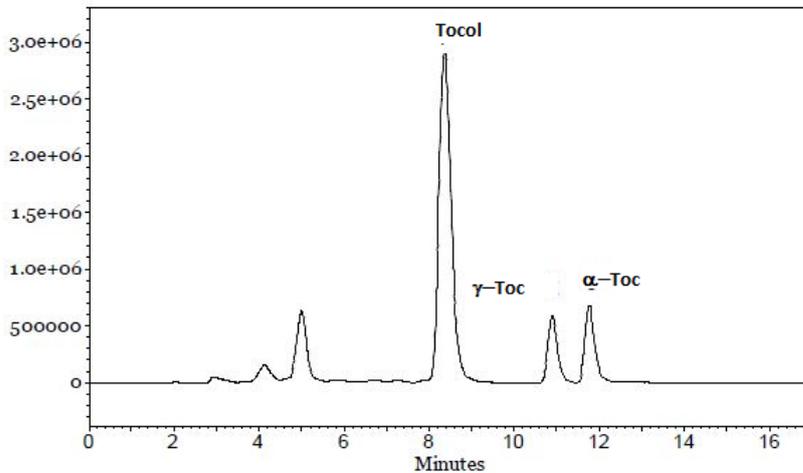


Abbildung (9) Chromatogramm von Tocol, γ -Tocopherol (γ -Toc) und α -Tocopherol (α -Toc)

3.3.1.5 Auswertung der Messergebnisse

Anhand der ermittelten Kalibriergeraden für jeden der ausgewählten Parameter (Retinol, Lutein, Cryptoxanthin, Lycopin, α - Carotin, β - Carotin; α - Tocopherol und γ - Tocopherol) durch je 4 Einzelstandards mit bekannter Konzentration erfolgte die Auswertung mittels linearer Regression. Ein Verdünnungsfaktor von zwei, welcher sich durch die Probenaufbereitung ergab, wurde in den Berechnungen mitberücksichtigt.

Die so erhaltenen Konzentrationen in ng/ml wurden anschließend in $\mu\text{mol/l}$ umgerechnet.

Parameter	Standard 1 [ng/ml]	Standard 2 [ng/ml]	Standard 3 [ng/ml]	Standard 4 [ng/ml]	R^2
Retinol	400	300	200	100	0,9986
Lutein	266,7	200	133,3	66,7	0,9982
Cryptoxanthin	266,7	133,3	100	66,7	0,9991
Lycopin	266,7	133,3	100	66,7	0,9994
α - Carotin	160	80	40	-	0,9999
β - Carotin	266,7	133,3	100	66,7	0,9998
α - Tocopherol	8000	6000	4000	2000	0,9983

γ - Tocopherol	2666,7	2000	1333,3	666,7	0,9994
-----------------------	--------	------	--------	-------	--------

Tabelle (3.3.3) Standardkonzentrationen (ng/ml) der Kalibriergeraden für Vitamin A, Vitamin E und die Carotinoide

3.3.1.6 Qualität der Methode

Die Analysengenauigkeit wird durch Berechnung des Variationskoeffizienten anhand einer 10er-Bestimmung ermittelt - der Variationskoeffizient dieser Methode wird als Inter-VK bezeichnet.

Zur Sicherung einer konstanten Qualität wurde an jedem Analysetag eine Kontrollprobe im Doppelansatz analysiert und daraus ein mittlerer Variationskoeffizient berechnet, der sogenannte Intra-VK.

Beide Werte sind für alle ausgewählten Parameter in folgender Tabelle als Gesamtübersicht aufgelistet:

Parameter	Inter-VK [%]	Intra-VK [%]
Retinol	1,94	2,50
Lutein	2,65	5,65
β -Cryptoxanthin	4,30	4,83
Lycopin	7,53	8,56
α - Carotin	6,46	8,18
β - Carotin	5,43	5,51
α - Tocopherol	2,84	7,47
γ - Tocopherol	4,13	7,16

Tabelle (3.3.4) Intra- und Inter-VK [%] der Analyse von Vitamin A, Vitamin E und die Carotinoide im Plasma

3.3.2 Bestimmung von Ubichinon 50 im Blutplasma

3.3.2.1 Prinzip der Methode

Die Bestimmung von Ubichinon 50 (Coenzym Q10) erfolgt mittels Reversed Phase-HPLC mit nachfolgender UV-Detektion.

3.3.2.2 Materialien und Geräte

Die folgend aufgelisteten Reagenzien wurden für die Bestimmung von Ubichinon 50 verwendet:

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
Aqua bidest.	-	-
Ammoniumacetat	Merck KGaA	
Ethanol (96%) p.a.	Merck KGaA	438122583748
Hexan	Merck KGaA	40020191913
Acetonitril für HPLC	Merck KGaA	1415130807
Dichlormethan für HPLC	Merck KGaA	602004003
Methanol chromasolv für HPLC	Merck KGaA	60300100X
Referenzlösung Coenzyme Q10	Chromosystems Instruments & Chemicals GmbH	0092/0093

Tabelle (3.3.5) Reagenzien zum Nachweis von Ubichinon 50 im Plasma

Folgende Geräte wurden bei dieser Methode verwendet:

- Braunglaseprouvetten mit Glasstopfen
- Mischrad, Stuart Scientific
- Vortex-Rüttler, KA Labortechnik, KS 125 basic
- Zentrifuge, Heraeus Megafuge 40, Thermo Scientific
- Wasserbad, GFL
- HPLC: LaChrom Merck Hitachi
 - Säule: LiChrospher 100, RP-18 (5 μ m), Merck

- Autosampler L-7250, Hitachi
- Pumpe L-7100, Hitachi
- Säuleöfen L-7300, Hitachi
- Interface D-7000, Hitachi
- Uv-Detektor L-7400, Hitachi
- Software: EZChrom Elite, Version 3.2

3.3.2.3 HPLC: Geräteeinstellungen

Mobile Phase:	20% Acetonitril (A) (250 mg Ammoniumacetat in 10 ml Aqua bidest. auflösen und in 1L Acetonitril mischen) 40% Methanol (B) 40% Dichlormethan (C)
Injektionsvolumen:	100 μ l
Flow:	1,0 ml/min
Säulentemperatur:	20°C
Wellenlänge:	UV-Detektor Ubichinon 50: 275nm
Laufzeit pro Plasmaprobe:	8 min

Zeit [min]	Laufmittelzusammensetzung	Flow [ml/min]
0-8	A: 20% B: 40% C: 40%	1,0

Tabelle (3.3.6) Laufmittelzusammensetzung und Flussrate (Flow) pro Zeiteinheit für die Analyse von Ubichinon 50 im Plasma (A: Acetonitril, B: Methanol, C: Dichlormethan)

3.3.2.4 Durchführung

Nach Auftauen des Heparin-Plasmas werden in Braunglaseprouvetten 1000 μ l der Probe mit 1 ml Ethanol zur Fällung der Proteine versetzt. Anschließend erfolgt die Zugabe von 5 ml Hexan und das Vortexen der verschlossenen Eprouvetten für ungefähr drei Minuten.

Danach werden die Probenansätze 30 Minuten am Mischrader gemischt und schließlich drei Minuten lang bei 3000 U/min zentrifugiert, sodass die gefällten Bestandteile sedimentieren und die Hexanphase mit den gelösten fettlöslichen Bestandteilen einen Überstand bildet.

Für die Analyse von Ubichinon 50 werden nun 500 μl dieses Überstandes abpipettiert und im Wasserbad bei rund 40 °C unter Stickstoffbegasung bis zur Trockene abgedampft. Der Rückstand wird für die Analyse in 200 μl mobiler Phase resuspendiert.

3.3.2.5 Chromatographische Auftrennung

Es werden 170 μl der gut gevortexten Resuspension in ein Vial mit Inlett pipettiert und mit Hilfe der RP-HPLC analysiert. Dabei wird Ubichinon 50 bei einem Extinktionsmaximum von 275 nm absorbiert und detektiert.

3.3.2.5.1 Chromatogramm

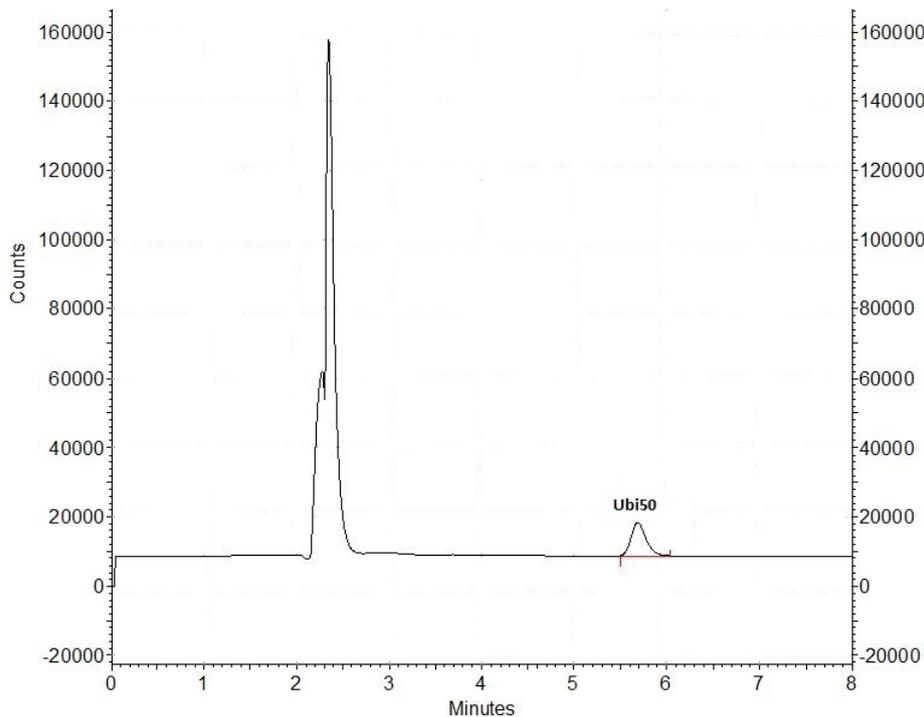


Abbildung (10) Chromatogramm von Ubichinon 50 (Ubi50) im Plasma

3.3.2.6 Auswertung der Messergebnisse

Anhand der ermittelten Kalibriergeraden für diesen Parameter durch je 5 Einzelstandards mit bekannter Konzentration erfolgte die Auswertung mittels linearer Regression. Ein Verdünnungsfaktor von zwei, welcher sich durch die Probenaufbereitung ergab, wurde in den Berechnungen mitberücksichtigt.

Die so erhaltenen Konzentrationen in ng/ml wurden anschließend in $\mu\text{mol/l}$ umgerechnet.

Parameter	Standard 1 [$\mu\text{g/ml}$]	Standard 2 [$\mu\text{g/ml}$]	Standard 3 [$\mu\text{g/ml}$]	Standard 4 [$\mu\text{g/ml}$]	Standard 5 [$\mu\text{g/ml}$]
Ubichinon 50	100	200	300	400	500

Tabelle (3.3.7) Standardkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) der Kalibriergeraden für Ubichinon 50

Bei dieser Methode wurde ein durchschnittlicher Korrelationskoeffizient von $R^2 = 0,9999$ erzielt.

3.3.2.7 Qualität der Methode

Die Analysengenauigkeit wird durch Berechnung des Variationskoeffizienten anhand einer 10er-Bestimmung ermittelt - der Variationskoeffizient dieser Methode betrug:

Inter-VK = 3,70 %.

Zur Sicherung einer konstanten Qualität wurde an jedem Analysetag eine Kontrollprobe im Doppelansatz analysiert und daraus ein mittlerer Variationskoeffizient berechnet:

Intra-VK = 8,34 %.

3.3.3 Bestimmung von Vitamin K₁ im Blutplasma

3.3.3.1 Prinzip der Methode

Die Bestimmung von Vitamin K₁ (Phyllochinon) wurde ebenso mit einer Reversed-Phase HPLC mit einer C-18 Säule durchgeführt.

Um die Detektion dieses Parameters so vollständig, wie möglich durchzuführen, wurde eine nachgeschaltete Zinksäule eingesetzt, um Naphtochinone zu Hydrochinonen zu re-

duzieren, sodass alle Substanzen anschließend mit einem Fluoreszenzdetektor bestimmt werden können (modifiziert nach Jakob & Elmadfa, 1995).

3.3.3.2 Materialien und Geräte

Die folgend aufgelisteten Reagenzien wurden für die Bestimmung von Phyllochinon verwendet:

Reagenzien	Hersteller	Artikelnummer
Aqua bidest.	-	-
Ethanol (96%) p.a.	Merck	438122583748
Essigsäure (99,8%)	Fluka Analytical	60320
Hexan	Merck KGaA	40020191913
Natriumacetat (wasserfrei)	Sigma-Aldrich Chemicals	0001442913
Phyllochinon	Merck KGaA	-
2',3'-Dihydrophyllochinon	Hoffmann La Roche	-
Zinkpulver (Partikelgröße <math><45\mu\text{m}</math>)	Merck KGaA	-
Dichlormethan für HPLC	Merck KGaA	602004003
Methanol chromasolv für HPLC	Merck KGaA	60300100X
Zinkchlorid für HPLC	Riedel-de Haën	-
Referenzlösung Vitamin K ₁	Immundiagnostik AG	KC2400KO

Tabelle (3.3.8) Reagenzien zum Nachweis von Phyllochinon im Plasma

Folgende Geräte wurden bei dieser Methode verwendet:

- Braunglaseprouvetten mit Glasstopfen
- Mischrad, Stuart Scientific
- Vortex-Rüttler, KA Labortechnik, KS 125 basic
- Zentrifuge, Heraeus Megafuge 40, Thermo Scientific
- Wasserbad, GFL
- HPLC: LaChrom Merck Hitachi

- Säule: ODS-Hypersil, 5 μm , 250 mm x 4,6 mm i. D. Shandon
- Vorsäule: ODS-Hypersil, 5 μm , 20 mm x 4,6 mm i. D. Shandon
- Reduktionssäule:
Edelstahlkartusche mit Zinkpulver stopfen; an jedem Ende mit einem Edeltstahlsieb, drei Glasfaserfiltern, einem Edeltstahlsieb, einer Kunststoffdichtung und einem Abschlussstopfen abdichten;
- Autosampler Ultimate 3000, Doinex
- Pumpe L-2130, Hitachi
- Säuleöfen Ultimate 3000, Dionex
- Interface D-7000, Hitachi
- Fluoreszenzdetektor RF 2000, Dionex
- Software: Chromeleon Dionex, Verion 6.80 SR10 Build 2818

3.3.3.3 HPLC: Geräteeinstellungen

Mobile Phase:	90% Methanol (A)
	9,5% Dichlormethan (B)
	0,5% Zinkchlorid (C)
Injektionsvolumen:	100 μl
Flow:	1,0 ml/min
Säulentemperatur:	20°C
Wellenlänge:	Fluoreszenzdetektor
	Phyllochinon: Excitationswellenlänge (Ex) 243 nm
	Emissionswellenlänge (Em) 430 nm
Laufzeit pro Plasmaprobe:	12 min

3.3.3.4 Gebrauchslösungen

- Methanolische Zinkchlorid-Lösung: es werden 27,3 g Zinkchlorid + 8,2 g Natriumacetat + 6 g Essigsäure mit Methanol auf 100 ml aufgefüllt.
(diese Lösung ist bis zum Verbrauch bei 4-8°C (im Kühlschrank) haltbar)

Zeit [min]	Laufmittelzusammensetzung	Flow [ml/min]
0-12	A: 90% B: 9,5% C: 0,5%	1,0

Tabelle (3.3.9) Laufmittelzusammensetzung und Flussrate (Flow) pro Zeiteinheit für die Analyse von Phyllochinon im Plasma (A: Methanol, B: Dichlormethan, C: Zinkchlorid)

3.3.3.5 Durchführung

Die Vorbereitung der Probenansätze für die Bestimmung von Vitamin K₁ erfolgte im Zuge der Aufbereitung von Vitamin A, Vitamin E und der Carotinoide, sowie von Ubichinon 50 (siehe 3.3.1.4/ 3.3.2.4).

Vor der Zugabe von 5 ml Hexan werden jedoch 100 µl 2',3'-Dihydrophyllochinon-Lösung als interner Standard zu den vorbereiteten Plasmaproben hinzugefügt.

Für die Analyse von Phyllochinin werden nun 3800 µl des übrig gebliebenen Extraktes abpipettiert und im Wasserbad bei rund 40 °C unter Stickstoffbegasung bis zur Trockene abgedampft.

Der Rückstand wird für die Analyse in 200 µl mobiler Phase resuspendiert.

3.3.3.6 Chromatographische Auftrennung

Es werden 150 µl der gut gevortexten Resuspension in ein Vial mit Inlett pipettiert und analysiert. Die Detektion von Phyllochinon (Ex: 243 nm und Em: 430 nm) erfolgt mittels Fluoreszenz-Detektor.

3.3.3.6.1 Chromatogramm

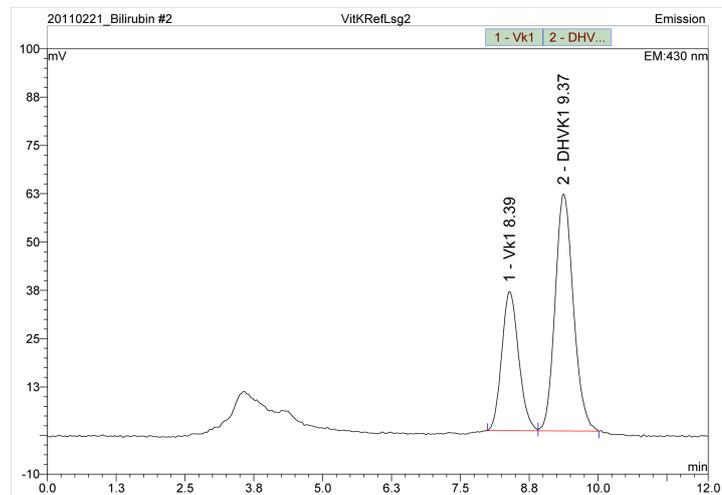


Abbildung (11) Chromatogramm von α -Phyllochinon (1-Vk1) und 2',3'-Dihydrophyllochinon (2-DHVK1) im Plasma

3.3.3.7 Auswertung der Messergebnisse

Für die Auswertung der Messergebnisse mit Hilfe der internen Standardmethode wird eine Kalibrationsgerade anhand 5 Phyllochinon-Einzelstandards mit bekannter Konzentration erstellt. Diesen Standards wurde 2',3'-Dihydrophyllochinon, ebenfalls mit bekannter Konzentration, als interner Standard hinzugefügt. Die Quantifizierung der im Blutplasma enthaltenen Vitamin K₁-Konzentrationen erfolgte mittels des Peakflächenverhältnisses zwischen Phyllochinon und 2',3'-Dihydrophyllochinon.

Ein Verdünnungsfaktor von zwei, welcher sich durch die Probenaufbereitung ergab, wurde in den Berechnungen mitberücksichtigt.

Die so erhaltenen Konzentrationen in ng/ml wurden anschließend in $\mu\text{mol/l}$ umgerechnet.

	α -Phyllochinon [ng/ml mobile Phase]	2',3'-Dihydrophyllochinon [ng/ml mobile Phase]
Standard 1	2	10
Standard 2	5	10
Standard 3	10	10

Standard 4	15	10
Standard 5	20	10

Tabelle (3.3.10) Phyllochinon-Standardkonzentration und 2',3'-Dihydrophyllochinon
[ng/ml mobile Phase]

3.3.3.8 Qualität der Methode

Die Analysengenauigkeit wird durch Berechnung des Variationskoeffizienten anhand einer 10er-Bestimmung ermittelt - der Variationskoeffizient dieser Methode betrug:

Inter-VK = 6,25 %.

Zur Sicherung einer konstanten Qualität wurde an jedem Analysetag eine Kontrollprobe im Doppelansatz analysiert und daraus ein mittlerer Variationskoeffizient berechnet:

Intra-VK = 6,87 %.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm SPSS Statistics Version 17.0 für Microsoft Windows 7 Home Premium durchgeführt.

Es wurden Ausreißer bereinigt und es folgte die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest.

Zum Vergleich etwaiger Unterschiede zwischen Betroffenen (Gilbert's Syndrom)/Nicht-Betroffenen (Kontrolle), Männern/Frauen oder der Unterschied zwischen zwei Altersgruppen wurde im Falle einer Normalverteilung der Daten der T-Test für zwei unabhängige Stichproben angewandt. Bei nicht normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney -U-Test für zwei unabhängige Stichproben zur Berechnung möglicher signifikanter Unterschiede verwendet.

Der Vergleich von mehr als zwei Gruppen (Vergleich einzelner Altersgruppen, Bilirubin-konzentration in 4 Kategorien) erfolgte anhand der einfaktoriellen ANOVA. Gesetzt dem Fall, dass die Daten nicht normalverteilt waren beziehungsweise ihre Varianzenhomogenität nicht gegeben war, wurde der Kruskal-Wallis-H-Test verwendet. Bei signifikantem

Ergebnis der ANOVA wurde, um aufzuzeigen welche Gruppen untereinander signifikant sind, bei Daten mit gleicher Varianz als post-hoc Test der Bonferroni-Test verwendet. War die Varianzhomogenität nicht gegeben, wurde der Games Howel-Test herangezogen. Zusätzlich wurde, um bisweilen unbedachte Zusammenhänge aufzudecken, die Korrelation nach Pearson im Falle der Normalverteilung der Werte oder nach Spearman bei nicht-normalverteilten Variablen angewandt.

Signifikanzniveaus:

- # P = 0,05–0,1 Tendenz
- * P <0,05 signifikant
- ** P <0,01 hoch signifikant

4 Ergebnisse und deren Diskussion

In diesem Abschnitt dieser Arbeit werden die erhaltenen Ergebnisse veranschaulicht und anschließend diskutiert. Im Text und in den Tabellen wird jeweils die durchschnittliche Plasmakonzentration (arithmetischer Mittelwert) des jeweiligen Parameters, wenn nicht anders angegeben, verwendet.

Die Angabe der Plasmakonzentrationen der einzelnen Parameter erfolgt in $\mu\text{mol/L}$, wobei die Werte für Vitamin K₁ in nmol/L und für Glutathion in mmol/L angegeben sind.

Einen allgemeinen Überblick der durchschnittlich erhaltenen Konzentrationen im Plasma (Mittelwert \pm Standardabweichung) der einzelnen Parameter gibt die Tabelle 4.1.1.

Prinzipiell konnten für die Bilirubin-Studie insgesamt 100 Teilnehmer rekrutiert, ihr Blut abgenommen sowie analysiert werden (siehe Kapitel 3.1). In die endgültige Auswertung wurden schließlich die Werte von 76 Teilnehmern, die alters- und geschlechtsge-
matched sind, miteinbezogen. Der Ausschluss aus der Studienpopulation der übrigen 24 Studienteilnehmer erfolgte zum Einen aufgrund nicht eindeutig zuordenbarer UCB-Konzentrationen und zum Anderen wurde insbesondere darauf geachtet, dass die Fall-beziehungsweise Kontrollgruppe auch in anderen Merkmalen, etwa Geschlecht und Alter übereinstimmen und somit vergleichbar sind.

4.1 Allgemeine Daten

Im Hinblick auf die Konzentration an unkonjugiertem Bilirubin (UCB) konnte, wie erwartet, zwischen den beiden Gruppen Gilbert's Syndrom und Kontrolle ein höchst signifikanter Unterschied ($P = 0,000$) gemessen werden (Mittelwerte: $31,96 \pm 13,64$ und $10,27 \pm 3,31 \mu\text{mol UCB /L Plasma}$).

Folgende Tabelle gibt einen Überblick der durchschnittlichen Konzentration der analysierten Parameter des Studienkollektives, sowie nach Fall- und Kontrollgruppe aufgeteilt:

	Retinol [$\mu\text{mol/L}$]	Lutein [$\mu\text{mol/L}$]	β -Cryptoxanthin [$\mu\text{mol/L}$]	Lycopin [$\mu\text{mol/L}$]	α -Carotin [$\mu\text{mol/L}$]	β -Carotin [$\mu\text{mol/L}$]
Studienkollektiv						
MW \pm sd	3,95 \pm 1,68	0,34 \pm 0,24	0,19 \pm 0,14	0,26 \pm 0,14	0,21 \pm 0,16	0,63 \pm 0,98
Gilbert's Syndrom						
MW \pm sd	3,91 \pm 1,71	0,29 \pm 0,15	0,20 \pm 0,14	0,24 \pm 0,14	0,20 \pm 0,14	0,61 \pm 0,44
Kontrolle						
MW \pm sd	3,94 \pm 1,54	0,30 \pm 0,17	0,18 \pm 0,11	0,28 \pm 0,15	0,19 \pm 0,11	0,58 \pm 0,41
	α -Tocopherol [$\mu\text{mol/L}$]	γ -Tocopherol [$\mu\text{mol/L}$]	Vitamin K ₁ [nmol/L]	Ubichinon 50 [$\mu\text{mol/L}$]	Vitamin C [$\mu\text{mol/L}$]	Glutathion [mmol/L]
Studienpopulation						
MW \pm sd	32,24 \pm 8,74	1,42 \pm 0,63	0,44 \pm 0,64	0,61 \pm 0,29	71,87 \pm 11,40	2,38 \pm 0,34
Gilbert's Syndrom						
MW \pm sd	30,64 \pm 9,23	1,46 \pm 0,62	0,32 \pm 0,23	0,59 \pm 0,33	71,61 \pm 13,31	2,34 \pm 0,36
Kontrolle						
MW \pm sd	33,64 \pm 7,57	1,59 \pm 0,94	0,47 \pm 0,70	0,64 \pm 0,28	73,29 \pm 12,48	2,42 \pm 0,29

Tabelle (4.1.1) Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm sd) der analysierten Parameter der gesamten Studienpopulation sowie der Fallgruppe (Gilbert's Syndrom) im Vergleich zur Kontrollgruppe

4.2 Vitamin A und Carotinoide

4.2.1 Retinol

Retinolkonzentration der Studienteilnehmer

Die Retinol-Konzentration der gesamten Studienpopulation betrug durchschnittlich $3,95 \pm 1,68 \mu\text{mol/L}$ und bewegte sich in einem Bereich von 0,90 bis maximal $8,44 \mu\text{mol/L}$.

Retinolkonzentration Gilbert's Syndrom und Kontrolle

Nach Aufteilung der einzelnen Probanden in jene mit Gilbert's Syndrom und jene mit physiologischen Bilirubin-Konzentrationen ergaben sich mittlere Plasmawerte in der Fallgruppe von $3,91 \pm 1,71 \mu\text{mol/L}$ sowie $3,95 \pm 1,54 \mu\text{mol/L}$ in der Kontrollgruppe (siehe Tabelle 4.1.1). Obwohl die Personen der Kontrollgruppe leicht höhere Plasmawerte aufwiesen, konnte dieser Unterschied nicht als signifikant gewertet werden ($P = 0,337$).

UCB-Konzentration	MW \pm sd [$\mu\text{mol/L}$]	Minimum [$\mu\text{mol/L}$]	Maximum [$\mu\text{mol/L}$]
<10 $\mu\text{mol/L}$	$3,91 \pm 1,84$	1,50	8,44
10–17,1 $\mu\text{mol/L}$	$3,92 \pm 1,31$	1,50	6,97
17,2–36 $\mu\text{mol/L}$	$3,78 \pm 1,75$	0,90	7,18
>36 $\mu\text{mol/L}$	$4,18 \pm 1,73$	2,66	7,74

Tabelle (4.2.1) Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm sd), minimale und maximale Konzentration für Retinol in Abhängigkeit von der Konzentration an UCB

Werden die Probanden weiter, nämlich in vier Bilirubin-Kategorien (<10 $\mu\text{mol/L}$, 10–17,1 $\mu\text{mol/L}$, 17,2–36 $\mu\text{mol/L}$, >36 $\mu\text{mol/L}$) aufgeteilt, kann man erkennen, dass die ersten beiden Gruppen mit im Mittel $3,91 \pm 1,84$ und $3,92 \pm 1,31 \mu\text{mol/L}$ in etwa gleich hohe Plasmalevel an Retinol aufweisen. Probanden mit einer UCB-Konzentration von 17,2–36 $\mu\text{mol/L}$ zeigen die niedrigsten Retinolwerte, wohingegen jene Gruppe mit der höchsten Bilirubin-Konzentration auch durchschnittlich die höchste Retinolkonzentration im Blut zeigen (siehe Tabelle 4.2.1). Diese Unterschiede weisen jedoch keine Signifikanz

auf.

Betrachtet man den Retinolstatus der Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe zusätzlich im Abhängigkeit vom Alter lassen sich vier unterschiedliche Gruppen bilden: GS <30 Jahre, Kontrolle <30 Jahre, GS >30 Jahre und Kontrolle >30 Jahre.

Beim Vergleich dieser Gruppen untereinander kann jedoch kein signifikanter Unterschied in ihrem Plasmagehalt an Retinol festgestellt werden. Ungeachtet dessen sollte hier erwähnt werden, dass jene Personen über 30 Jahren mit Gilbert's Syndrom den höchsten mittleren Wert aufweisen (siehe Abbildung 12).

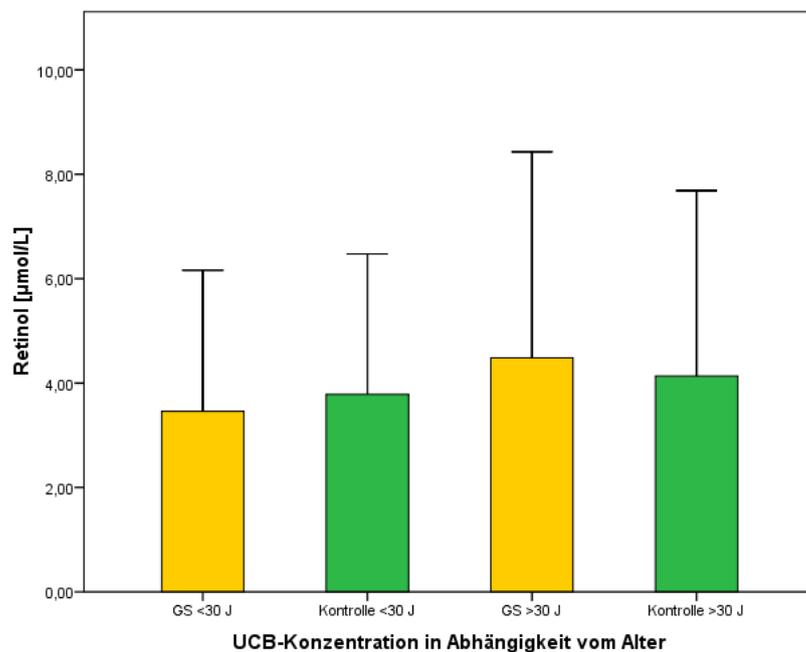


Abbildung (12) Durchschnittliche Retinolkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB

Retinolkonzentration Frauen und Männer

Desgleichen konnte bei Frauen mit einer durchschnittlichen Konzentration an Retinol von $4,25 \pm 1,86 \mu\text{mol/L}$ im Vergleich zu Männern mit $3,80 \pm 1,51 \mu\text{mol/L}$ kein signifikanter Unterschied in ihrem durchschnittlichem Vitamin A-Status gemessen werden, obwohl Frauen im Mittel einen höheren Wert aufweisen (siehe Abbildung 13).

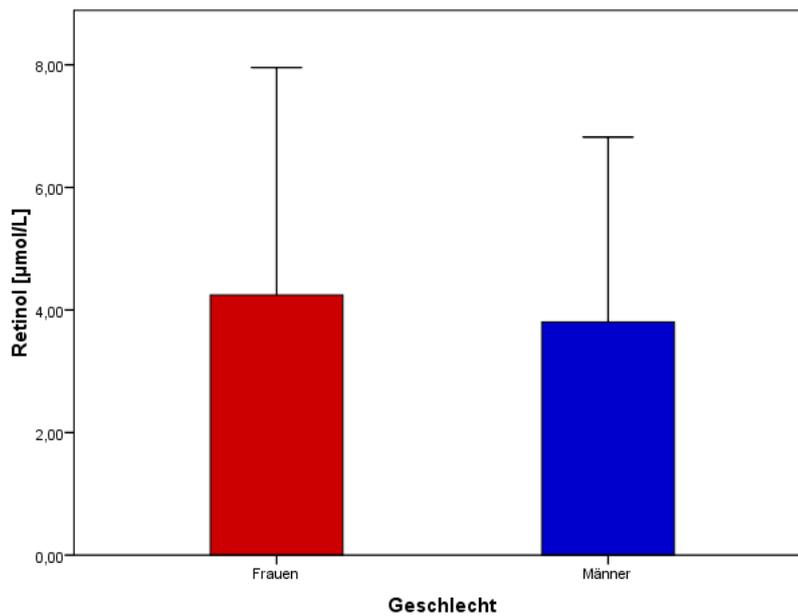


Abbildung (13) Durchschnittliche Konzentration an Retinol von Frauen im Vergleich zu Männern

4.2.2 Lutein

Luteinkonzentration der Studienteilnehmer

Die Lutein-Konzentration der gesamten Studienpopulation betrug durchschnittlich $0,34 \pm 0,24 \mu\text{mol/L}$ und bewegte sich in einem Bereich von $0,11$ bis maximal $1,51 \mu\text{mol/L}$.

Luteinkonzentration Gilbert's Syndrom und Kontrolle

Nach Aufteilung der einzelnen Probanden in jene mit Gilbert's Syndrom und jene mit physiologischen Bilirubin-Konzentrationen ergaben sich mittlere Plasmawerte von $0,29 \pm 0,15 \mu\text{mol/L}$ in der Fallgruppe sowie $0,30 \pm 0,17 \mu\text{mol/L}$ in der Kontrollgruppe. Obwohl die Personen der Kontrollgruppe leicht höhere Plasmawerte aufwiesen, konnte dieser Unterschied nicht als signifikant gewertet werden ($P=0,604$).

Bei Einteilung der Probanden in vier Bilirubin-Kategorien, und zwar $<10 \mu\text{mol/L}$, $10-17,1 \mu\text{mol/L}$, $17,2-36 \mu\text{mol/L}$ sowie $>36 \mu\text{mol/L}$, lassen sich auch hier lediglich geringe Abweichungen der Gruppen untereinander feststellen.

So weist jene Gruppe mit der niedrigsten Bilirubin-Konzentration die im Mittel geringste

UCB-Konzentration	MW \pm sd [$\mu\text{mol/L}$]	Minimum [$\mu\text{mol/L}$]	Maximum [$\mu\text{mol/L}$]
<10 $\mu\text{mol/L}$	0,28 \pm 0,17	0,15	0,82
10–17,1 $\mu\text{mol/L}$	0,31 \pm 0,17	0,11	0,83
17,2–36 $\mu\text{mol/L}$	0,29 \pm 0,14	0,14	0,72
>36 $\mu\text{mol/L}$	0,32 \pm 0,17	0,11	0,77

Tabelle (4.2.2) Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm sd), minimale und maximale Konzentration für Lutein in Abhängigkeit von der Konzentration an UCB

Konzentration an Lutein im Blut auf. Weiters kann man erkennen, dass die Gruppe mit den höchsten Bilirubinspiegeln durchschnittlich die größten Plasmalevel an Lutein aufweisen, nämlich $0,32 \pm 0,17 \mu\text{mol/L}$. Die Gruppe, bei der die Werte für Bilirubin im physiologischen Normbereich liegen (10–17,1 $\mu\text{mol/L}$) konnte die zweithöchste Luteinkonzentration im Durchschnitt mit $0,31 \pm 0,17 \mu\text{mol/L}$ gemessen werden (siehe Tabelle 4.2.2). Diese Unterschiede weisen jedoch keine Signifikanz auf.

Betrachtet man den Luteinstatus der Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe zusätzlich im Abhängigkeit vom Alter lassen sich vier unterschiedliche Gruppen bilden: GS <30 Jahre, Kontrolle <30 Jahre, GS >30 Jahre und Kontrolle >30 Jahre.

Beim Vergleich dieser Gruppen untereinander kann jedoch kein signifikanter Unterschied in ihrem Plasmagehalt an Lutein festgestellt werden. Ungeachtet dessen sollte hier erwähnt werden, dass jene Personen über 30 Jahren mit Gilbert's Syndrom den höchsten mittleren Wert aufweisen (siehe Abbildung 14).

Luteinkonzentration Frauen und Männer

So konnte zwischen Frauen mit $0,37 \pm 0,23 \mu\text{mol/L}$ und Männern mit $0,27 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$ ein höchst signifikanter Unterschied ($P = 0,000$) bezüglich ihres durchschnittlichen Lutein-Status gemessen werden (siehe Abbildung 15).

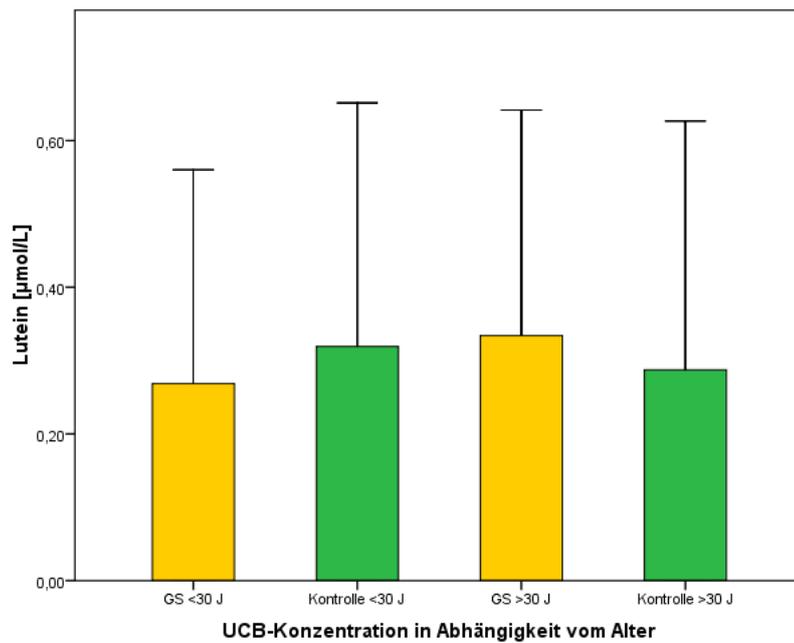


Abbildung (14) Durchschnittliche Luteinkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB

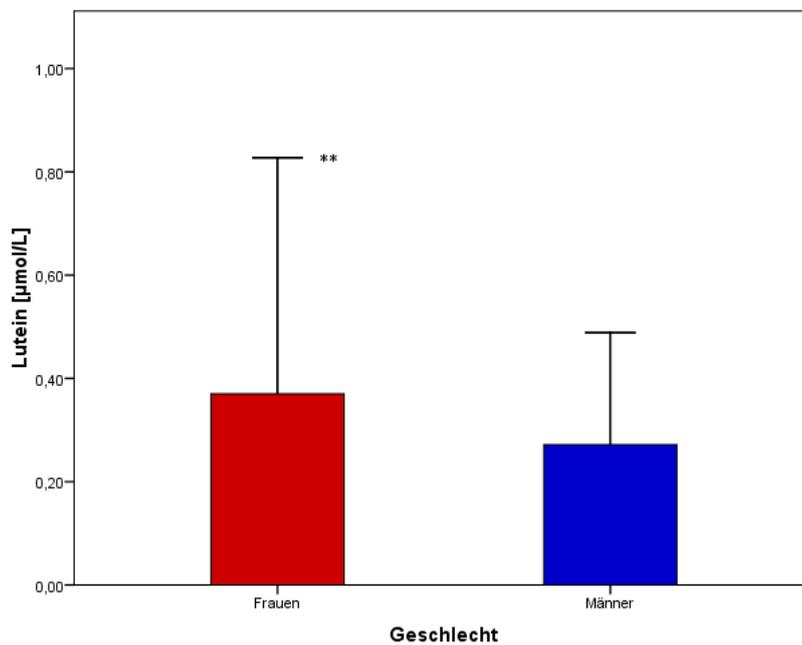


Abbildung (15) Durchschnittliche Konzentration an Lutein von Frauen im Vergleich zu Männern (** Männer < Frauen, $P < 0,001$)

4.2.3 β -Cryptoxanthin

β -Cryptoxanthinkonzentration der Studienteilnehmer

Die β -Cryptoxanthin-Konzentration der gesamten Studienpopulation betrug durchschnittlich $0,19 \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$ und bewegte sich in einem Bereich von 0,03 bis maximal 0,80 $\mu\text{mol/L}$.

β -Cryptoxanthinkonzentration Gilbert's Syndrom und Kontrolle

Nach Aufteilung der einzelnen Probanden in jene mit Gilbert's Syndrom und jene mit physiologischen Bilirubin-Konzentrationen ergaben sich mittlere Plasmawerte von $0,20 \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$ in der Fallgruppe sowie $0,18 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$ in der Kontrollgruppe. Obwohl die Personen mit Gilbert's Syndrom etwas höhere Plasmawerte an β -Cryptoxanthin aufwiesen, konnte dieser Unterschied nicht als signifikant gewertet werden ($P=0,328$).

UCB-Konzentration	MW \pm sd [$\mu\text{mol/L}$]	Minimum [$\mu\text{mol/L}$]	Maximum [$\mu\text{mol/L}$]
<10 $\mu\text{mol/L}$	$0,16 \pm 0,10$	0,04	0,37
10–17,1 $\mu\text{mol/L}$	$0,20 \pm 0,12$	0,03	0,51
17,2–36 $\mu\text{mol/L}$	$0,18 \pm 0,13$	0,03	0,44
>36 $\mu\text{mol/L}$	$0,23 \pm 0,15$	0,03	0,59

Tabelle (4.2.3) Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm sd), minimale und maximale Konzentration für β -Cryptoxanthin in Abhängigkeit von der Konzentration an UCB

Bei Einteilung der Probanden in vier Bilirubin-Kategorien, und zwar <10 $\mu\text{mol/L}$, 10–17,1 $\mu\text{mol/L}$, 17,2–36 $\mu\text{mol/L}$ sowie >36 $\mu\text{mol/L}$, lassen sich auch hier lediglich geringe Abweichungen der Gruppen untereinander feststellen.

So weist jene Gruppe mit der niedrigsten Bilirubin-Konzentration auch die im Mittel geringste Konzentration an β -Cryptoxanthin im Blut auf. Die beiden Gruppen mit einer Bilirubin-Konzentration von 10–17,1 $\mu\text{mol/L}$ sowie 17,2–36 $\mu\text{mol/L}$, zeigen ähnliche Plasmalevel an β -Cryptoxanthin, nämlich $0,20 \pm 0,12 \mu\text{mol/L}$ und $0,18 \pm 0,13 \mu\text{mol/L}$. Jene Gruppe mit der höchsten Bilirubin-Konzentration zeigt mit durchschnittlich $0,23 \pm$

0,15 $\mu\text{mol/L}$ die höchste β -Cryptoxanthinkonzentration im Blut (siehe Tabelle 4.2.3). Diese Unterschiede weisen jedoch keine Signifikanz auf.

Betrachtet man den β -Cryptoxanthinstatus der Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe zusätzlich im Abhängigkeit vom Alter lassen sich vier unterschiedliche Gruppen bilden: GS <30 Jahre, Kontrolle <30 Jahre, GS >30 Jahre und Kontrolle >30 Jahre.

Beim Vergleich dieser Gruppen untereinander konnte ein höchst signifikanter Unterschied ($P = 0,000$) festgestellt werden. So weist jene Gruppe über 30 Jahren mit Gilbert's Syndrom mit $0,30 \pm 0,15 \mu\text{mol/L}$ eine signifikant höhere Konzentration an β -Cryptoxanthin (MW \pm sd) im Vergleich zu GS unter 30 Jahren auf ($P = 0,003$). Vergleicht man diese Gruppe jedoch mit dem Kontrollkollektiv konnte zu keiner der beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied gefunden werden (siehe Abbildung 16).

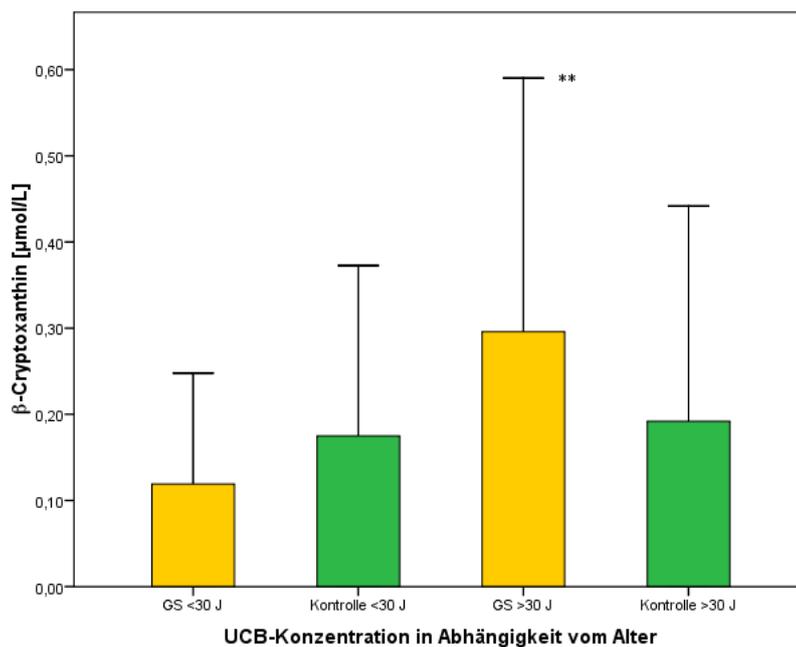


Abbildung (16) Durchschnittliche β -Cryptoxanthinkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB (** GS>30 J > GS<30 J, $P < 0,001$)

β -Cryptoxanthinkonzentration Frauen und Männer

Desgleichen konnte zwischen Frauen mit $0,20 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$ und Männern mit $0,19 \pm 0,13 \mu\text{mol/L}$ kein signifikanter Unterschied in ihrem durchschnittlichem β -Cryptoxanthin-Status gemessen werden, obwohl Frauen im Mittel einen gering höheren Wert aufweisen (siehe Abbildung 17).

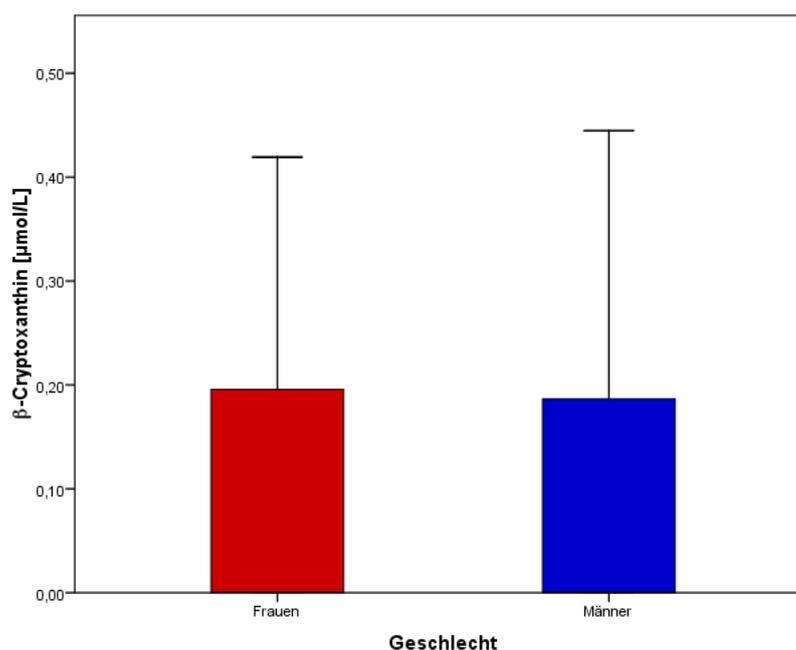


Abbildung (17) Durchschnittliche Konzentration an β -Cryptoxanthin von Frauen im Vergleich zu Männern

4.2.4 Lycopin

Lycopinkonzentration der Studienteilnehmer

Die Lycopin-Konzentration der gesamten Studienpopulation betrug durchschnittlich $0,26 \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$ und bewegte sich in einem Bereich von $0,05$ bis maximal $0,69 \mu\text{mol/L}$.

Lycopinkonzentration Gilbert' Syndrom und Kontrolle

Nach Aufteilung der einzelnen Probanden in jene mit Gilbert's Syndrom und jene mit physiologischen Bilirubin-Konzentrationen ergaben sich mittlere Plasmawerte an Lycopin von $0,24 \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$ in der Fallgruppe sowie $0,28 \pm 0,15 \mu\text{mol/L}$ in der Kontrollgruppe. Obwohl die Personen der Kontrollgruppe etwas höhere Plasmawerte aufwiesen,

konnte dieser Unterschied nicht als signifikant gewertet werden ($P=0,360$).

UCB-Konzentration	MW \pm sd [$\mu\text{mol/L}$]	Minimum [$\mu\text{mol/L}$]	Maximum [$\mu\text{mol/L}$]
<10 $\mu\text{mol/L}$	0,26 \pm 0,14	0,05	0,62
10–17,1 $\mu\text{mol/L}$	0,30 \pm 0,16	0,07	0,69
17,2–36 $\mu\text{mol/L}$	0,24 \pm 0,14	0,09	0,67
>36 $\mu\text{mol/L}$	0,24 \pm 0,15	0,11	0,72

Tabelle (4.2.4) Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm sd), minimale und maximale Konzentration für Lycopin in Abhängigkeit von der Konzentration an UCB

Bei Einteilung der Probanden in vier Bilirubin-Kategorien, und zwar <10 $\mu\text{mol/L}$, 10–17,1 $\mu\text{mol/L}$, 17,2–36 $\mu\text{mol/L}$ sowie >36 $\mu\text{mol/L}$, lassen sich auch hier lediglich geringe Abweichungen der Gruppen untereinander feststellen.

So konnte bei jenen beiden Gruppen mit erhöhten UCB-Konzentrationen die durchschnittlich niedrigsten Werte für Lycopin mit 0,24 \pm 0,14 und 0,24 \pm 0,15 $\mu\text{mol/L}$ gemessen werden. Die Gruppe, bei der die Werte für Bilirubin im physiologischen Normbereich liegen (10–17,1 $\mu\text{mol/L}$) konnte die im Mittel höchste Lycopinkonzentration mit 0,30 \pm 0,16 $\mu\text{mol/L}$ nachgewiesen werden. Jene Gruppe mit der niedrigsten Bilirubin-Konzentration zeigen durchschnittliche Werte für Lycopin von 0,26 \pm 0,14 $\mu\text{mol/L}$ (siehe Tabelle 4.2.4). Diese Unterschiede weisen jedoch keine Signifikanz auf.

Betrachtet man den Lycopinstatus der Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe zusätzlich im Abhängigkeit vom Alter lassen sich vier unterschiedliche Gruppen bilden: GS <30 Jahre, Kontrolle <30 Jahre, GS >30 Jahre und Kontrolle >30 Jahre.

Beim Vergleich dieser Gruppen untereinander kann jedoch kein signifikanter Unterschied in ihrem Plasmagehalt an Lycopin festgestellt werden. Ungeachtet dessen sollte hier erwähnt werden, dass jene Personen der Kontrollgruppe über 30 Jahren den höchsten mittleren Wert aufweisen (siehe Abbildung 18).

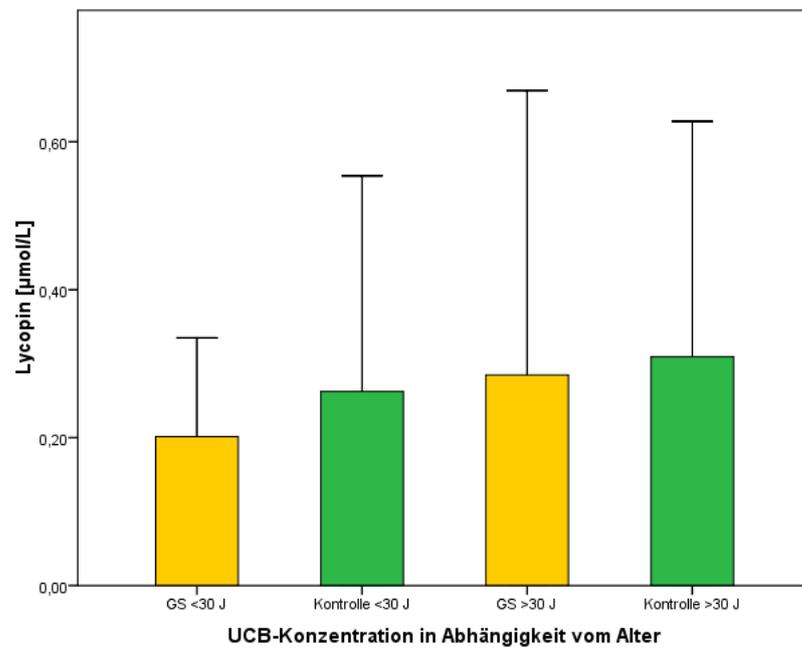


Abbildung (18) Durchschnittliche Lycopinkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB

Lycopinkonzentration Frauen und Männer

Desgleichen konnte zwischen Frauen mit $0,25 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$ und Männern mit $0,27 \pm 0,12 \mu\text{mol/L}$ kein signifikanter Unterschied bezüglich ihres durchschnittlichen Lycopin-Status gemessen werden, obwohl die männlichen Probanden im Mittel einen höheren Wert aufweisen (siehe Abbildung 19).

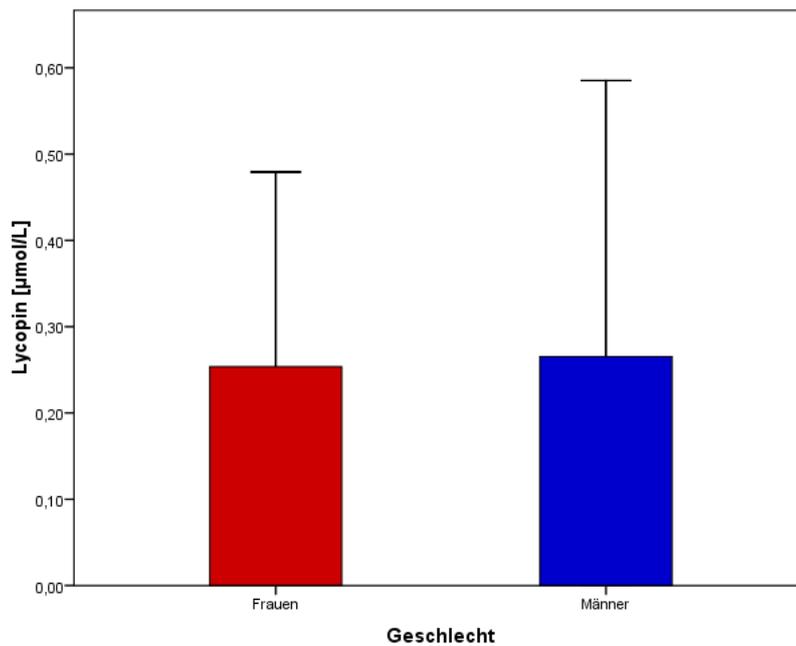


Abbildung (19) Durchschnittliche Konzentration an Lycopin von Frauen im Vergleich zu Männern

4.2.5 α -Carotin

α -Carotinkonzentration der Studienteilnehmer

Die α -Carotin-Konzentration der gesamten Studienpopulation betrug durchschnittlich $0,21 \pm 0,16 \mu\text{mol/L}$ und bewegte sich in einem Bereich von $0,05$ bis maximal $1,02 \mu\text{mol/L}$.

α -Carotinkonzentration Gilbert's Syndrom und Kontrolle

Nach Aufteilung der einzelnen Probanden in jene mit Gilbert's Syndrom und jene mit physiologischen Bilirubin-Konzentrationen ergaben sich mittlere Plasmawerte von $0,20 \pm 0,14 \mu\text{mol/L}$ in der Fallgruppe sowie $0,19 \pm 0,11 \mu\text{mol/L}$ in der Kontrollgruppe. Obwohl die Personen mit Gilbert's Syndrom etwas höhere Werte an α -Carotin aufwiesen, konnte dieser Unterschied nicht als signifikant gewertet werden ($P=0,282$).

Bei Einteilung der Probanden in vier Bilirubin-Kategorien, und zwar $<10 \mu\text{mol/L}$, $10\text{--}17,1 \mu\text{mol/L}$, $17,2\text{--}36 \mu\text{mol/L}$ sowie $>36 \mu\text{mol/L}$, lassen sich auch hier lediglich geringe Abweichungen der Gruppen untereinander feststellen.

So zeigt jene Gruppe mit der niedrigsten Bilirubin-Konzentration auch die durchschnitt-

UCB-Konzentration	MW \pm sd [$\mu\text{mol/L}$]	Minimum [$\mu\text{mol/L}$]	Maximum [$\mu\text{mol/L}$]
<10 $\mu\text{mol/L}$	0,16 \pm 0,08	0,05	0,26
10–17,1 $\mu\text{mol/L}$	0,22 \pm 0,13	0,05	0,48
17,2–36 $\mu\text{mol/L}$	0,19 \pm 0,13	0,07	0,52
>36 $\mu\text{mol/L}$	0,21 \pm 0,16	0,05	0,48

Tabelle (4.2.5) Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm sd), minimale und maximale Konzentration für α -Carotin in Abhängigkeit von der Konzentration an UCB

lich geringste Konzentration an α -Carotin im Blut mit $0,16 \pm 0,08 \mu\text{mol/L}$ auf. Bei jenen beiden Gruppen mit erhöhten UCB-Konzentrationen (17,2–36 $\mu\text{mol/L}$ und >36 $\mu\text{mol/L}$) konnten im Mittel ähnliche Werte für α -Carotin mit $0,19 \pm 0,13 \mu\text{mol/L}$ sowie $0,21 \pm 0,16 \mu\text{mol/L}$ gemessen werden. Die höchste Konzentration an α -Carotin mit $0,22 \pm 0,13 \mu\text{mol/L}$ zeigt jene Gruppe mit physiologischen Bilirubinlevels (10–17,1 $\mu\text{mol/L}$) im Plasma (siehe Tabelle 4.2.5). Diese Unterschiede weisen jedoch keine Signifikanz auf.

Betrachtet man den α -Carotinstatus der Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe zusätzlich im Abhängigkeit vom Alter lassen sich vier unterschiedliche Gruppen bilden: GS <30 Jahre, Kontrolle <30 Jahre, GS >30 Jahre und Kontrolle >30 Jahre.

Beim Vergleich dieser Gruppen untereinander kann jedoch kein signifikanter Unterschied in ihrem Plasmagehalt an α -Carotin festgestellt werden. Ungeachtet dessen sollte hier erwähnt werden, dass jene Personen über 30 Jahren mit Gilbert's Syndrom den höchsten mittleren Wert aufweisen (siehe Abbildung 20).

α -Carotinkonzentration Frauen und Männer

Desgleichen konnte zwischen Frauen mit im Durchschnitt $0,23 \pm 0,13 \mu\text{mol/L}$ und Männern mit $0,18 \pm 0,12 \mu\text{mol/L}$ kein signifikanter Unterschied in ihrem α -Carotin-Status gemessen werden, obwohl die weiblichen Probanden im Mittel eine höhere Konzentration aufweisen (siehe Abbildung 21).

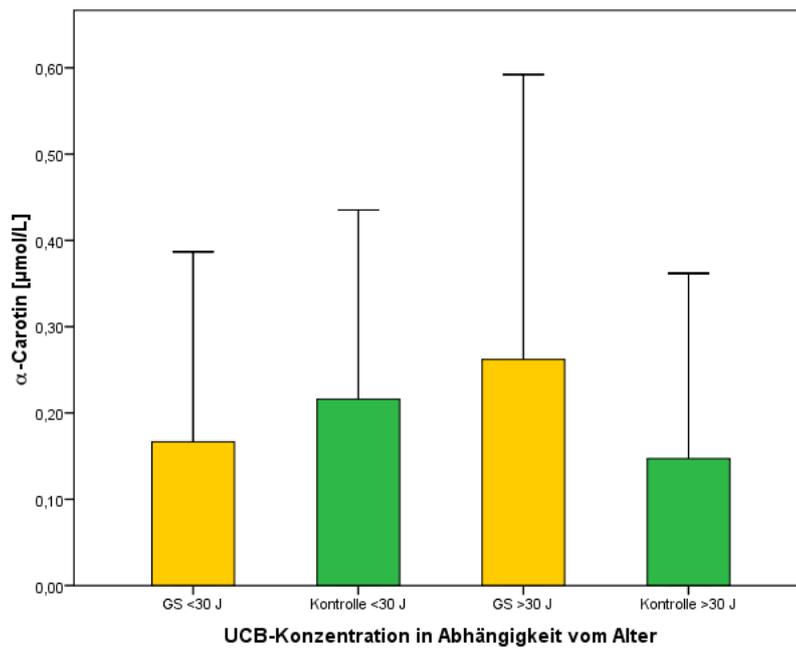


Abbildung (20) Durchschnittliche α -Carotinkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB

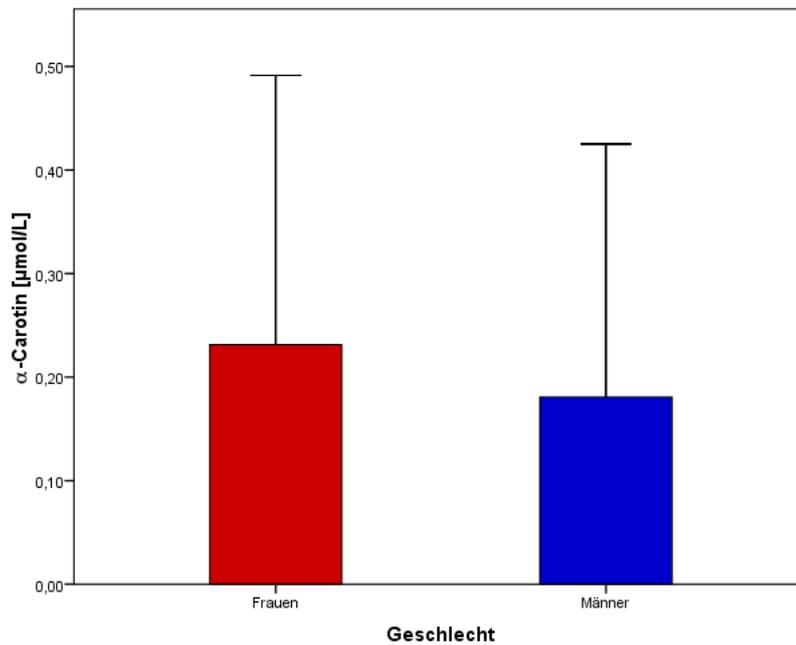


Abbildung (21) Durchschnittliche Konzentration an α -Carotin von Frauen im Vergleich zu Männern

4.2.6 β -Carotin

β -Carotinkonzentration der Studienteilnehmer

Die β -Carotin-Konzentration der gesamten Studienpopulation betrug durchschnittlich $0,63 \pm 0,98 \mu\text{mol/L}$ und bewegte sich in einem Bereich von $0,02$ bis maximal $1,72 \mu\text{mol/L}$.

β -Carotinkonzentration Gilbert's Syndrom und Kontrolle

Nach Aufteilung der einzelnen Probanden in jene mit Gilbert's Syndrom und jene mit physiologischen Bilirubin-Konzentrationen ergaben sich mittlere Plasmawerte an β -Carotin von $0,61 \pm 0,44 \mu\text{mol/L}$ in der Fallgruppe sowie $0,58 \pm 0,41 \mu\text{mol/L}$ in der Kontrollgruppe. Obwohl die Personen mit Gilbert's Syndrom etwas höhere Konzentrationen an β -Carotin aufwiesen, konnte dieser Unterschied nicht als signifikant gewertet werden ($P=0,632$).

UCB-Konzentration	MW \pm sd [$\mu\text{mol/L}$]	Minimum [$\mu\text{mol/L}$]	Maximum [$\mu\text{mol/L}$]
$<10 \mu\text{mol/L}$	$0,54 \pm 0,33$	$0,02$	$1,02$
$10\text{--}17,1 \mu\text{mol/L}$	$0,62 \pm 0,46$	$0,02$	$1,72$
$17,2\text{--}36 \mu\text{mol/L}$	$0,56 \pm 0,44$	$0,03$	$1,41$
$>36 \mu\text{mol/L}$	$0,69 \pm 0,46$	$0,13$	$1,67$

Tabelle (4.2.6) Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm sd), minimale und maximale Konzentration für β -Carotin in Abhängigkeit von der Konzentration an UCB

Bei Einteilung der Probanden in vier Bilirubin-Kategorien, und zwar $<10 \mu\text{mol/L}$, $10\text{--}17,1 \mu\text{mol/L}$, $17,2\text{--}36 \mu\text{mol/L}$ sowie $>36 \mu\text{mol/L}$, lassen sich auch hier lediglich geringe Abweichungen der Gruppen untereinander feststellen.

So zeigt jene Gruppe mit der niedrigsten Bilirubin-Konzentration auch die durchschnittlich geringste Konzentration an β -Carotin im Blut mit $0,54 \pm 0,33 \mu\text{mol/L}$ sowie jene Gruppe, welche die höchsten Plasmalevels an Bilirubin aufweisen auch die durchschnittlich höchsten Levels an β -Carotin mit $0,69 \pm 0,46 \mu\text{mol/L}$. Bei der Gruppe mit einer Bilirubin-Konzentration von $10\text{--}17,1 \mu\text{mol/L}$ konnten im Mittel ein Wert von $0,62 \pm$

0,46 $\mu\text{mol/L}$ gemessen werden. Jene Gruppen mit Bilirubinwerten über dem physiologischen Normwert (17,2–36 $\mu\text{mol/L}$) zeigten im Durchschnitt eine β -Carotinkonzentration von $0,56 \pm 0,44 \mu\text{mol/L}$ (siehe Tabelle 4.2.6). Diese Unterschiede weisen jedoch keine Signifikanz auf.

Betrachtet man den β -Carotinstatus der Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe zusätzlich in Abhängigkeit vom Alter lassen sich vier unterschiedliche Gruppen bilden: GS <30 Jahre, Kontrolle <30 Jahre, GS >30 Jahre und Kontrolle >30 Jahre.

Beim Vergleich dieser Gruppen untereinander kann jedoch kein signifikanter Unterschied in ihrem Plasmagehalt an β -Carotin festgestellt werden. Ungeachtet dessen sollte hier erwähnt werden, dass jene Personen über 30 Jahren mit Gilbert's Syndrom den höchsten mittleren Wert aufweisen (siehe Abbildung 22).

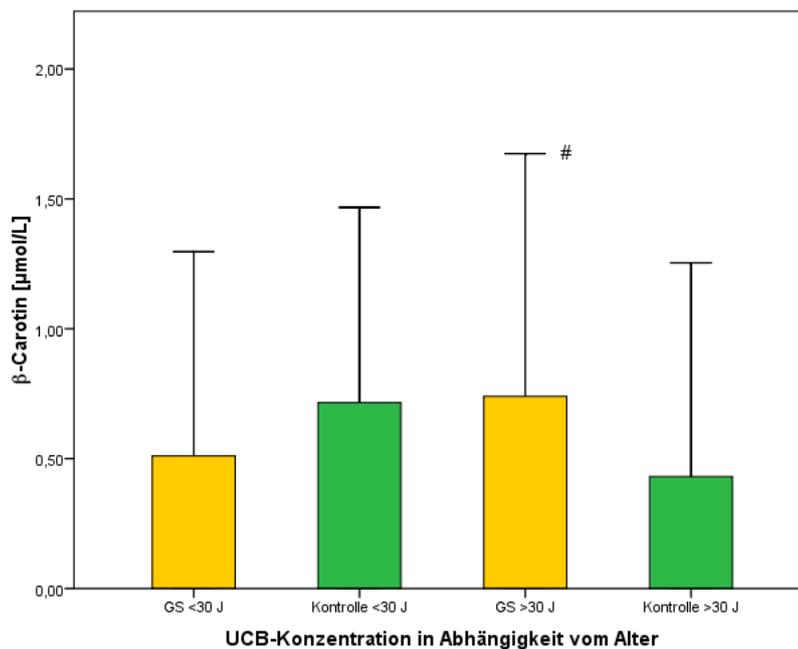


Abbildung (22) Durchschnittliche β -Carotinkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB (# Tendenz: GS>30 J > Kontrolle>30 J, P = 0,078)

β -Carotinkonzentration Frauen und Männer

Desgleichen konnte zwischen Frauen mit einer durchschnittlichen β -Carotinkonzentration von $0,69 \pm 0,44 \mu\text{mol/L}$ und Männern β -Carotinkonzentration von $0,56 \pm 0,41 \mu\text{mol/L}$ kein signifikanter Unterschied gemessen werden, obwohl die weiblichen Probanden im Mittel höhere Levels aufweisen (siehe Abbildung 23).

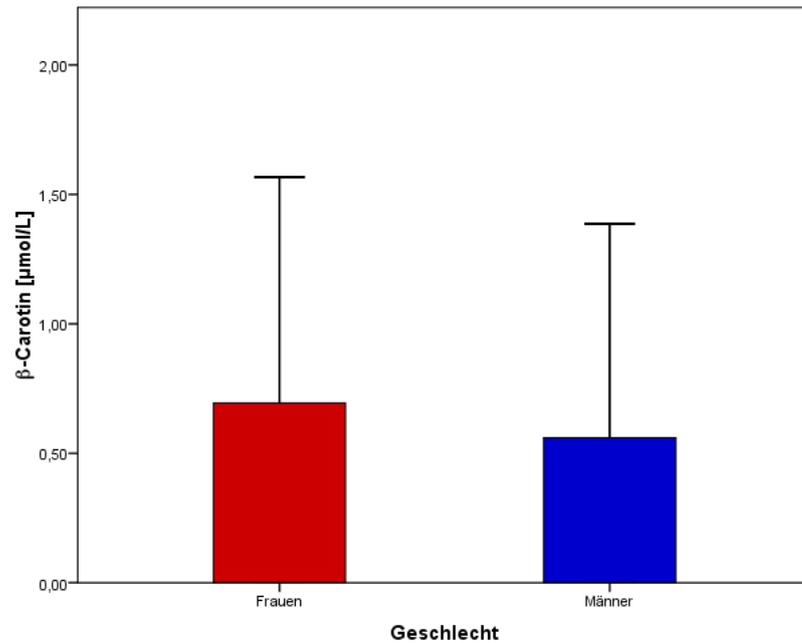


Abbildung (23) Durchschnittliche Konzentration an β -Carotin von Frauen im Vergleich zu Männern

4.3 Vitamin E

4.3.1 α -Tocopherol

α -Tocopherolkonzentration der Studienteilnehmer

Die α -Tocopherol-Konzentration der gesamten Studienpopulation betrug durchschnittlich $32,24 \pm 8,74 \mu\text{mol/L}$ und bewegte sich in einem Bereich von 3,41 bis maximal $49,60 \mu\text{mol/L}$.

α -Tocopherolkonzentration Gilbert's Syndrom und Kontrolle

Nach Aufteilung der einzelnen Probanden in jene mit Gilbert's Syndrom und jene mit physiologischen Bilirubin-Konzentrationen ergaben sich mittlere Plasmawerte an α -Tocopherol von $30,64 \pm 9,23 \mu\text{mol/L}$ in der Fallgruppe sowie $33,64 \pm 7,57 \mu\text{mol/L}$ in der Kontrollgruppe. Obwohl bei Personen der Kontrollgruppe höhere Werte an α -Tocopherol festgestellt wurden, konnte dieser Unterschied nicht als signifikant gewertet werden ($P=0,454$).

UCB-Konzentration	MW \pm sd [$\mu\text{mol/L}$]	Minimum [$\mu\text{mol/L}$]	Maximum [$\mu\text{mol/L}$]
<10 $\mu\text{mol/L}$	$35,72 \pm 7,69$	23,56	49,31
10–17,1 $\mu\text{mol/L}$	$32,29 \pm 7,17$	18,91	46,56
17,2–36 $\mu\text{mol/L}$	$31,37 \pm 7,96$	20,11	49,60
>36 $\mu\text{mol/L}$	$29,03 \pm 11,27$	3,41	44,06

Tabelle (4.3.1) Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm sd), minimale und maximale Konzentration für α -Tocopherol in Abhängigkeit von der Konzentration an UCB

Bei Einteilung der Probanden in vier Bilirubin-Kategorien, und zwar <10 $\mu\text{mol/L}$, 10–17,1 $\mu\text{mol/L}$, 17,2–36 $\mu\text{mol/L}$ sowie >36 $\mu\text{mol/L}$, lassen sich auch hier lediglich geringe Abweichungen der Gruppen untereinander feststellen.

So zeigt jene Gruppe mit der niedrigsten Bilirubin-Konzentration die durchschnittlich höchste Konzentration an α -Tocopherol im Blut mit $35,72 \pm 7,69 \mu\text{mol/L}$. Bei allen anderen Gruppen (<10 $\mu\text{mol/L}$, 10–17,1 $\mu\text{mol/L}$ sowie 17,2–36 $\mu\text{mol/L}$) konnten im Mittel sehr ähnlich α -Tocopherolkonzentrationen, nämlich $32,29 \pm 7,17$, $31,37 \pm 7,96$ sowie $29,03 \pm 11,27 \mu\text{mol/L}$ gemessen werden, wobei mit zunehmender Bilirubinkonzentration die Plasmalevels an α -Tocopherol abnehmen (siehe Tabelle 4.3.1). Diese Unterschiede weisen jedoch keine Signifikanz auf.

Betrachtet man den α -Tocopherolstatus der Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe zusätzlich im Abhängigkeit vom Alter lassen sich vier unterschiedliche Gruppen bilden: GS <30 Jahre, Kontrolle <30 Jahre, GS >30 Jahre und Kontrolle

>30 Jahre.

Beim Vergleich dieser Gruppen untereinander kann jedoch kein signifikanter Unterschied in ihrem Plasmagehalt an α -Tocopherol festgestellt werden. Ungeachtet dessen sollte hier erwähnt werden, dass jene Personen der Kontrollgruppe über 30 Jahren den höchsten mittleren Wert aufweisen (siehe Abbildung 24).

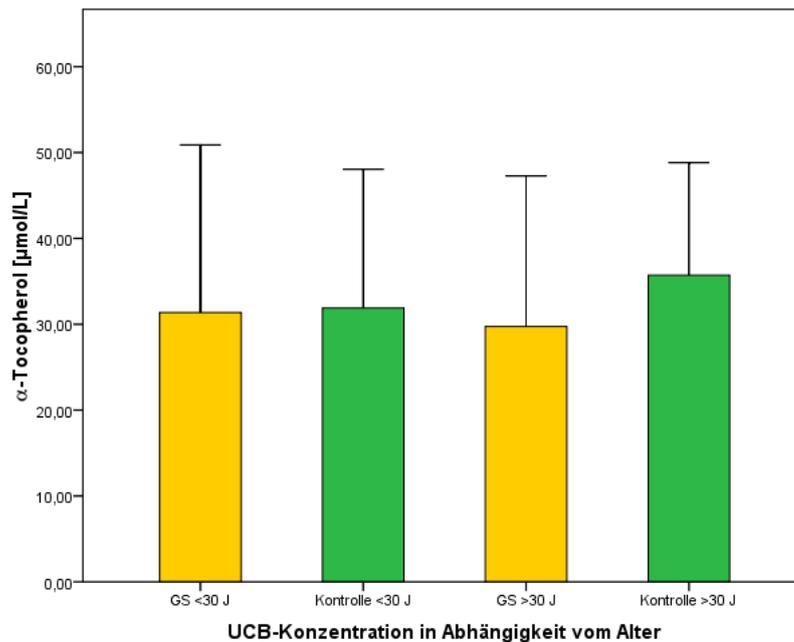


Abbildung (24) Durchschnittliche α -Tocopherolkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB

α -Tocopherolkonzentration Frauen und Männer

Desgleichen konnte zwischen weiblichen und männlichen Studienteilnehmern mit $32,32 \pm 8,79 \mu\text{mol/L}$ sowie $32,16 \pm 8,45 \mu\text{mol/L}$ kein signifikanter Unterschied in ihrem α -Tocopherol-Status gemessen werden obwohl Frauen hier im Durchschnitt eine höhere Plasmakonzentration aufweisen (siehe Abbildung 25).

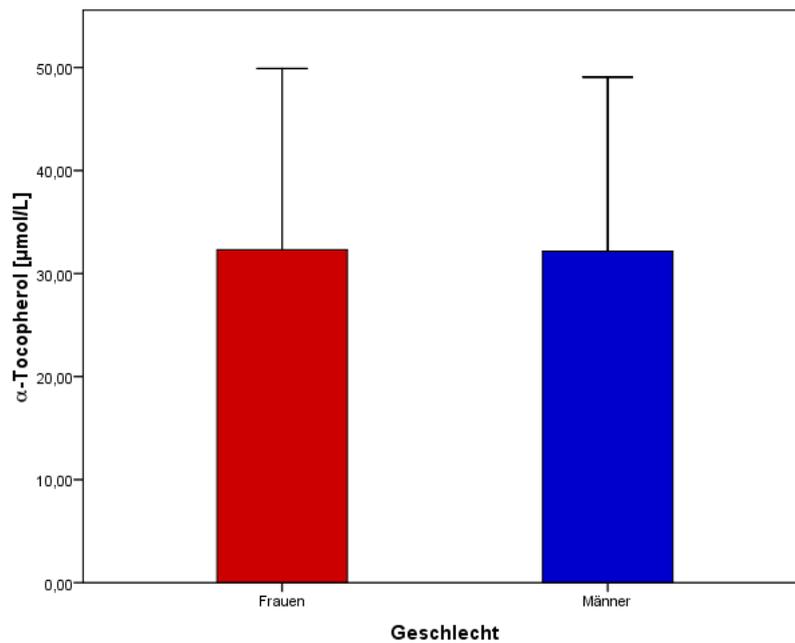


Abbildung (25) Durchschnittliche Konzentration an α -Tocopherol von Frauen im Vergleich zu Männern

4.3.2 γ -Tocopherol

γ -Tocopherolkonzentration der Studienteilnehmer

Die γ -Tocopherol-Konzentration der gesamten Studienpopulation betrug durchschnittlich $1,42 \pm 0,63 \mu\text{mol/L}$ und bewegte sich in einem Bereich von 0,60 bis maximal $3,89 \mu\text{mol/L}$.

γ -Tocopherolkonzentration Gilbert's Syndrom und Kontrolle

Nach Aufteilung der einzelnen Probanden in jene mit Gilbert's Syndrom und jene mit physiologischen Bilirubin-Konzentrationen ergaben sich mittlere Plasmawerte von $1,46 \pm 0,62 \mu\text{mol/L}$ in der Fallgruppe sowie $1,59 \pm 0,94 \mu\text{mol/L}$ in der Kontrollgruppe. Obwohl Personen der Kontrollgruppe im Mittel höhere Plasmawerte aufwiesen, konnte dieser Unterschied nicht als signifikant gewertet werden ($P=0,273$).

Bei Einteilung der Probanden in vier Bilirubin-Kategorien, und zwar $<10 \mu\text{mol/L}$, $10-17,1 \mu\text{mol/L}$, $17,2-36 \mu\text{mol/L}$ sowie $>36 \mu\text{mol/L}$, lassen sich auch hier lediglich geringe Abweichungen der Gruppen untereinander feststellen.

So zeigt jene Gruppe mit der niedrigsten Bilirubin-Konzentration im Mittel die höchste

UCB-Konzentration	MW \pm sd [$\mu\text{mol/L}$]	Minimum [$\mu\text{mol/L}$]	Maximum [$\mu\text{mol/L}$]
<10 $\mu\text{mol/L}$	1,75 \pm 0,95	0,60	3,89
10–17,1 $\mu\text{mol/L}$	1,49 \pm 0,91	0,68	5,09
17,2–36 $\mu\text{mol/L}$	1,54 \pm 0,70	0,60	3,32
>36 $\mu\text{mol/L}$	1,29 \pm 0,44	0,85	2,28

Tabelle (4.3.2) Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm sd), minimale und maximale Konzentration für γ -Tocopherol in Abhängigkeit von der Konzentration an UCB

Konzentration an γ -Tocopherol im Plasma mit $1,75 \pm 0,95 \mu\text{mol/L}$. Bei den Gruppen mit Bilirubinkonzentrationen von 10–17,1 $\mu\text{mol/L}$ sowie 17,2–36 $\mu\text{mol/L}$ konnten durchschnittlich ähnliche Werte für γ -Tocopherol im Blut, nämlich $1,49 \pm 0,91$ und $1,54 \pm 0,70 \mu\text{mol/L}$ gemessen werden. In der Gruppe mit der höchsten Bilirubinkonzentration konnte die im Durchschnitt geringste Konzentration an γ -Tocopherol nachgewiesen werden (siehe Tabelle 4.3.2). Diese Unterschiede weisen jedoch keine Signifikanz auf.

Betrachtet man den γ -Tocopherolstatus der Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe zusätzlich im Abhängigkeit vom Alter lassen sich vier unterschiedliche Gruppen bilden: GS <30 Jahre, Kontrolle <30 Jahre, GS >30 Jahre und Kontrolle >30 Jahre.

Beim Vergleich dieser Gruppen untereinander kann jedoch kein signifikanter Unterschied in ihrem Plasmagehalt an γ -Tocopherol festgestellt werden. Ungeachtet dessen sollte hier erwähnt werden, dass jene Personen der Kontrollgruppe über 30 Jahren den höchsten mittleren Wert aufweisen (siehe Abbildung 26).

γ -Tocopherolkonzentration Frauen und Männer

Desgleichen konnte zwischen Frauen ($1,57 \pm 0,93 \mu\text{mol/L}$) und Männern ($1,51 \pm 0,75 \mu\text{mol/L}$) kein signifikanter Unterschied in puncto ihres durchschnittlichen γ -Tocopherolstatus gemessen werden, obwohl die weiblichen Probanden etwas höhere Plasmawerte aufwiesen (siehe Abbildung 27).

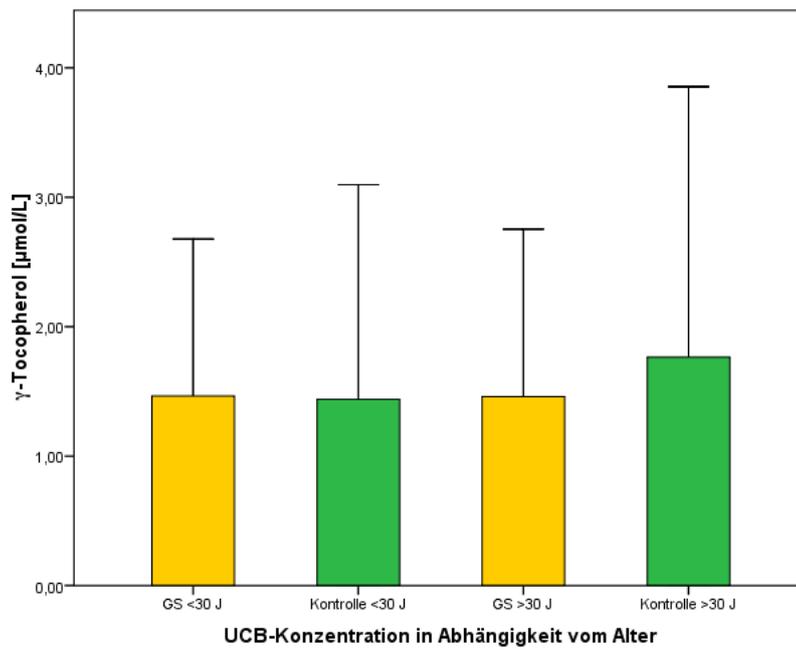


Abbildung (26) Durchschnittliche γ -Tocopherolkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB

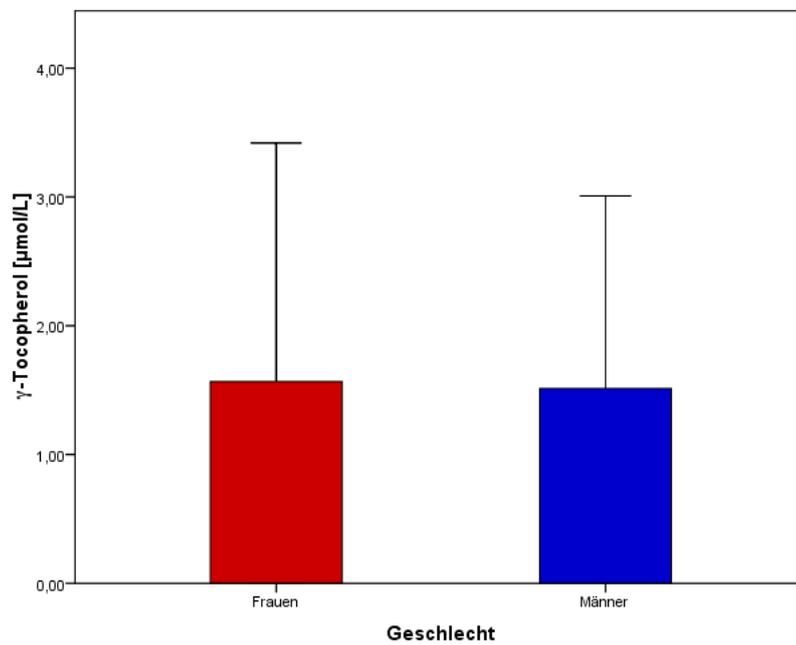


Abbildung (27) Durchschnittliche Konzentration an γ -Tocopherol von Frauen im Vergleich zu Männern

4.4 Vitamin K₁

Phyllochinonkonzentration der Studienteilnehmer

Die Vitamin K₁-Konzentration der gesamten Studienpopulation betrug durchschnittlich $0,44 \pm 0,64$ nmol/L und bewegte sich in einem Bereich von 0,05 bis maximal 4,79 nmol/L.

Phyllochinonkonzentration Gilbert's Syndrom und Kontrolle

Nach Aufteilung der einzelnen Probanden in jene mit Gilbert's Syndrom und jene mit physiologischen Bilirubin-Konzentrationen ergaben sich mittlere Plasmawerte an Phyllochinon von $0,32 \pm 0,23$ nmol/L in der Fallgruppe sowie $0,47 \pm 0,70$ nmol/L in der Kontrollgruppe. Obwohl die Personen der Kontrollgruppe im Durchschnitt leicht höhere Plasmawerte aufwiesen, konnte dieser Unterschied nicht als signifikant gewertet werden ($P=0,703$).

UCB-Konzentration	MW \pm sd [μ mol/L]	Minimum [μ mol/L]	Maximum [μ mol/L]
<10 μ mol/L	$0,38 \pm 0,25$	0,16	1,17
10–17,1 μ mol/L	$0,33 \pm 0,19$	0,12	0,82
17,2–36 μ mol/L	$0,35 \pm 0,25$	0,12	1,10
>36 μ mol/L	$0,35 \pm 0,33$	0,05	1,24

Tabelle (4.4.1) Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm sd), minimale und maximale Konzentration für Phyllochinon in Abhängigkeit von der Konzentration an UCB

Bei Einteilung der Probanden in vier Bilirubin-Kategorien, und zwar <10 μ mol/L, 10–17,1 μ mol/L, 17,2–36 μ mol/L sowie >36 μ mol/L, lassen sich auch hier lediglich geringe Abweichungen der Gruppen untereinander feststellen.

In der Gruppe mit der niedrigsten Bilirubinkonzentration konnte die im Durchschnitt höchste Konzentration an Vitamin K₁ von $0,38 \pm 0,25$ nmol/L nachgewiesen werden. In der Gruppe mit Bilirubinlevels von 17,2–36 sowie jener mit >36 μ mol/L wurden vergleichbare Mittelwerte mit $0,35 \pm 0,25$ und $0,35 \pm 0,33$ nmol/L für die Phyllochinonkon-

zentration gemessen. In der zweiten Gruppe wurde ein durchschnittlicher Wert an Vitamin K₁ von $0,33 \pm 0,19$ nmol/L (siehe Tabelle 4.4.1). Diese Unterschiede weisen jedoch keine Signifikanz auf.

Betrachtet man den Retinolstatus der Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe zusätzlich im Abhängigkeit vom Alter lassen sich vier unterschiedliche Gruppen bilden: GS <30 Jahre, Kontrolle <30 Jahre, GS >30 Jahre und Kontrolle >30 Jahre.

Beim Vergleich dieser Gruppen untereinander kann jedoch kein signifikanter Unterschied in ihrem Plasmagehalt an Retinol festgestellt werden. Ungeachtet dessen sollte hier erwähnt werden, dass jene Personen über 30 Jahren mit Gilbert's Syndrom den höchsten mittleren Wert aufweisen.

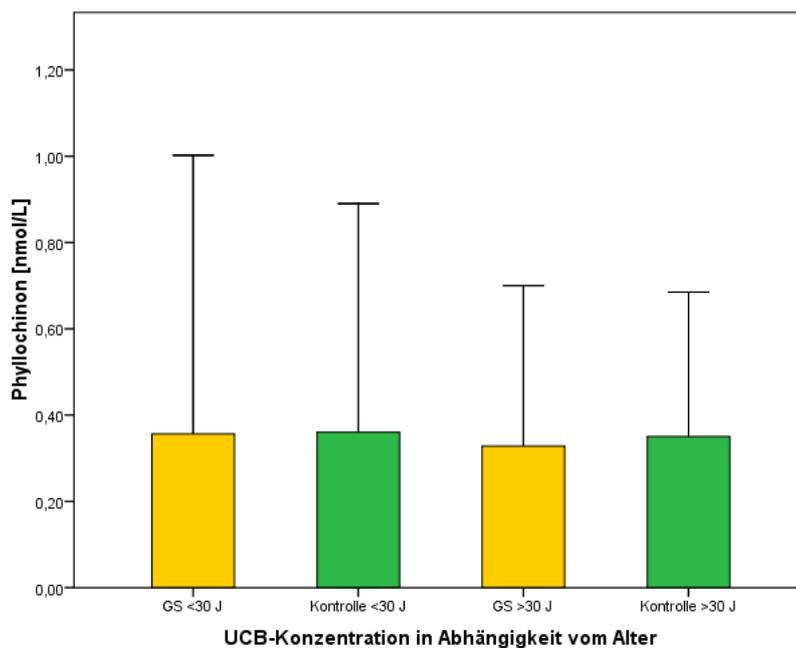


Abbildung (28) Durchschnittliche Phyllochinonkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB

Phyllochinonkonzentration Frauen und Männer

Desgleichen konnte bei Frauen mit einer durchschnittlichen Konzentration an Phyllochinon von $0,39 \pm 0,32$ nmol/L im Vergleich zu Männern mit $0,33 \pm 0,22$ nmol/L kein signifikanter Unterschied in ihrem durchschnittlichem Vitamin K₁-Status gemessen wer-

den, obwohl Frauen im Mittel einen höheren Wert aufweisen (siehe Abbildung 29).

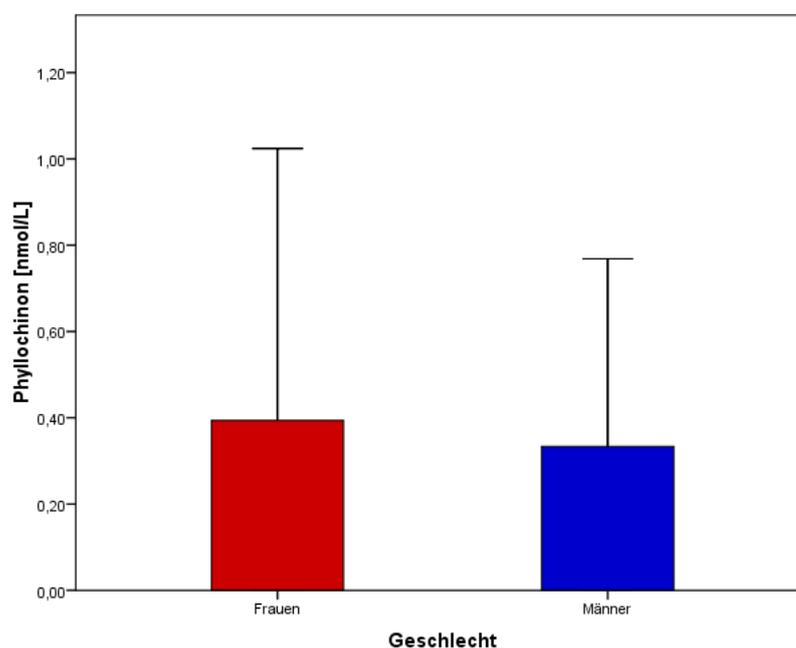


Abbildung (29) Durchschnittliche Konzentration an Phyllochinon von Frauen im Vergleich zu Männern

4.5 Ubichinon 50

Ubichinon 50-Konzentration der Studienteilnehmer

Die Ubichinon 50-Konzentration der gesamten Studienpopulation betrug durchschnittlich $0,61 \pm 0,29 \mu\text{mol/L}$ und bewegte sich in einem Bereich von 0,11 bis maximal $1,35 \mu\text{mol/L}$.

Ubichinon 50-Konzentration Gilbert's Syndrom und Kontrolle

Nach Aufteilung der einzelnen Probanden in jene mit Gilbert's Syndrom und jene mit physiologischen Bilirubin-Konzentrationen ergaben sich mittlere Plasmawerte an Ubichinon 50 von $0,59 \pm 0,33 \mu\text{mol/L}$ in der Fallgruppe sowie $0,64 \pm 0,28 \mu\text{mol/L}$ in der Kontrollgruppe. Obwohl die Personen der Kontrollgruppe leicht höhere Werte an Ubichinon 50 aufwiesen, konnte dieser Unterschied nicht als signifikant gewertet werden ($P=0,716$).

UCB-Konzentration	MW \pm sd [$\mu\text{mol/L}$]	Minimum [$\mu\text{mol/L}$]	Maximum [$\mu\text{mol/L}$]
<10 $\mu\text{mol/L}$	0,65 \pm 0,35	0,11	1,22
10–17,1 $\mu\text{mol/L}$	0,62 \pm 0,23	0,28	1,24
17,2–36 $\mu\text{mol/L}$	0,58 \pm 0,27	0,16	1,20
>36 $\mu\text{mol/L}$	0,61 \pm 0,42	0,27	1,73

Tabelle (4.5.1) Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm sd), minimale und maximale Konzentration für Ubichinon 50 in Abhängigkeit von der Konzentration an UCB

Bei Einteilung der Probanden in vier Bilirubin-Kategorien, und zwar <10 $\mu\text{mol/L}$, 10–17,1 $\mu\text{mol/L}$, 17,2–36 $\mu\text{mol/L}$ sowie >36 $\mu\text{mol/L}$, lassen sich auch hier lediglich geringe Abweichungen der Gruppen untereinander feststellen.

So wurde in der Gruppe mit der niedrigsten Bilirubinkonzentration durchschnittlich höchste Konzentration an Ubichinon 50 von 0,65 \pm 0,35 $\mu\text{mol/L}$ gemessen werden. In den übrigen drei Gruppen wurden im Mittel annähernd gleich hohe Levels für Ubichinon 50 im Blutplasma mit 0,62 \pm 0,23, 0,58 \pm 0,27 $\mu\text{mol/L}$ sowie 0,61 \pm 0,42 $\mu\text{mol/L}$ eruiert (siehe Tabelle 4.5.1). Diese Unterschiede weisen jedoch keine Signifikanz auf.

Betrachtet man den Ubichinon 50-Status der Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe zusätzlich im Abhängigkeit vom Alter lassen sich vier unterschiedliche Gruppen bilden: GS <30 Jahre, Kontrolle <30 Jahre, GS >30 Jahre und Kontrolle >30 Jahre.

Beim Vergleich dieser Gruppen untereinander wurde jedoch kein signifikanter Unterschied in ihrem Plasmagehalt an Ubichinon 50 festgestellt (siehe Abbildung 30).

Ubichinon 50-Konzentration Frauen und Männer

Desgleichen konnte zwischen weiblichen und männlichen Studienteilnehmern mit 0,60 \pm 0,31 $\mu\text{mol/L}$ sowie 0,62 \pm 0,31 $\mu\text{mol/L}$ kein signifikanter Unterschied in ihrem Plasmagehalt an Coenzym Q10 gemessen werden, obwohl Männer hier im Durchschnitt eine höhere Konzentration zeigen (siehe Abbildung 31).

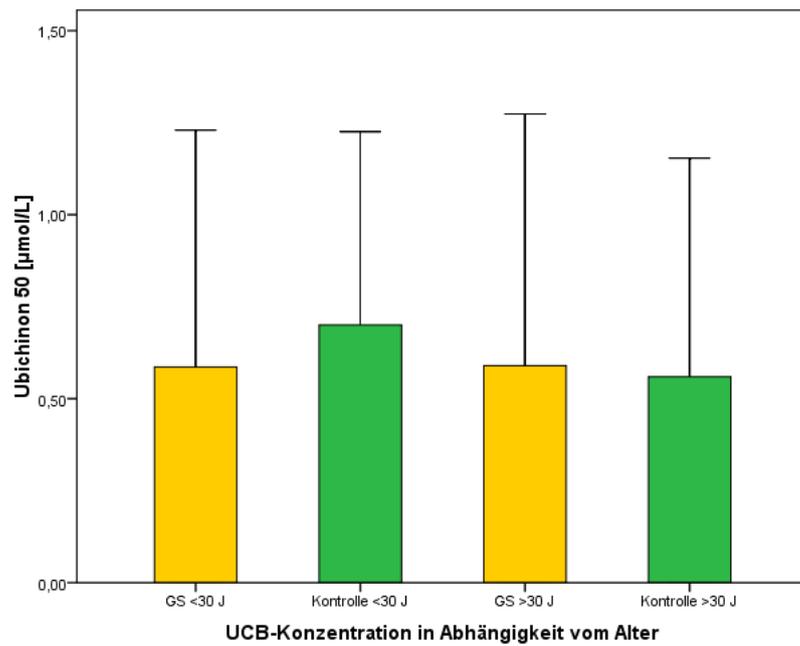


Abbildung (30) Durchschnittliche Ubichinon 50-Konzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB

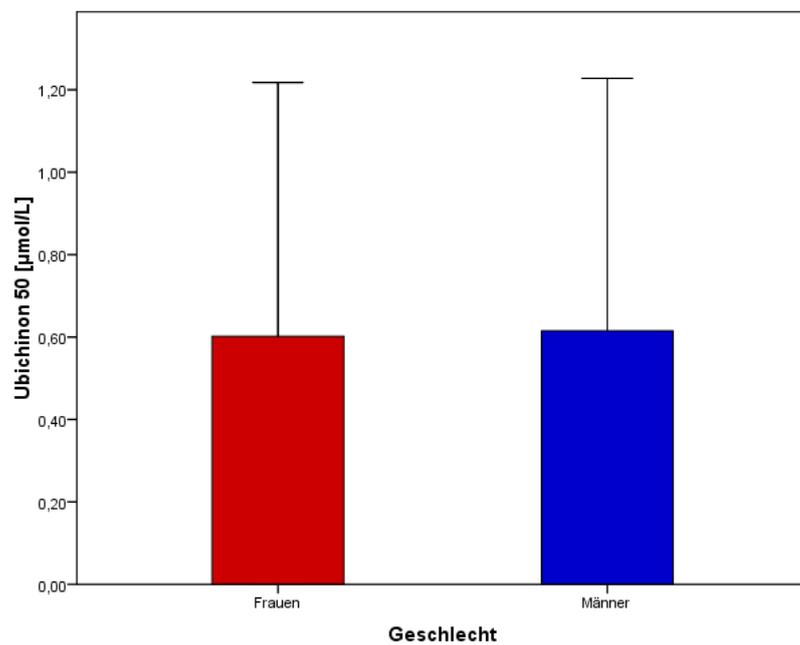


Abbildung (31) Durchschnittliche Konzentration an Ubichinon 50 von Frauen im Vergleich zu Männern

4.6 Vitamin C

Ascorbinsäurekonzentration der Studienteilnehmer

Die Vitamins C-Konzentration der gesamten Studienpopulation betrug durchschnittlich $71,87 \pm 11,40 \mu\text{mol/L}$ und bewegte sich in einem Bereich von 45,59 bis maximal 89,51 $\mu\text{mol/L}$.

Ascorbinsäurekonzentration Gilbert's Syndrom und Kontrolle

Nach Aufteilung der einzelnen Probanden in jene mit Gilbert's Syndrom und jene mit physiologischen Bilirubin-Konzentrationen ergaben sich mittlere Plasmawerte von $71,61 \pm 13,31 \mu\text{mol/L}$ in der Fallgruppe sowie $73,29 \pm 12,48 \mu\text{mol}$ Vitamins C pro L Plasma in der Kontrollgruppe. Obwohl in der Kontrollgruppe leicht höhere Werte an Vitamins C gemessen wurden, konnte dieser Unterschied nicht als signifikant gewertet werden ($P=0,248$).

UCB-Konzentration	MW \pm sd [$\mu\text{mol/L}$]	Minimum [$\mu\text{mol/L}$]	Maximum [$\mu\text{mol/L}$]
<10 $\mu\text{mol/L}$	$72,14 \pm 8,97$	57,45	86,40
10–17,1 $\mu\text{mol/L}$	$73,37 \pm 14,78$	45,59	113,28
17,2–36 $\mu\text{mol/L}$	$73,23 \pm 13,09$	53,27	101,84
>36 $\mu\text{mol/L}$	$69,98 \pm 13,79$	51,06	90,69

Tabelle (4.6.1) Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm sd), minimale und maximale Konzentration für Vitamin C in Abhängigkeit von der Konzentration an UCB

Bei Einteilung der Probanden in vier Bilirubin-Kategorien, und zwar <10 $\mu\text{mol/L}$, 10–17,1 $\mu\text{mol/L}$, 17,2–36 $\mu\text{mol/L}$ sowie >36 $\mu\text{mol/L}$, lassen sich auch hier lediglich geringe Abweichungen der Gruppen untereinander feststellen.

So zeigt jene Gruppe mit der höchsten Bilirubin-Konzentration die durchschnittlich geringste Konzentration an Ascorbinsäure im Blut mit $69,98 \pm 13,79 \mu\text{mol/L}$. Bei allen anderen Gruppen (<10 $\mu\text{mol/L}$, 10–17,1 $\mu\text{mol/L}$ sowie 17,2–36 $\mu\text{mol/L}$) konnten im Mittel sehr ähnlich Ascorbinsäurekonzentrationen, nämlich $72,14 \pm 8,97$, $73,37 \pm 14,78$

sowie $73,23 \pm 13,09 \mu\text{mol/L}$ gemessen werden (siehe Tabelle 4.6.1). Diese Unterschiede weisen jedoch keine Signifikanz auf.

Betrachtet man den Vitamin C-Status der Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe zusätzlich im Abhängigkeit vom Alter lassen sich vier unterschiedliche Gruppen bilden: GS <30 Jahre, Kontrolle <30 Jahre, GS >30 Jahre und Kontrolle >30 Jahre.

Beim Vergleich dieser Gruppen untereinander kann jedoch kein signifikanter Unterschied in ihrem Plasmagehalt an Ascorbinsäure festgestellt werden. Ungeachtet dessen sollte hier erwähnt werden, dass jene Personen der Kontrollgruppe über 30 Jahren den höchsten mittleren Wert aufweisen (siehe Abbildung 32).

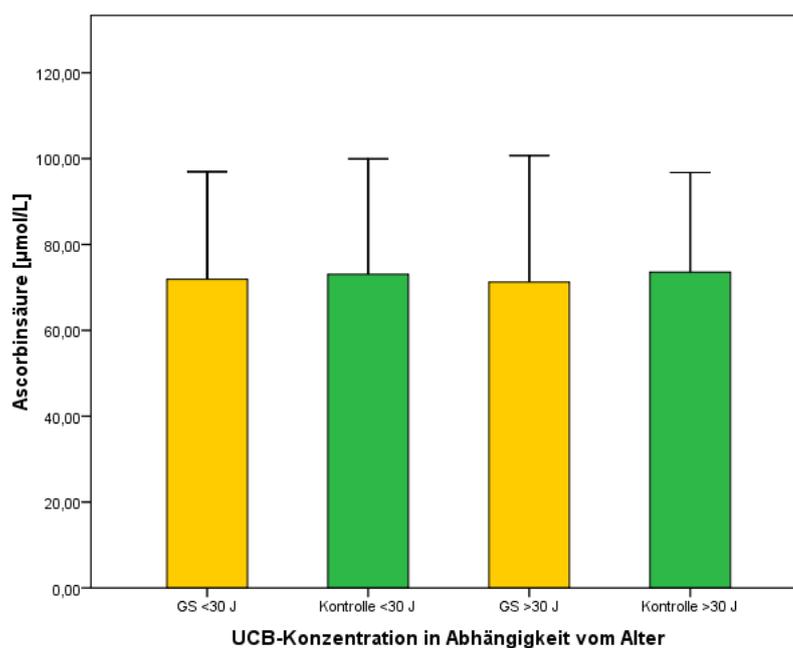


Abbildung (32) Durchschnittliche Ascorbinsäurekonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB

Ascorbinsäurekonzentration Frauen und Männer

Desgleichen konnte zwischen Frauen mit $73,95 \pm 14,20 \mu\text{mol/L}$ und Männern mit $71,91 \pm 12,42 \mu\text{mol/L}$ kein signifikanter Unterschied hinsichtlich ihres durchschnittlichem Ascorbinsäuregehalt im Blutplasma gemessen werden, obwohl die weiblichen Probanden gering höhere Konzentrationen aufweisen (siehe Abbildung 33).

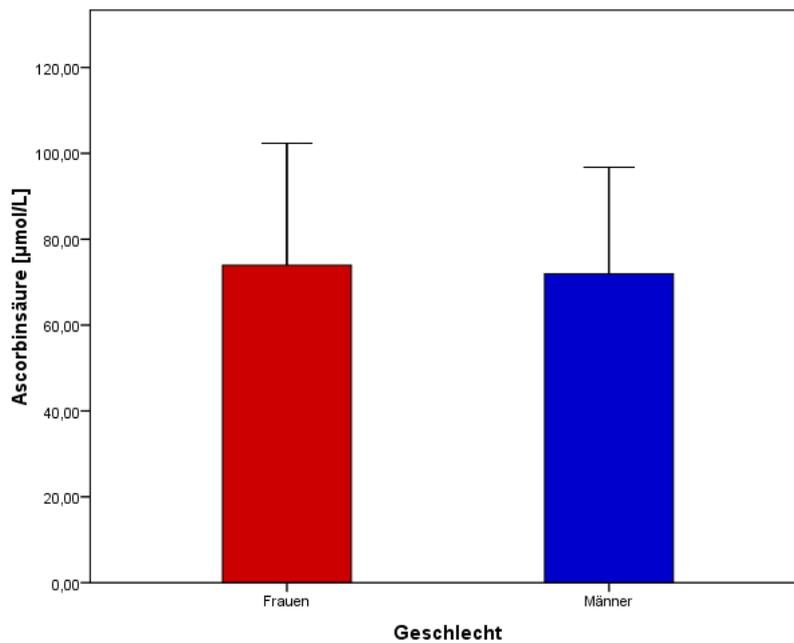


Abbildung (33) Durchschnittliche Konzentration an Ascorbinsäure von Frauen im Vergleich zu Männern

4.7 Glutathion

Glutathionkonzentration der Studienteilnehmer

Die Glutathion-Konzentration der gesamten Studienpopulation betrug durchschnittlich $2,38 \pm 0,34$ mmol/L und bewegte sich in einem Bereich von 1,69 bis maximal 3,16 mmol/L.

Glutathionkonzentration Gilbert's Syndrom und Kontrolle

Nach Aufteilung der einzelnen Probanden in jene mit Gilbert's Syndrom und jene mit physiologischen Bilirubin-Konzentrationen ergaben sich mittlere Plasmawerte an Glutathion von $2,34 \pm 0,36$ mmol/L in der Fallgruppe sowie $2,42 \pm 0,29$ mmol/L in der Kontrollgruppe. Obwohl in der Kontrollgruppe leicht höhere Werte an Glutathion gemessen wurden, konnte dieser Unterschied nicht als signifikant gewertet werden ($P=0,166$).

Bei Einteilung der Probanden in vier Bilirubin-Kategorien, und zwar <10 µmol/L, 10–17,1 µmol/L, 17,2–36 µmol/L sowie >36 µmol/L, lassen sich auch hier lediglich geringe

UCB-Konzentration	MW \pm sd [$\mu\text{mol/L}$]	Minimum [$\mu\text{mol/L}$]	Maximum [$\mu\text{mol/L}$]
<10 $\mu\text{mol/L}$	2,44 \pm 0,34	1,95	3,16
10–17,1 $\mu\text{mol/L}$	2,38 \pm 0,27	1,92	2,81
17,2–36 $\mu\text{mol/L}$	2,41 \pm 0,33	1,73	2,82
>36 $\mu\text{mol/L}$	2,26 \pm 0,39	1,69	3,01

Tabelle (4.7.1) Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm sd), minimale und maximale Konzentration für Glutathion in Abhängigkeit von der Konzentration an UCB

Abweichungen der Gruppen untereinander feststellen.

In der Gruppe mit der höchsten Bilirubinkonzentration konnte die im Durchschnitt geringste Konzentration an Glutathion nachgewiesen werden. Bei den übrigen drei Gruppen wurden mit 2,44 \pm 0,34, 2,38 \pm 0,27 und 2,41 \pm 0,33 mmol/L einander entsprechende Messergebnisse bezüglich der durchschnittlichen Glutathionkonzentration erzielt (siehe Tabelle 4.7.1). Diese Unterschiede weisen jedoch keine Signifikanz auf.

Betrachtet man den Glutathionstatus der Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zur Kontrollgruppe zusätzlich im Abhängigkeit vom Alter lassen sich vier unterschiedliche Gruppen bilden: GS <30 Jahre, Kontrolle <30 Jahre, GS >30 Jahre und Kontrolle >30 Jahre.

Beim Vergleich dieser Gruppen untereinander konnte ein höchst signifikanter Unterschied ($P = 0,004$) in ihrem Plasmagehalt an Glutathion festgestellt werden. So weist die Kontrollgruppe über 30 Jahren mit 2,57 \pm 0,33 mmol/L eine signifikant höhere Konzentration an Glutathion im Vergleich zu jene unter 30 Jahren ($P = 0,032$) sowie im Vergleich zu den Personen mit Gilbert's Syndrom unter 30 Jahren ($P = 0,009$) auf (siehe Abbildung 34).

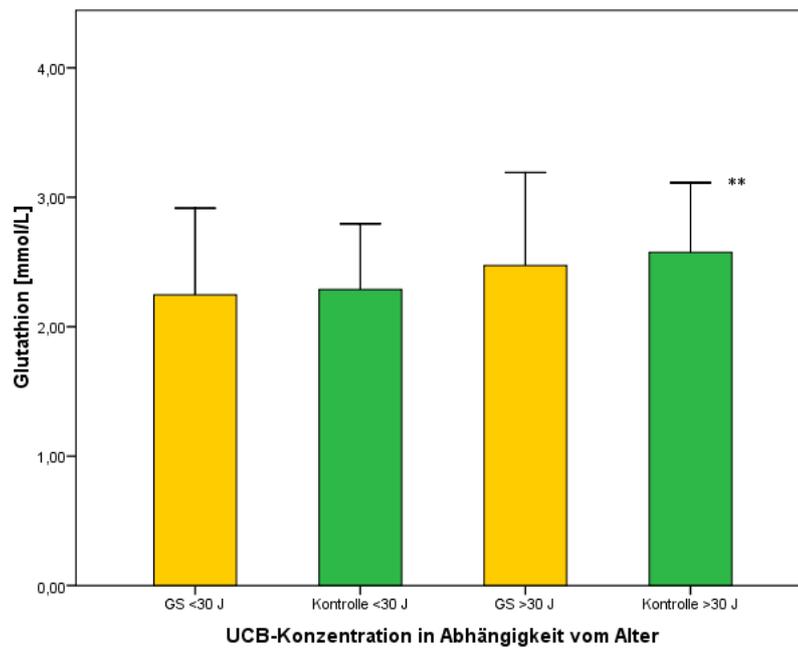


Abbildung (34) Durchschnittliche Glutathionkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB (** Kontrolle>30 J > GS<30 J, Kontrolle<30 J, P <0,01)

Glutathionkonzentration Frauen und Männer

Desgleichen konnte zwischen Frauen mit $2,51 \pm 0,33$ mmol/L und Männern mit $2,33 \pm 0,3$ mmol/L kein signifikanter Unterschied hinsichtlich ihres durchschnittlichem Glutathiongehalts im Blutplasma gemessen werden, obwohl die weiblichen Probanden etwas höhere Levels aufweisen (siehe Abbildung 35).

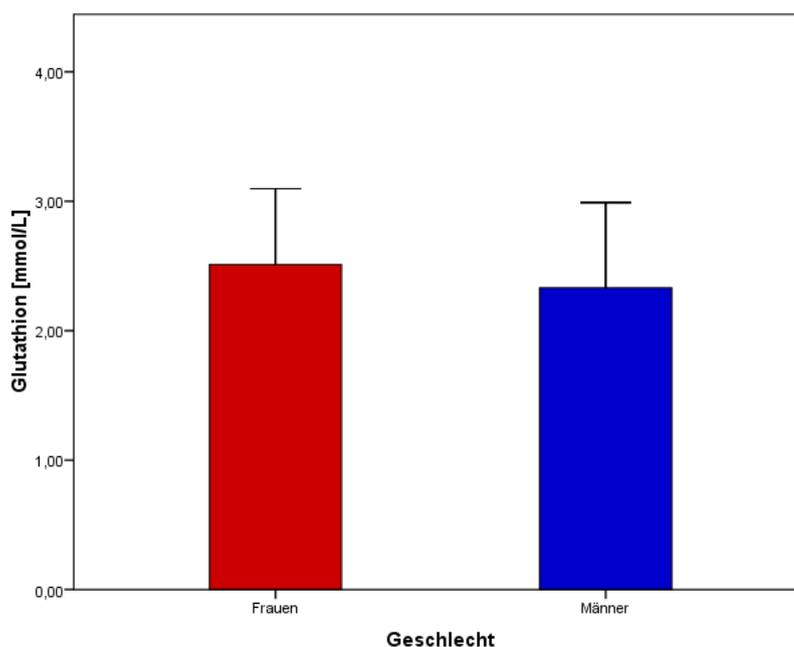


Abbildung (35) Durchschnittliche Konzentration an Glutathion von Frauen im Vergleich zu Männern

4.8 Diskussion der Ergebnisse

Im Rahmen der Gesamtstudie wurde im Zuge dieser Diplomarbeit der antioxidative Status von Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zu einer Kontrollgruppe anhand folgender Parameter evaluiert: Retinol, Ascorbinsäure, α - und γ -Tocopherol, Phyllochinon, ausgewählte Carotinoide, Glutathion und Ubichinon 50. Somit wurden sowohl die Plasmakonzentrationen endogen synthetisierter, als auch exogen zugeführter Antioxidantien und ihr Zusammenhang mit Serumbilirubinkonzentrationen in die Bewertung des Status miteinbezogen, um mit dieser Studie, die positiven Auswirkungen mäßig erhöhter Bilirubinspiegel auf die Gesundheit untersuchen zu können.

Von den Autoren Schwertner et al. wurde im Hinblick auf diese Thematik 1994 erstmals in einer retrospektiven Humanstudie ein negativer Zusammenhang zwischen der Serumbilirubin-Konzentration und koronaren Herzerkrankungen (Coronary artery disea-

se = CAD) bei 877 Männern beschrieben. In Abhängigkeit von Ausmaß der Verengung der Koronargefäße wurden die Herzerkrankungen in drei Kategorien eingeteilt, nämlich <10% (keine messbare Erkrankung), >10% bis <50% (schwacher Erkrankungsgrad) und >50% (schwere Erkrankung). Dabei führte eine Senkung der Gesamtbilirubinlevels um 50% zu einem 47% igen Anstieg der Wahrscheinlichkeit in eine Gruppe mit einem stärker ausgeprägtem Erkrankungsbild zu fallen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass eine niedrige Serumbilirubin-Konzentration mit einem erhöhten Risiko für CAD assoziiert ist, während Bilirubin im oberen physiologischem Konzentrationsbereich mit einem geringeren Erkrankungsrisiko verbunden ist. Die Ausprägung der Beziehung zwischen Bilirubin und CAD war ähnlich der von Rauchen, systolischem Blutdruck und HDL-Cholesterin mit CAD.

Daraus lässt sich schließen, dass eine geringe Konzentration an Serumbilirubin gleich dem Alter, Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin, Blutdruck und Rauchen einen unabhängigen Risikofaktor für CAD darstellt, da Bilirubin ein äußerst wichtiges endogen synthetisiertes Antioxidans im Extrazellulärtraum ist (siehe Kapitel 2.3.1) [Schwertner et al., 1994].

Es folgten zahlreiche Studien auf diesem Themengebiet (siehe Kapitel 2.4.1) und basierend auf der Hypothese, dass jene Mechanismen, die an der Pathogenese der Atherosklerose von Herz- beziehungsweise peripheren Gefäßen beteiligt sind, sowohl bei der Entstehung von bestimmten Krebserkrankungen als auch an der Pathogenese anderer, mit oxidativem Stress assoziierten Erkrankungen eine erhebliche Rolle spielen. Dazu wurde auch der Zusammenhang von Bilirubin mit diesen Konditionen untersucht (siehe dazu Kapitel 2.4.1).

Nach zahlreichen Resultaten, welche die positiven Wirkungen erhöhter Bilirubinspiegel bestätigen, lag es nahe, diese Thematik auch in Hinblick auf Personen mit Gilbert's Syndrom, gekennzeichnet durch unkonjugierte Hyperbilirubinämie (siehe Punkt 2.1.3.1), zu untersuchen.

So wurde schließlich von Vitek et al. 2002 erstmals in einer Humanstudie bei Personen mit Gilbert's Syndrom eine positive Korrelation zwischen Serumbilirubinkonzentrationen

und der totalen antioxidativen Kapazität evaluiert.

Dafür wurde das Studienkollektiv der Follow-Up-Studie (Beobachtungszeitraum 3 Jahre) in fünf Gruppen eingeteilt. Gruppe A bestand aus 50 Personen mit Gilbert's Syndrom, Gruppe B aus 38 Personen mit klinisch manifester ischämischer Herzerkrankung (IHD) und Gruppe C, deren 38 Kontrollpersonen keinerlei Erkrankungen aufwiesen. Gruppe D bestand aus 2296 Probanden, welche dem Vergleich der Prävalenz von CHD der Gesamtbevölkerung mit Gilbert's Syndrom dielten und Gruppe E, bestehend aus 316 gesunden Patienten, sollte den Vergleich zwischen ihnen und GS bezüglich diverser Risikofaktoren für CHD und der Wahrscheinlichkeit an CHD zu erkranken, ermöglichen.

In ihren Untersuchungen kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass bei Personen mit Gilbert's Syndrom mit einer Häufigkeit von 2% signifikant weniger oft koronare Herzkrankheiten auftreten, als im Vergleich zur Gesamtbevölkerung mit einer Prävalenz von 12% ($P < 0,05$). Des Weiteren konnte bei der Gruppe mit Gilbert's Syndrom eine erhöhte gesamte antioxidative Kapazität im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie im Vergleich zur Gruppe B (IHD) gemessen werden ($P < 0,05$). Desgleichen zeigte die Gruppe A (Gilbert's Syndrom) im Vergleich zur Gruppe B (IHD) eine höhere Konzentration an HDL-Cholesterin ($P < 0,05$).

Dieser Zusammenhang zwischen mäßig erhöhten Bilirubinlevels und vermindertem Auftreten von Herz-Kreislaufkrankungen wurde darauf zurückgeführt, dass Bilirubin die antioxidative Kapazität im Blutserum verbessert [Vítek et al., 2002].

Dahingehend konnten die Resultate dieser Diplomarbeit jedoch keinen signifikanten Unterschied bei Gilbert's Syndrom und der Kontrollgruppe bezüglich der untersuchten Parameter aufzeigen (dazu siehe Kapitel 3.4). Es war jedoch zu erkennen, dass die Personen mit Serumbilirubinkonzentrationen von $>36 \mu\text{mol/L}$ die durchschnittlich höchsten Werte bei Retinol und den Carotinoiden aufwiesen, mit Ausnahme von Lycopin. Zusätzlich wurde für dieselben Parameter sowie Glutathion gezeigt, dass Personen mit Gilbert's Syndrom über 30 Jahre die größten Werte aufwiesen, jedoch konnte nur für β -Cryptoxanthin und Glutathion ein höchst signifikanter Unterschied gefunden werden ($P = 0,000$, $P = 0,004$).

Es wurde aber ansonsten kein signifikanter Unterschied in der Konzentration der Anti-

oxidantien im Blutplasma gemessen, was darauf hindeutet, dass die proklamierte, verbesserte antioxidative Kapazität weniger an erhöhten Konzentrationen einzelner Vitamine und Mineralstoffe bei Personen mit Gilbert's Syndrom liegt. Eine Erklärung hierfür sind womöglich die Wirkungen von Bilirubin (eine Übersicht bietet die Tabelle 2.3.1), speziell unter pathologischen Bedingungen, wodurch nicht der Verbrauch anderer Antioxidantien, aber die Entstehung von Oxidationsprodukten verringert wird. So haben Folgeschäden von oxidativen Stress ein viel geringeres Ausmaß.

In einer Fall-Kontrollstudie von Bulmer et al. 2008b wurden Kennzeichen von oxidativen Stress und dem antioxidativen Status, mit dem Hauptaugenmerk auf dem Zusammenhang zwischen erhöhten Bilirubinkonzentrationen und Schutz vor Cu^{2+} -induziertem Stress [Asad et al., 2001] im Serum bei 9 Personen mit Gilbert's Syndrom und 12 Kontrollen untersucht. Für die Bewertung dieses Zusammenhangs wurden die „Trolox equivalent antioxidant capacity“ (TEAC), die „Ferritin reducing ability of plasma“ (FRAP), Werte für Leberenzyme, die Konzentration an Gesamtcholesterin, HDL-Cholesterin und Triglyceride sowie Glucose, Malondialdehyd, Harnsäure, und die Enzyme Superoxid-Dismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase der Probanden gemessen.

Personen mit Gilbert's Syndrom zeigten signifikant erhöhte Werte an TEAC ($P = 0,035$) und es konnte eine deutlich vermehrte FRAP ($P = 0,024$) nachgewiesen werden.

Die Lag-Phase im Verlauf der Cu^{2+} -induzierten Oxidation des Serums war mit $121,4 \pm 10,5$ Minuten deutlich länger bei GS ($P = 0,020$), als in der Kontrollgruppe mit $106,8 \pm 14,6$ Minuten und konnte zudem in einem positiven Zusammenhang mit den Bilirubinkonzentrationen gesehen werden ($P = 0,040$). Des Weiteren konnte eine starke, jedoch nicht-signifikante Korrelation zwischen der Lag-Phase und FRAP sowie TEAC gefunden werden.

Für alle anderen genannten Parameter, zum Beispiel Harnsäure, welche als extrazellulär wirksames Antioxidans gilt [Neužil und Stocker, 1994], konnten keine signifikanten Unterschiede oder Zusammenhänge festgestellt werden [Bulmer et al., 2008b].

Die Gründe hierfür liegen möglicherweise darin, dass Bilirubin in mäßig erhöhten Konzentrationsbereichen, wie sie Personen mit Gilbert's Syndrom aufweisen [Iyanagi et al.,

1998], keinen sparenden Effekt auf weitere antioxidative Substanzen zeigt, da es, gleich der Harnsäure, Thiolen und den lipophilen Verbindungen α -Tocopherol, Ubichinol-10, Lycopin und β -Carotin, zwar die Rate der Lipidperoxidation senken und verlangsamen kann, aber die genannten Antioxidantien sind nicht dazu in der Lage, dessen Initiierung zu verhindern. In der wässrigen Phase ist lediglich Ascorbinsäure dazu befähigt, da sie anhand ihrer reduzierenden Eigenschaften Oxidantien inaktiviert, bevor diese wirken können [Frei, 1991].

Bilirubin kann jedoch effektiv bei der Abwehr von oxidativen Stress helfen, da es Teil des komplexen Abwehrmechanismus ist, an dem unterschiedliche Substanzen, aber auch Enzym-Kaskaden wichtige Funktionen übernehmen [Neužil und Stocker, 1994].

Im Zuge der vorliegenden Studie wurde ebenfalls die „Oxygen radical absorbance capacity“ (ORAC) gemessen. Es konnte jedoch bezüglich dieses Parameters kein signifikanter Unterschied zwischen Personen mit Gilbert's Syndrom und der Kontrollgruppe erkannt werden, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Bulmer et al. 2008b.

So kommt womöglich das antioxidative Potential von unkonjugiertem Bilirubin erst unter pathophysiologischen Bedingungen zum Tragen, wo aufgrund des effizienten „Scavenging“ reaktive (Sauerstoff-)Verbindungen inaktiviert werden und so oxidative Stressreaktionen weniger starke Auswirkungen zeigen. Es konnte nämlich im Verlauf der Gesamtstudie keine signifikante Differenz der Konzentration der intrazellulär antioxidativ wirkenden Enzyme Katalase, Glutathion-Peroxidase und Superoxid-Dismutase betreffend der Fall- und Kontrollgruppe aufgezeigt werden.

Das Ziel der Studie von Hagymási et al. 2003 war es, den Redox-Status und das Gleichgewicht zwischen freien Radikalen und Antioxidantien in 12 Patienten mit Gilbert-Syndrom im Vergleich zu 15 gesunden Kontrollpersonen zu untersuchen.

Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass eine milde Hyperbilirubinämie eine erhöhte Konzentration an SH-Verbindungen, gesteigerte H-Donor-Fähigkeit und reduzierende Eigenschaften im Blutserum bewirkt ($P < 0,05$). Es konnten jedoch keine signifikanten Korrelationen zwischen der Bilirubinkonzentration und der Konzentration an SH-Verbindungen als auch der H-Übertragungs-Fähigkeit aufgezeigt werden, wohingegen ein mit-

telstarker Zusammenhang ($r = 0,408$, $P = 0,025$) zwischen der Bilirubinkonzentration im Plasma und der reduzierenden Eigenschaften im Serum gemessen wurde.

Eine Erklärung der Resultate ist, dass Bilirubin, infolge seiner antioxidativen Eigenschaft, den Verbrauch von SH-Verbindungen und anderen antioxidativen Verbindungen und Molekülen im Blutplasma reduzieren und somit die antioxidative Kapazität von Geweben verstärken kann.

Andererseits konnte keine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen freien Radikalen und Antioxidantien nachgewiesen werden und es konnten desgleichen keine signifikanten Unterschiede bezüglich Blutserum, Blutplasma und Erythrozyten zwischen den beiden Studiengruppen gemessen, was mit den Ergebnissen aus der vorliegenden Studie einher geht, da gleichfalls keine erhöhte Konzentration an antioxidativ wirksamen Verbindungen gemessen werden konnte.

Anhand dieser Ergebnisse ist anzunehmen, dass eine erhöhte Bilirubinkonzentration, entweder über indirekte oder kompensatorischen Effekte die nichtenzymatische antioxidative Kapazität des Blutplasmas verstärkt, ohne Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen freien Radikalen und Antioxidantien [Hagymási et al., 2003].

Eine erst kürzlich publizierte Studie von Boon et al. 2012 konnte hingegen bei 22 Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zu einem ihnen angepassten Kontrollkollektiv sowohl in ihrem antioxidativen Status, ihrem Lipidprofil als auch bezüglich Kennzeichen oxidativen Stresses im Blutplasma merkliche Differenzen aufzeigen.

Nach der Auswertung der Resultate konnten die Autoren dieser Fall-Kontrollstudie signifikant höhere Werte für reduziertes Thiol ($P = 0,015$) und reduziertes Glutathion (GSH) ($P < 0,001$) in den Plasmaproben der GS-Stichprobe messen und zudem wurde eine positive Korrelation dieser Parameter mit der Serumbilirubinkonzentration festgestellt (beide $P < 0,01$).

Für die antioxidativen Parameter TEAC, Harnsäure und Ascorbinsäure konnten, so wie in der vorliegenden Arbeit, keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gefunden werden.

Zusätzlich wurden von Boon et al. 2012 Kennzeichen für oxidativen Stress, nämlich

das Verhältnis zwischen oxidiertem zu reduziertem Glutathion (GSH:GSSG), die Konzentration an Proteincarbonyl-Verbindungen und die Konzentration an oxidierten LDL-Partikeln erhoben.

Das Ergebnis waren eine signifikant höhere GSH:GSSG-Ratio bei Personen mit Gilbert's Syndrom ($P < 0,001$), welche mit der Höhe der Bilirubinkonzentration korrelierte ($P < 0,01$).

Desgleichen wurde zwischen der Konzentration an Proteincarbonyl-Verbindungen und den Serumbilirubinkonzentration ein negativer Zusammenhang gefunden ($P < 0,001$).

Zudem waren die Werte für oxidierte LDL-Partikel in der Fallgruppe signifikant erniedrigt ($P = 0,011$).

Fakt ist daher, dass bei Personen mit Gilbert's Syndrom die Auswirkungen und Folgeerscheinungen von oxidativen Stress deutlich verringert sind und folglich das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen merklich erniedrigt ist, was bereits in Studien zuvor belegt werden konnte. Und dieser Effekt steht im positiven Zusammenhang mit der Konzentration an Serumbilirubin (für einzelne Studien siehe Kapitel 2.4.1).

Die Ergebnisse der publizierten Studien könnten also dahingehend mit den Resultaten dieser Arbeit einhergehen, als dass eine ausgeprägte totale antioxidative Kapazität weniger mit erhöhten Konzentrationen an einzelnen Antioxidantien assoziierbar ist, sondern womöglich auf ein effizientes gesamtes Abwehrsystem zurückzuführen ist, dessen protektiven Wirkungen besonders unter pathologischen Bedingungen zum Tragen kommen, was durch geringere Werte für Marker von oxidativem Stress gekennzeichnet ist. Das lässt vermuten, dass die verringerte Prävalenz von Herz-Kreislaufkrankungen, bestimmter Krebserkrankungen sowie anderer, durch oxidativen Stress induzierter Erkrankungen die Folge der divergenten cytoprotektiven, DNA-protektiven und anti-inflammatorischen Effekten des Bilirubins ist (siehe Kapitel 2.3.1).

Dahingehend konnte man anhand der Resultate dieser Diplomarbeit jedoch keine Aussagen tätigen, da in dieser Arbeit der Status von Antioxidantien bei gesunden Probanden ermittelt wurde. Die Kontrollgruppe unterschied sich lediglich in ihrer UCB-Konzentration

von der Fallgruppe und es wurden vorab alle Personen mit vorangegangenen chronischen Erkrankungen, auch das Herz-Kreislaufsystem betreffend, ausgeschlossen. Das heißt, es lag bei keiner der beiden Gruppen eine pathologische Situation vor, was möglicherweise zu diesem insignifikanten Gesamtergebnis führt (dazu siehe Kapitel 3.4). Zudem war das Durchschnittsalter der Gruppen mit $32,3 \pm 11,8$ Jahren (Gilbert's Syndrom) und $31,9 \pm 11,2$ Jahren (Kontrolle) sehr gering.

Zusätzliche Anhaltspunkte für diese Hypothese bieten Ergebnisse aus Studien, etwa der Autoren Lingenhel et al. 2008. In einer retrospektiven Fall-Kontroll-Studie konnten sie einen Zusammenhang zwischen niedrigen Serumbilirubinkonzentrationen und dem Auftreten von koronaren Herzerkrankungen bei Männern und Frauen herstellen und haben diesen Zusammenhang zusätzlich im Hinblick auf zwei Polymorphismen (UGT1A1-53 Promotor-Polymorphismus und 3279T>G Polymorphismus), wie sie bei Gilbert's Syndrom auftreten, untersucht [Lingenhel et al., 2008].

Dabei wurde bei 477 Probanden mit vorangegangener koronarer Herzkrankheit im Vergleich zu 619 Personen der Kontrollgruppe untersucht und festgestellt, dass das Auftreten der beiden Polymorphismen unabhängig von koronaren Events war.

Die Konzentration an Bilirubin hingegen war bei Probanden der Fallgruppe um etwa 20% niedriger ($P < 0,05$), als in der Kontrollgruppe und es zeigte sich ein starker Zusammenhang mit den genotypischen Variationen.

Eine Beziehung zwischen den beiden Polymorphismen und dem Auftreten von CAD konnte nicht erkannt werden. Desgleichen konnte aus den Resultaten der CAVISIC-Studie kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des UGT1A1-TA-repeat Genotypes und Patienten mit Claudicatio intermittens hergestellt werden. Die Serumbilirubinlevels jedoch waren bei den Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt ($P < 0,001$) [Rantner et al., 2008].

Dieselbe Beziehung konnte von Hsieh et al. 2008 zwischen Serumbilirubin und Patienten mit Erkrankungen der Koronararterien im Vergleich zu einer Kontrollgruppe hergestellt werden. Die beiden Gruppen konnten signifikante Unterschiede bezüglich ihrer Serumbilirubinwerte, jedoch nicht bezüglich des UGT1A1-Polymorphismus aufweisen.

Diese Ergebnisse bestätigen erneut die These, dass niedrige Konzentrationen an Plasmapigmenten mit der Prävalenz und dem Risiko von kardiovaskulären Events assoziiert sind [Lingenhel et al., 2008].

Zu diesem Ergebnis und dieser Schlussfolgerung kamen bereits die Autoren Bosma et al. 2003 nach Auswertungen von Daten der „Rotterdam Study“ und wurden ebenfalls von Gajdos et al. 2006 anhand der ECTIM-Studie erzielt.

Auf Grund der Häufigkeit und der Auswirkung auf die Serumbilirubinkonzentration lag die Annahme nahe, dass das UGT1A1-*28 Allel mit einem verringerten Risiko für Herz-Kreislauferkrankungen assoziiert ist. Die Ergebnisse, dass bei Anwesenheit des Allels UGT1A1*28, obwohl es in weiterer Folge zu mäßig erhöhten Bilirubinkonzentrationen führt, welche mit einem verminderten Risiko für CHD verbunden sind, keine direkte Korrelation nachzuweisen ist, waren daher überraschend.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass Bilirubin in Serum nicht alleine von der Ausscheidungsrate, und somit vom Enzym UDP-Glucuronosyltransferase abhängig sind, sondern zugleich auch von der Produktionsrate. Die Aktivität der Häm-Oxygenase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Bilirubinsynthese, kann eine Erklärung für die beobachtete inverse Assoziation zwischen Serum-Bilirubin und koronaren Herzkrankheiten darstellen, da zudem der erhöhte Abbau von Häm und die erhöhte Produktion von Kohlenmonoxid, ein aktiver Vasodilatator, oder beide Prozesse kardioprotektiv wirken [Mayer, 2000; Bosma et al., 2003].

Im Hinblick darauf wurde erst kürzlich eine Studie von Zelenka et al. 2012 publiziert. In ihren Untersuchungen haben die Autoren den intrazellulären Metabolismus und die antioxidativen Eigenschaften von unkonjugiertem Bilirubin unter oxidativen Stressbedingungen und unter Einwirkung von Lipopolysacchariden in humanen Hepatoblastoma HepG2 Zellen und Gewebeproben von Wistar-Ratten evaluiert.

Ihren Auswertungen zufolge sind die erhöhten Serumbilirubinlevel und die Induktion der Häm-Oxygenase 1 mit Entzündungsreaktionen sowie oxidativen Stressreaktionen assoziierbar. Das heißt, es kommt intrazellulär zu einer Erhöhung der Konzentration an unkonjugiertem Bilirubin, wodurch die Lipidperoxidation reduziert wird.

Dadurch wird die These, dass die protektiven Effekte der, durch Hyperbilirubinämie induzierten gesteigerten Expression der Häm-Oxygenase zu einem erheblichen Teil auf die darauf folgende intrazelluläre Akkumulation von unkonjugiertem Bilirubin zurückzuführen ist [Nakagami et al., 1993; Willis et al., 1996; Zelenka et al., 2012], gestützt.

Eine weitere Erklärung dafür ist, dass niedrigere Serumbilirubin-Konzentrationen bei Patienten mit koronaren Herzerkrankungen, als Folge der erhöhten oxidativen Kapazität, den gesteigerten Verbrauch an Antioxidantien reflektiert [Bosma et al., 2003].

Bezieht man diese Resultate und Schlussfolgerungen auf die Ergebnisse dieser Diplomarbeit, könnte die letzt genannte These zusätzlich dadurch gestützt werden, dass es dergleichen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Fall- und Kontrollgruppe bezüglich ihrer Plasmakonzentration an Antioxidantien, den antioxidativ wirksamen Enzymen Glutathionperoxidase, Katalase und Superoxid-Dismutase sowie der ORAC gibt. Wie bereits zuvor erwähnt, wäre ein Unterschied möglicherweise unter oxidativen Stressreaktionen zu erkennen.

Bezüglich der Assoziation mit Kohlenmonoxid und der Häm-Oxygenase kann anhand der vorliegenden Studie keine Aussage getätigt werden.

Diese jüngsten retrospektiven und prospektiven Studien zeigen, dass Serumbilirubinkonzentrationen im oberen physiologischen Konzentrationsbereich und mäßig erhöhte Werte für Serumbilirubin vor kardiovaskulären Erkrankungen schützen.

Prospektive Studien konnten zudem auch zeigen, dass Personen mit Gilbert's Syndrom, welche eine moderate Erhöhung in ihrer Serumbilirubin-Konzentration aufweisen, ein geringeres Risiko für koronare Herzkrankheiten und kardiovaskuläre Erkrankungen zeigen (siehe Kapitel 2.4.1). Eine schützende Wirkung von gesteigertem Bilirubin im Serum konnte bei Frauen nicht eindeutig gefunden werden [Schwertner und Vitek, 2008].

Dennoch müssen weitere prospektive Studien durchgeführt werden, um zu klären, ob die proklamierte verringerte Mortalität infolge kardiovaskulärer Erkrankungen [Wei et al., 2000c; Lin et al., 2006] allein dem erhöhten Bilirubin zuzuordnen ist, oder ob weitere schützende Faktoren wie die Häm-Oxygenase 1 und Kohlenmonoxid synergetisch wirken.

Die meisten Studien am Menschen haben sich auf die Beziehung von Serumbilirubin und dem Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen konzentriert, somit bedarf die Assoziation zwischen Bilirubin und anderen Krankheiten, nämlich bestimmte Formen von Krebs, rheumatologischen und neuropsychiatrischen Erkrankungen weiterer Untersuchungen.

Einen weiteren Grund für die mangelhafte Vergleichbarkeit bisher durchgeführter Studien mit dieser Arbeit liefert die Tatsache, dass die Humanstudien bislang die Rolle von Bilirubin im Hinblick auf chronische Krankheiten untersucht haben [Schwertner und Vitek, 2008] und keine Untersuchung bis dato ein vergleichbares Studiendesign aufweist.

Medikamente, die Ernährungsweise und Bewegung könnten zudem die Serumbilirubin-Konzentration verändern und sollten somit als Einflussfaktoren in Studien miteinbezogen werden.

In keiner vergleichbaren Studie, wie zuvor erwähnt, wurde bis dato der Status von Vitamin A, Vitamin E, Vitamin K, Carotinoiden oder Ubichinon 50 im Blutplasma von Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zu einer Kontrollgruppe erhoben, obwohl zahlreiche Studien die positiven Effekte dieser Mikronährstoffe belegen konnten und zusätzlich Studien der letzten Jahre Ergebnisse bezüglich des Einflusses von Vitamin K auf kardiovaskuläre Erkrankungen und proinflammatorische Cytokine hervor brachten [Shea et al., 2008; Booth, 2009].

Bis dato gibt es fast ausschließlich Daten aus In vitro-Studien die zeigen, dass Vitamin K mit einer verringerten Produktion von proinflammatorischen Cytokinen assoziiert ist [Ohsaki et al., 2006] und somit eine Rolle in der Erhaltung der Gesundheit von Herz und peripheren Gefäßen spielt [Erkkila et al., 2007].

Shea et al. 2008 haben nach Auswertung der Daten von 1381 Probanden der Framingham Offspring Study eine negative Korrelation zwischen der Plasmakonzentration an Phyllochinon und dem Gesamtindex der untersuchten Entzündungsparameter ($P < 0,01$) gefunden. Zusätzlich wurde eine negative Korrelation der Entzündungsmarker CD40 Ligand, intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1, Interleukin-6, Osteoprotegerin und Tumor necrosis factor Rezeptor-2 und Phyllochinon nachgewiesen ($P < 0,01$) [Shea et al., 2008].

Mögliche protektive Effekte von Vitamin K bei der Entstehung von kardiovaskulären Er-

krankungen können aufgrund der vorliegenden Daten aus Studien noch nicht ausgesprochen werden. Es wird jedoch angenommen, dass Vitamin K die Verkalkung von Gefäßen reduzieren kann [Booth, 2009].

Die Daten der vorliegenden Arbeit legten in dieser Hinsicht beim Vergleich der beiden Studiengruppen keine signifikanten Unterschiede dar. Hier sollte jedoch erwähnt werden, dass sich das Durchschnittsalter der Probanden von Shea et al. 2008 mit 59 ± 8 Jahren im Vergleich zu der vorliegenden Studie (32 ± 11 Jahre) deutlich unterscheidet.

Ein interessantes Resultat ist, dass beim Vergleich der durchschnittlichen Werte der untersuchten Parameter von Frauen im Vergleich zu Männern eine allgemeine Tendenz dahingehend erkennbar war, als dass die weiblichen Probanden im Mittel höhere Plasmakonzentrationen für Retinol, Lutein, β -Cryptoxanthin, α -Carotin, β -Carotin, α -Tocopherol, γ -Tocopherol, Phyllochinon, Ascorbinsäure sowie Glutathion aufweisen (dazu siehe Kapitel 3.4). Diese Unterschiede waren jedoch lediglich für das Carotinoid Lutein signifikant ($P < 0,000$).

Ausnahmen dieses Trends waren Werte für Lycopin und Ubichinon 50, für welche bei Männern gering höhere Mittelwerte gemessen wurden.

Ähnliche Resultate wurden auch von Al-Delaimy et al. 2004, die Carotinoide betreffend, nach Auswertung von Daten der EPIC-Studie hervor gebracht. Ihren Ergebnissen zufolge wiesen Frauen höhere Werte für alle untersuchten Carotinoide, nämlich α -Carotin, β -Carotin, β -Cryptoxanthin, Lutein und Zeaxanthin auf. Einzige Ausnahme war Lycopin, was zudem mit Resultaten aus anderen Publikationen, etwa von Ito et al. 1990 oder von Olmedilla et al. 1994 oder Auswertungen der EURAMIC-Studie (EUROpean study on Antioxidants, Myocardial Infarction and Cancer of the breast) zufolge, einher geht.

Diese von einander abweichenden Plasmakonzentrationen bei Frauen und Männern, auch andere Vitamine und Mineralstoffe betreffend, entstehen womöglich anhand quantitativer und qualitativer (bezogen auf die Energieaufnahme) Unterschiede bezüglich der Aufnahme, Absorption und Verstoffwechslung der Carotinoide.

Hormonelle Veränderungen während des Menstruationszyklus haben ebenso gezeigt, dass

sie die Carotinoid-Serumspiegel bei Frauen beeinflussen können [Al-Delaimy et al., 2004]. Zusätzlich wird die Bioverfügbarkeit von Carotinoiden und anderen Mikronährstoffen aus Obst und Gemüse erheblich durch die Be- und Verarbeitung, besonders während der Zubereitung beeinflusst. Andererseits ist die Bioverfügbarkeit jener Carotinoide, welche nicht an Protein-Komplexe gebunden sind, wie sie beispielsweise in den Lebensmittelzusatz- oder Farbstoffen vorkommen, hoch, und diese werden zunehmend verwendet [Al-Delaimy et al., 2004].

So konnte in dieser Diplomarbeit ein Zusammenhang der untersuchten Carotinoide und Vitamin A untereinander festgestellt werden. Es wurde gezeigt, dass insbesondere der Gehalt an Lutein schwach positiv mit der Plasmakonzentration an Retinol ($r = 0,332$, $P = 0,005$), an β -Cryptoxanthin ($r = 0,307$, $P = 0,011$), an α -Carotin ($r = 0,339$, $P = 0,007$), an β -Carotin ($r = 0,345$, $P = 0,004$) sowie mittelstark mit der Konzentration an Lycopin ($r = 0,589$, $P = 0,000$) korreliert.

Zusätzlich steht der Gehalt an Lycopin im Blutplasma in einem positiven Zusammenhang mit Retinol, als auch von β -Cryptoxanthin ($r = 0,389$, $P = 0,001$; $r = 0,435$, $P = 0,000$). Die beiden Carotinoide α - und β -Carotin stehen in einer starken positiven Beziehung zueinander ($r = 0,741$, $P = 0,000$).

Weiters konnte der Gehalt an α -Tocopherol in einem mittelstarken positiven Zusammenhang mit dem Plasmaspiegel an γ -Tocopherol gebracht werden ($r = 0,499$, $P = 0,000$).

Desgleichen wurde eine schwache positive Beziehung zwischen der Konzentration an Phyllochinon und Ascorbinsäure gemessen ($r = 0,321$, $P = 0,006$).

Darüber hinaus wurde in der Bilirubin-Studie eine schwach positive beziehungsweise mittelstarke Korrelation der Werte für Ubichinon 50 und Lutein ($r = 0,330$, $P = 0,006$) sowie Lycopin ($r = 0,429$, $P = 0,000$) und Retinol ($r = 0,570$, $P = 0,000$) nachgewiesen. Zudem steht Ubichinon 50 in einem schwach positiven Zusammenhang mit der Plasmakonzentration an Glutathion ($r = 0,344$, $P = 0,004$).

Die Saison ist ein weiterer wichtiger Faktor für die Konzentration der exogen zugeführten Antioxidantien im Plasma, da verschiedene Kriterien wie Licht und Temperatur den Mikronährstoffgehalt spezifischer Früchte und Gemüse beeinflussen.

Die Abhängigkeit des Verzehrs von Obst und Gemüse von der Jahreszeit ist in den Industrieländern, wegen der Verfügbarkeit dieser Produkte das ganze Jahr hindurch, zurückgegangen. Dennoch ist es wahrscheinlich, dass saisonale Früchte und Gemüse, welche die Hauptquelle, beispielsweise bestimmter Carotinoide, etwa Tomaten für Lycopin oder Zitrusfrüchte für β -Cryptoxanthin, darstellen, eine bedeutende Wirkung auf die Mikronährstoffgehalte im Blutplasma haben.

Der Zeitpunkt der Blutabnahme ist daher eventuell ein weiterer wichtiger Aspekt, den man im Verlauf einer Studie beachten sollte [Cooney et al., 1995; Al-Delaimy et al., 2004].

Nach Auswertung der Daten der vorliegenden Studie konnte jedoch keine Korrelation zwischen dem Zeitpunkt der Blutabnahme (Die Blutproben wurden von Mai bis Oktober gesammelt) und dem Gehalt der einzelnen Parameter im Blutplasma der Probanden gefunden werden.

Des Weiteren wurde kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Antioxidantien, mit Ausnahme von α -Carotin, und dem Body Mass Index der Studienteilnehmer nachgewiesen. Bezüglich der Konzentration an α -Carotin zeigten nämlich jene Probanden mit einem BMI von $>25 \text{ kg/m}^2$ signifikant geringere α -Carotinwerte ($P = 0,046$), was Ergebnisse aus anderen Studien, etwa von Al-Delaimy et al. 2004 gegenüber steht.

Zusätzlich sollte an dieser Stelle erwähnt werden, dass jene Probanden mit einem BMI von $>25 \text{ kg/m}^2$ signifikant geringere UCB-Konzentrationen aufwiesen ($P = 0,003$). Zudem war erkennbar, dass jene Gruppe mit der höchsten UCB-Konzentration den im Mittel geringsten BMI hatte, und mit sinkender UCB-Konzentration der Gruppe der durchschnittliche BMI zunahm. Ähnliche Resultate konnten auch in anderen Studien erzielt werden [Gullu et al., 2005; Kimm et al., 2009; Li et al., 2011].

Bezüglich des Alters zeigten, so in anderen Publikation davor, etwa von Ito et al. 1990, die Probanden, welche über 30 Jahre alt waren signifikant höhere Plasmakonzentrationen an Retinol ($P = 0,037$), β -Cryptoxanthin ($P = 0,008$) und Lycopin ($P = 0,013$) und es war eine Tendenz dahingehend auch bei α -Carotin zu erkennen ($P = 0,093$).

Zusätzlich konnte festgestellt werden, dass alle Studienteilnehmer ausreichend mit Retinol versorgt sind, da alle Probanden eine Plasmakonzentration von mehr als $0,7 \mu\text{mol/L}$ aufwiesen und somit von einer adäquaten Versorgung mit Vitamin A ausgegangen werden kann [Biesalski, 2010].

Laut den D-A-CH-Referenzwerten wird ab einer Plasmakonzentration an β -Carotin von $\geq 0,4 \mu\text{mol/L}$ von einem ausreichenden Versorgungszustand gesprochen [Biesalski, 2010]. Dieser Grenzwert wurde von etwa 38% des Studienkollektives nicht erreicht und bei fast 31% wurden stark erniedrigte Werte ($\leq 0,35 \mu\text{mol/L}$) gemessen. Lediglich 35% der Studienteilnehmer konnten befriedigende Werte ($\geq 0,75 \mu\text{mol/L}$) aufweisen [Elmadfa et al., 2004].

Aufgrund dessen, dass β -Carotin, gleich den anderen Carotinoiden zahlreiche positive Effekte für den Organismus, etwa ein verringertes Risiko für bestimmte Krebsarten und Herz-Kreislaufkrankungen zugeschrieben werden, ist eine ausreichende Versorgung mit diesen Mikronährstoffen empfehlenswert.

Für die anderen untersuchten Carotinoide existieren bislang noch keine eindeutig festgelegten Referenzwerte bezüglich ihrer Plasmakonzentration, aber Erfahrungswerte aus zahlreichen Untersuchungen, die angeben, in welchem Bereich sich die jeweiligen Plasmakonzentrationen bewegen.

So wurde für α -Carotin ein Konzentrationsbereich von $0,05$ - $0,1 \mu\text{mol/L}$ [Di Mascio et al., 1989; Sies und Stahl, 1995] vorgeschlagen.

Der untere Grenzwert wurde von keinem Studienteilnehmer unterschritten und bei knapp 72% der teilnehmenden Frauen und Männer wurden höhere Werte als $0,1 \mu\text{mol/L}$ gemessen, wobei an dieser Stelle angemerkt werden sollte, dass jene Probanden mit Gilbert's Syndrom mit einem Anteil von mehr als 80% im Gegensatz zu knapp 61% der Kontrollgruppe eine α -Carotinkonzentration von mehr als $0,1 \mu\text{mol/L}$ aufwiesen.

Desgleichen konnte bei allen teilnehmenden Probanden eine Lycopinkonzentration von mindestens $0,05 \mu\text{mol/L}$ nachgewiesen werden.

Der angegebene Konzentrationsbereich für Lutein im Plasma rangiert von $0,1$ bis $0,3$

$\mu\text{mol/L}$ [Di Mascio et al., 1989; Sies und Stahl, 1995]. Bei diesem Carotinoid wurde gleichfalls der untere Grenzwert von keinem Probanden unterschritten und bei knapp 38% der Studienteilnehmer konnten höhere Werte für Lutein im Plasma als $0,3 \mu\text{mol/L}$ aufgezeigt werden. Auch hier sollte angemerkt werden, dass beim Vergleich der Fall- und Kontrollgruppe in jener mit Gilbert's Syndrom mit etwa 45% Anteil mehr Personen den oberen Grenzwert überschritten, im Gegensatz zu knapp 31% der Kontrollgruppe.

Der Richtwert für die β -Cryptoxanthinkonzentration im Plasma von $0,3 \mu\text{mol/L}$ [Di Mascio et al., 1989] und Werte darüber wurden nur bei knapp 16% der Studienteilnehmer gemessen.

Bezüglich der Plasmaspiegel an α -Tocopherol lagen alle fast Messwerte im Normbereich, das heißt über einer Konzentration von $16,3 \mu\text{mol/L}$ [Elmadfa et al., 2004].

Bei zwei Probanden wurden leicht (13 – $16,3 \mu\text{mol/L}$) beziehungsweise stark erniedrigte Werte ($\leq 13 \mu\text{mol/L}$) nachgewiesen.

Für die Primärprävention von Herz-Kreislaufkrankungen und Krebs wird ein Plasmaspiegel $\geq 30 \mu\text{mol/L}$ als erstrebenswert angesehen [Biesalski, 2010]. Dieser Schwellenwert konnte bei rund 61% der Untersuchten überschritten werden. Hier sollte erwähnt werden, dass mit einem Anteil von etwa 68% die Personen des Kontrollkollektives häufiger $30 \mu\text{mol/L}$ und mehr aufwiesen, im Vergleich zu 53% der Probanden mit Gilbert's Syndrom.

Bis dato wurde für γ -Tocopherol noch kein Referenzwert definiert, obwohl von Sies und Stahl 1995 und von Aust et al. 2001 Werte in einem Bereich von 3 – $5 \mu\text{mol/L}$ angegeben wurden.

Dieser Bereich wurde lediglich von 7% des Studienkollektives erreicht und erscheint, nach zusätzlichem Abgleich mit anderen Publikationen etwas hoch. Zudem konnte für α -Tocopherol eine ausreichende Versorgung festgestellt werden.

Die Versorgung mit Phyllochinon ist anhand der Messwerte indessen nur bei knapp 29% des gesamten Studienkollektivs als ausreichend ($\geq 0,38 \text{ nmol/L}$) zu betrachten.

Bei etwa 68% der untersuchten Männer und Frauen traten leicht erniedrigte Statuswerte an Phyllochinon ($< 0,37 \text{ nmol/L}$) auf [Elmadfa et al., 2004].

Bei Ubichinon 50 zeigten sich nach Abgleich mit Angaben aus der Literatur von 0,4–1,0 $\mu\text{mol/L}$ [Sies und Stahl, 1995] entsprechende Werte. So wurde von knapp 22% des Studienkollektives der untere Grenzwert unterschritten und von etwa 11% wurde eine höhere Konzentration an Ubichinon 50 gemessen.

Des Weiteren konnte bei allen Studienteilnehmern festgestellt werden, dass sie ausreichend mit Vitamin C versorgt sind, da bei allen Probanden mehr als 45,4 $\mu\text{mol/L}$ Ascorbinsäure im Plasma gemessen wurden [nach Elmadfa et al. 2004].

Zur Konzentration des Glutathions in den Erythrozyten konnten Angaben von, auf Labor Diagnostik spezialisierten, Untersuchungsanstalten zum Vergleich herangezogen werden. Die gemessenen Werte aller Studienteilnehmer lagen im Referenzbereich von 1,8–3,6 mmol/L und es kann somit mit einer ausreichenden Versorgung durch Eigensynthese und exogener Zufuhr ausgegangen werden.

4.8.1 Schlussbetrachtung

Die Resultate dieser Diplomarbeit zeigen, dass sich Personen mit Gilbert's Syndrom in ihrer Konzentration an lipophilen beziehungsweise hydrophilen Antioxidantien von Personen mit Plasmalevels an unkonjugiertem Bilirubin im physiologischen Normbereich, nicht unterscheiden.

Die proklamierte, verbesserte antioxidative Kapazität bei Personen mit Gilbert's Syndrom liegt also womöglich weniger an erhöhten Konzentrationen einzelner Vitamine und Mineralstoffe, bedingt durch einen einsparenden Effekt des Bilirubins, sondern Bilirubin in mäßig erhöhten Konzentrationsbereichen zeigt divergente antioxidative, cytoprotektive, DNA-protektive und anti-inflammatorische Effekte.

Zudem lassen die meisten bisher publizierten Studien vermuten, dass diese protektiven Wirkungen besonders unter pathologischen Bedingungen zum Tragen kommen, da sowohl die retrospektiven, als auch prospektiven Untersuchungen bisher die Rolle von Bilirubin im Hinblick auf chronische Krankheiten untersucht haben und sich bislang insbesondere auf die Beziehung von Serumbilirubin und dem Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen konzentriert haben.

Somit bedarf die Assoziation zwischen Bilirubin und Erkrankungen, wie zum Beispiel bestimmte Formen von Krebs, rheumatologische und neuropsychiatrische Erkrankungen gleichermaßen weiterer Untersuchungen. Da zudem in all den bis dato durchgeführten Studien eine verringerte Prävalenz dieser, durch oxidativen Stress induzierter Erkrankungen bei Personen mit erhöhten Serumbilirubinwerten, infolge eines verbesserten totalen antioxidativen Status nachgewiesen werden konnte.

Durch welche Faktoren der antioxidative Status verbessert wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass Bilirubin im Serum nicht allein durch das Enzym UDP-Glucuronosyltransferase abhängig ist, sondern zugleich auch von der Produktionsrate. Die Aktivität der Häm-Oxygenase, das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Bilirubinsynthese, kann eine Erklärung für die beobachtete inverse Assoziation zwischen Serum-Bilirubin und koronaren Herzerkrankungen darstellen, da zudem der erhöhte Abbau von Häm, die erhöhte Produktion von Kohlenmonoxid, ein aktiver Vasodilatator, oder beide Prozesse kardioprotektiv wirken.

Des Weiteren können die Ernährungsweise, Bewegung und Xenobiotika die Serumbilirubin-Konzentration beeinflussen.

Daher müssen weitere prospektive Studien durchgeführt werden, um zu klären, ob die verringerte Mortalität infolge kardiovaskulärer Erkrankungen allein dem erhöhten Bilirubin zuzuordnen ist, oder ob zusätzliche schützende Faktoren, wie die Häm-Oxygenase 1 und Kohlenmonoxid stärker zu beachten sind.

5 Zusammenfassung

Da Herz-Kreislaufkrankungen gefolgt von Tumorerkrankungen weltweit nach wie vor die häufigsten Todesursachen darstellen, ist das Gebiet der Ursachen- und Präventionsforschung ein äußerst Wichtiges.

Aufgrund der Tatsache, dass Herz-Kreislaufkrankungen global noch für durchschnittlich 30% der Todesfälle und in Europa sogar für 48% der Todesfälle verantwortlich sind, könnten neue Forschungsansätze erhebliche Auswirkungen auf die Prävention und Therapie etwa von kardiovaskulären Erkrankungen, Krebs sowie anderen, mit oxidativen Stress assoziierten Krankheiten haben.

Aus diesem Grund wurde am Institut für Ernährungswissenschaften der Universität Wien eine epidemiologische, randomisierte Fall-Kontrollstudie in Kooperation mit der Griffith University Australia, der University of Queensland, Australia, dem Department of Pharmacognosy der Universität Wien sowie dem Department of Clinical Pharmacology der University Hospital, Kopenhagen (Dänemark) durchgeführt.

Ziel dieser Studie war es, den antioxidativen Status von Personen mit Gilbert's Syndrom im Vergleich zu einer Kontrollgruppe zu untersuchen, um mögliche positive Auswirkungen mäßig erhöhter Bilirubinspiegel auf die Gesundheit zu evaluieren.

Zur Beurteilung des antioxidativen Status wurde die Plasmakonzentration von Retinol, fünf ausgewählter Carotinoide (Lutein, β -Cryptoxanthin, Lycopin, α -Carotin, β -Carotin), von α -Tocopherol, γ -Tocopherol, Vitamin K_1 , Ubichinon 50, Vitamin C sowie die Konzentration von Glutathion in den Erythrozyten photometrisch beziehungsweise mittels HPLC gemessen und die Messwerte der beiden Studiengruppen miteinander verglichen. Dahingehend konnte nach Auswertungen der erhaltenen Daten kein signifikanter Unterschied zwischen Personen mit Gilbert's Syndrom und der Kontrollgruppe gefunden werden.

Ein weiteres Resultat war, dass die weiblichen Probanden im Mittel deutlich höhere Plasmakonzentrationen an Retinol, Lutein, β -Cryptoxanthin, α -Carotin, β -Carotin, α -Tocopherol, γ -Tocopherol, Phyllochinon, Ascorbinsäure sowie Glutathion aufwiesen, was

jedoch nur für Lutein signifikant war ($P < 0,01$). Ausnahmen dieses Trends waren Werte für Lycopin und Ubichinon 50, für welche bei Männern geringfügig höhere Mittelwerte gemessen wurden.

Zusätzlich konnte in dieser Diplomarbeit ein Zusammenhang der untersuchten Carotinoide untereinander festgestellt werden. Weiters konnte der Gehalt an α -Tocopherol in einen positiven Zusammenhang mit dem Plasmaspiegel an γ -Tocopherol gebracht werden.

Desgleichen wurde eine positive Beziehung zwischen der Konzentration an Phyllochinon und Ascorbinsäure und zwischen Ubichinon 50 und Lutein sowie Lycopin und Retinol nachgewiesen. Ubichinon 50 steht in einem positiven Zusammenhang mit der Plasmakonzentration an Glutathion. Diese Resultate sprechen für eine Abhängigkeit der Plasmakonzentration von Vitaminen und Mineralstoffen von der jeweiligen Ernährungsweise.

Ein Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der Blutabnahme oder dem Body Mass Index und dem Gehalt der einzelnen Parameter im Blutplasma der Probanden, mit Ausnahme von α -Carotin, für das Personen mit einem BMI von $>25 \text{ kg/m}^2$ signifikant geringere Werte zeigten, konnte jedoch nicht aufgezeigt werden.

Mit dem Alter wurde bei Retinol, β -Cryptoxanthin und Lycopin ein positiver Zusammenhang festgestellt.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass alle Studienteilnehmer ausreichend mit Retinol versorgt sind. Bei β -Carotin wurde der Grenzwert von $\geq 0,4 \mu\text{mol/L}$, ab dem von einer ausreichenden Versorgung gesprochen wird von etwa 38% des Studienkollektives nicht erreicht und bei fast 31% wurden stark erniedrigte Werte gemessen. Lediglich 35% der Studienteilnehmer konnten befriedigende Werte von mehr als $\geq 0,75 \mu\text{mol/L}$ aufweisen.

Da bislang keine Referenzwerte für die anderen Carotinoide verfügbar sind, wurden die Studienresultate mit Erfahrungswerten aus der Literatur abgeglichen. Es zeigte sich, dass sich alle Messwerte in den angegebenen Konzentrationsbereichen befanden.

Bezüglich der Plasmaspiegel an α -Tocopherol lagen alle fast Messwerte im Normbereich, und so wurde gleichfalls von einer adäquaten Versorgung mit γ -Tocopherol ausgegangen.

Des Weiteren konnte bei allen Studienteilnehmern festgestellt werden, dass sie ausreichend mit Vitamin C versorgt sind und anhand der Messergebnisse kann mit einer ausreichenden Versorgung mit Glutathion ausgegangen werden.

Die Versorgung mit Phyllochinon ist anhand der Messwerte indessen nur bei knapp 29% des gesamten Studienkollektivs als ausreichend zu betrachten. Bei Ubichinon 50 zeigte sich nach Abgleich mit Angaben aus der Literatur, dass knapp 22% der Probanden den unteren Grenzwert unterschritten, wohingegen die übrigen Studienteilnehmer Konzentrationen im Referenzbereich und Werte darüber aufwiesen.

6 Summary

Since cardiovascular diseases still represent the leading causes of death – they are responsible for 30% of the deaths worldwide and even 48% in Europe, followed by cancer – the causal and clinical research is very important, because new research approaches could have significant impacts on the prevention and therapy of cardiovascular diseases, cancer and other oxidative stress-mediated diseases.

Therefore the presented study was conducted at the Department of Nutritional Sciences of the University of Vienna in collaboration with the Griffith University, Australia, the University of Queensland, Australia, the Department of Pharmacognosy of the University of Vienna and the Department of Clinical Pharmacology of the University Hospital in Copenhagen, Denmark. The aim of this epidemiological, randomized case-control-study was to evaluate the antioxidant status of individuals with Gilbert's syndrome in comparison with healthy individuals in order to examine possible beneficial effects of moderately elevated levels of unconjugated bilirubin.

In order to compare the antioxidant status of individuals with Gilbert's syndrome to a control group, the plasma concentrations of retinol, five selected carotenoids (lutein, β -cryptoxanthene, lycopene, α -carotene, β -carotene), α -tocopherol, γ -tocopherol, phyllochinone and ubiquinone 50 were measured with HPLC and the concentration of ascorbic acid and glutathione were measured photometrically.

However, regarding the evaluated parameters, there was no significant difference in individuals with Gilbert's syndrome and the control group.

The average plasma concentrations of retinol, lutein, β -cryptoxanthin, α -carotene, β -carotene, α -tocopherol, γ -tocopherol, phylloquinone, ascorbic acid and glutathione were clearly higher in females than in males, except for lycopene and ubiquinone 50. But this difference was only significant for lutein ($P < 0,01$).

Additionally, the carotenoid levels in plasma correlated positively among each other. Furthermore, the content of γ -tocopherol was higher in individuals with higher levels of α -tocopherol in plasma. Similarly, a positive relationship between the concentration of

ascorbic acid and phylloquinone as well as for ubiquinone 50 and lutein, lycopene, and retinol was detected. In addition, ubiquinone 50 was positively correlated with the plasma concentration of glutathione.

Further, neither the date of blood collection, the blood samples were collected from may till october, nor the body mass index had an influence on the plasma concentration of the antioxidants.

Regarding age, a positive correlation for retinol, β -cryptoxanthin and lycopene was detected.

Moreover, all participants were supplied adequately with retinol. For β -carotene insufficient supply was detected for 38% of the participants and almost 31% showed severely decreased plasma levels. Only 35% of the individuals showed a satisfactory β -carotene concentration of more than 0,75 $\mu\text{mol/L}$. Since there are no reference values for the other carotenoids yet developed, the study results were compared with data from the literature, showing that the concentrations for lutein, β -cryptoxanthin, lycopene and α -carotene were in the normal range.

Regarding the plasma levels of α -tocopherol all participants were supplied adequately and based on this result, a sufficient status of γ -tocopherol was assumed. Furthermore all study participants showed good vitamin C as well as glutathione levels. Nevertheless, only 29% of the participants showed sufficient supply with phyllochinone, whereas for ubiquinone 50 about 22% of the subjects had plasma levels below the normal range.

Literaturverzeichnis

ABRAHAM N G und KAPPAS A: *Heme oxygenase and the cardiovascular–renal system. Free Radical Biology & Medicine* 39: 1–25, 2005.

AL-DELAIMY W K, VAN KAPPEL A L, FERRARI P, SLIMANI N, STEGHENS J P, BINGHAM S, JOHANSSON I, WALLSTRÖM P, OVERVAD K, TJØNNELAND A, KEY T J, WELCH A A, BUENO-DE MESQUITA H B, PEETERS P H M, BOEING H, LINSEISEN J, CLAVEL-CHAPELON F, GUIBOUT C, NAVARRO C, QUIRÓS R, PALLI D, CELENTANO E, TRICHOPOULOU A, BENETOU V, KAAKS R und RIBOLI E: *Plasma levels of six carotenoids in nine European countries: report from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition EPIC. Public Health Nutrition* 7: 713–722, 2004.

AONO S, KEINO H, YAMADA Y, ADACHI Y, NANNO T, UYAMA E, KOIWAI O und SATO H: *Analysis of genes for bilirubin UDP-glucuronosyltransferase in Gilbert's syndrome. The Lancet* 345: 958–959, 1995.

ARRIAGA S M, MOTTINO A D und ALMARÁ A M: *Inhibitory effect of bilirubin on complement-mediated hemolysis. Biochim Biophys Acta* 1473: 329–336, 1999.

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

AUST O, SIES H, STAHL W und POLIDORI M C: *Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. Journal of Chromatography A* 936: 83–93, 2001.

- BARANÑO D E, RAO M, FERRIS C D und SNYDER S H: *Biliverdin reductase: A major physiologic cytoprotectant*. *PNAS* 99 (25): 16093–16098, 2002.
- BÈLANGER S, LAVOIE J C und P C: *Influence of bilirubin on the antioxidant capacity of plasma in newborn infants (abstract)*. *Biol Neonate* 71, 1997.
- BENSINGER T A, MAISELS M J, CARLSON D E und CONRAD M E: *Effect of low caloric diet on endogenous carbon monoxide production: normal adults and Gilbert's syndrome*. *Proc Soc Exp Biol Med* 144: 417–419, 1973.
- BEUTLER E, DURON O und KELLY B M: *Improved method for determination of blood glutathione*. *J Lab Clin Med* 61: 882–888, 1963.
- BIESALSKI H K: *Ernährungsmedizin*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, Kap. Vitamine, 133–146, 151–160, 171–176. 4 Aufl., 2010.
- BOON A C, HAWKINS C L, BISHT K, COOMBES J S, BAKRANIA B, WAGNER K H und BULMER A C: *Reduced circulating oxidized LDL is associated with hypercholesterolemia and enhanced thiol status in Gilbert syndrome*. *Free Radical Biology and Medicine* 52: 2120–2127, 2012.
- BOOTH S L: *Roles for Vitamin K beyond coagulation*. *Annu Rev Nutr* 29: 89–110, 2009.
- BOSMA P J, ROY-CHOWDHURY J, BAKKER C, GANTLA S, DE BOER A, OOSTRA B, LINDHOUT D, TYTGAT G N J, JANSEN P L M, OUDE ELFERINK R P J und ROY-CHOWDHURY N: *The Genetic Basis of the Reduced Expression of Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's Syndrome*. *N Engl J Med* 333: 1171–1175, 1995.
- BOSMA P J, VAN DER MEER I M, BAKKER C T, HOFMAN A, PAUL-ABRAHAMS M und WITTEMAN J C: *UGT1A1*28 Allele and coronary heart disease: The Rotterdam study*. *Clin Chem* 49: 1180–1181, 2003.
- BREIMER L H, WANNAMETHEE G, EBRAHIM S und SHAPER G A: *Serum Bilirubin and Risk of Ischemic Heart Disease in Middle-Aged British Men*. *Clin Chem* 41: 1504–1508, 1995.

- BRODERSEN R: *Bilirubin - Solubility and Interaction with Albumin and Phospholipid*. *J Biol Chem* 254: 2364–2369, 1979.
- BULMER A C, BLANCHFIELD J T, COOMBES J S und TOTH I: *In vitro permeability and metabolic stability of bile pigments and the effects of hydrophilic and lipophilic modification of biliverdin*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16: 3616–3625, 2008a.
- BULMER A C, BLANCHFIELD J T, TOTH I, FASSETT R G und COOMBES J S: *Improved resistance to serum oxidation in Gilbert's syndrome: A mechanism for cardiovascular protection*. *Atherosclerosis* 199: 390–396, 2008b.
- BULMER A C, RIED K, BLANCHFIELD J T und WAGNER K H: *The anti-mutagenic properties of bile pigments*. *Mutation Research* 658: 28–41, 2008c.
- BULMER A C, RIED K, COOMBES J S, BLANCHFIELD J T, TOTH I und WAGNER K H: *The anti-mutagenic and antioxidant effects of bile pigments in the Ames Salmonella test*. *Mutation Research* 629: 122–132, 2007.
- CAO J, INOUE K, LI X, DRUMMOND G und ABRAHAM N G: *Physiological significance of heme oxygenase in hypertension*. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 41: 1025–1033, 2009.
- CHING S, INGRAM D, HAHNEL R, BEILBY J und ROSSI E: *Serum levels of micronutrients, antioxidants and total antioxidant status predict risk of breast cancer in a case control study*. *J Nutr* 132: 303–303, 2002.
- CLARK J E, FORESTI R, GREEN J C und MOTTERLINI R: *Dynamics of haem oxygenase-1 expression and bilirubin production in cellular protection against oxidative stress*. *Biochem J* 348: 615–619, 2000a.
- CLARK J E, FORESTI R, SARATHCHANDRA P, KAUR H, GREEN C J und MOTTERLINI R: *Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H643–H651, 2000b.
- COONEY R V, FRANKE A A, HANKIN J H, CUSTER L J, WILKENS L R, HARWOOD P J und LE MARCHAND L: *Seasonal variations in plasma micronutrients and antioxidants*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4: 207–215, 1995.

- DARIMONT J und KULLAK-UBLICK G A: *Gastroenterologie*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, Kap. Erkrankungen des Bilirubinstoffwechsels und der Gallebildung, 1681–1683. 1 Aufl., 2008.
- DAY B R, WILLIAMS D R und MARSH C A: *A rapid manual method for routine assay of ascorbic acid in serum and plasma. Clin Biochem* 12: 22–26, 1979.
- DENNERY P A, MCDONAGH A F, SPITZ D R und RODGERS D K P A AND STEVENSON: *Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. Free Radic Biol Med* 19: 395–404, 1995.
- DI MASCIO P, KAISER S und SIES H: *Lycopene as the most efficient biological singlet oxygen quencher. Arch Biochem Biophys* 274: 532–538, 1989.
- DJOUSSÉ L, LEVY D, CUPPLES A L, EVANS J C, D'AGOSTINO R B und ELLISON C R: *Total Serum Bilirubin and Risk of Cardiovascular Disease in the Framingham Offspring Study. Am J Cardiol* 87: 1196–1200, 2001.
- DJOUSSÉ L, ROTHMAN K J, CUPPLES A L, LEVY D und ELLISON C R: *Effect of Serum Albumin and Bilirubin on the Risk of Myocardial Infarction (the Framingham Offspring Study). Am J Cardiol* 91: 485–488, 2003.
- DORÉ S, TAKAHASHI M, FERRIS C D, HESTER L D, GUASTELLA D und SNYDER S H: *Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2445–2450, 1999.
- DUGUAY Y, MCGRATH M, LÈPINE J, GAGNÈ J F, HANKINSON S E, COLDITZ G A, HUNTER D J, PLANTE M, TÊTU B, BÈLANGER A, GUILLEMETTE C und DE VIVO I: *The functional UGT1A1 promoter polymorphism decreases endometrial cancer risk. Cancer Res* 64: 1202–1207, 2004.
- ELMADFA I, BLACHFELNER J, FREISLING H, HAAS K, RUST P und WEICHELBAUM E: 2. *Wiener Ernährungsbericht*. Wien, 2004, 119 ff.
- ELMADFA I und LEITZMANN C: *Ernährung des Menschen*, Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart, Kap. Vitamine, 289–417. 4 Aufl., 2004.

- ERDÖĞAN D, GÜLLÜ H, YILDIRIM E, TOK D, KIRBAŞ I, CİFTÇİ O, BAYCAN S T und MÜDERRISOĞLU H: *Low serum bilirubin levels are independently and inversely related to impaired flow-mediated vasodilation and increased carotid intima-media thickness in both men and women. Atherosclerosis* 184: 431–437, 2006.
- ERKKILA A T, BOOTH S L, HU F B, JACQUES P F und LICHTENSTEIN A H: *Phyllochinone intake and risk of cardiovascular diseases in men. Nutr Metab Cardiovasc Dis* 17: 58–62, 2007.
- FREI B: *Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. Am J Clin Nutr* 54: 1113–1118, 1991.
- FREI B, KIM M und AMES B N: *Ubichinol-10 is an effective lipid-soluble antioxidant at physiological concentrations. Proc Natl Acad Sci* 87: 4879–4883, 1990.
- FREI B, STOCKER R und AMES B N: *Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. Proc Natl Acad Sci USA* 85: 9748–9752, 1988.
- GAJDOS V, PETIT F M, MOLLTE-BOUDJEMLINE A, COLIN P, CAPEL L, NICAUD V, EVANS A, ARVEILER D, PARISOT F, FRANCOUAL J, GENIN E, CAMBIEN F und LABRUNE P: *Further evidence that the UGT1A1*28 allele is not associated with coronary heart disease: The ECTIM Study. Clin Chem* 52: 2313–2314, 2006.
- GILBERT A und LEREBoullet P: *La cholemie simple familiale. Semaine med* 21: 241–243, 1901.
- GIRAL P, RATZIU V, COUVERT P, CARRIÉ A, KONTUSH A, GIRERD X und CHAPMAN M J: *Plasma bilirubin and gamma-glutamyltransferase activity are inversely related in dyslipidemic patients with metabolic syndrome: Relevance to oxidative stress. Atherosclerosis* 210: 607–613, 2010.
- GOLLAN J L, BATEMAN C und BILLING B H: *Effect of dietary composition on the unconjugated hyperbilirubinaemia of Gilbert's syndrome. Gut* 17: 335–340, 1976.
- GULLU H, ERDOGAN D, TOK D, TOPCU S, CALSIKAN M, ULUS T und MUDERRISOGLU H: *High Serum Bilirubin Concentrations Preserve Coronary Flow Reserve and*

- Coronary Microvascular Functions. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 2289–2294, 2005.
- HAGYMÁSI K, KOCSIS I, LENGYEL G, SIPOS P, FEHÉR J und BLÁZOVICS A: *Further evidence of altered redox status of hyperbilirubinaemic patients: role of bilirubin in Gilbert syndrome. Acta Biologica Szegediensis* 47: 131–134, 2003.
- HALLIWELL B und GUTTERIDGE J M C: *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem J* 219: 1–14, 1984.
- HALLIWELL B und GUTTERIDGE J M C: *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press Inc., Nex York, Kap. Antioxidant defences: endogenous and diet derived, 152. 2007.
- HOPKINS P N, WU L L, HUNT S C, BRENT C J, VINCENT M G und WILLIAMS R R: *Higher Serum Bilirubin is Associated with Decreased Risk for Early Familial Coronary Artery Disease. Atheroscler Thromb Vasc Biol* 16: 250–255, 1996.
- HORSFALL L J, RAIT G, WALTERS K, SWALLOW D M, PEREIRA S P, NAZARETH I und PETERSEN I: *Serum Bilirubin and Risk of Respiratory Disease and Death. JAMA* 305: 691–697, 2011.
- HSIEH C J, CHEN M J, LIAO Y L und LIAO T N: *Polymorphisms of the Uridine-Diphosphoglucuronosyltransferase 1A1 gene and coronary artery disease. Cell Mol Biol Lett* 13: 1–10, 2008.
- HUNT S C, KRONENBERG F, ECKFELDT J H, HOPKINS P N, MYERS R H und HEISS G: *Association of plasma bilirubin with coronary heart disease and segregation of bilirubin as a major gene trait: the NHLBI family heart study. Atherosclerosis* 154: 747–754, 2001.
- ISHIZAKA N, ISHIZAKA Y, TAKAHASHI E, YAMAKADO M und HASHIMOTO H: *High serum bilirubin level is inversely associated with the presence of carotid plaque. Stroke* 32: 580–583, 2001.

- ITO Y, OCHIAI J, SASAKI R, SUZUKI S, KUSUHARA Y, MORIMITSU Y, OTANI M und AOKI K: *Serum concentrations of carotenoids, retinol, and alpha-tocopherol in healthy persons determined by high-performance liquid chromatography. Clin Chim Acta* 194: 131–144, 1990.
- IYANAGI T, EMI Y und IKUSHIRO S: *Biochemical and molecular aspects of genetic disorders of bilirubin metabolism. Biochimica et Biophysica Acta* 1407: 173–184, 1998.
- JAKOB E und ELMADFA I: *Rapid HPLC assay for the assessment of vitamin K₁, A, E and beta-carotene status in children (7-19 years). Int J Vitam Nutr Res* 65: 31–35, 1995.
- JANSEN T, HORTMANN M, OELZE M, OPITZ B, STEVEN S, SCHELL R, KNORR M, KARBACH S, SCHUHMACHER S, WENZEL P, MÜNZEL T und DAIBER A: *Conversion of biliverdin to bilirubin by biliverdin reductase contributes to endothelial cell protection by heme oxygenase-1—evidence for direct and indirect antioxidant actions of bilirubin. Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49: 186–195, 2010.
- KAGAN V E, SERBINOVA E A, FORTE T, SCITA G und PACKER L: *Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. J Lipid Res* 33: 385–397, 1992.
- KALOUSOVÁ M, NOVOTNÝ L, ZIMA T und VÍTEK L: *Decreased levels of advanced glycation end-products in patients with Gilbert syndrome. Cell Mol Biol* 51: 387–392, 2005.
- KAPITULNIK J und MAINES M D: *Pleiotropic functions of biliverdin reductase: cellular signaling and generation of cytoprotective and cytotoxic bilirubin. Trends in Pharmacological Sciences* 30: 129–137, 2009.
- KESHAVAN P, DEEM T L, SCHWEMBERGER S J, BABCOCK G F, COOK-MILLS J M und ZUCKER S D: *Unconjugated bilirubin inhibits VCAM-1-mediated transendothelial leucocyte migration. J Immunol* 174: 3709–3718, 2005.
- KESHAVAN P, SCHWEMBERGER S J, SMITH D L H, BABCOCK G F und ZUCKER S D: *Unconjugated bilirubin induces apoptosis in colon cancer cells by triggering mitochondrial depolarization. Int J Cancer* 112: 433–445, 2004.

- KIMM H, YUN J E, JO J und JEE S H: *Low Serum Bilirubin Level as an Independent Predictor of Stroke Incidence : A Prospective Study in Korean Men and Women. Stroke* 40: 3422–3427, 2009.
- LEVINSON S S: *Relationship between bilirubin, apolipoprotein B and coronary artery disease. Ann Clin Lab Sci* 27: 185–192, 1997.
- LI Y, MENG S Y, MENG C C, YU W G und WANG R T: *Decreased serum bilirubin is associated with arterial stiffness in men. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases* 1–7, 2011.
- LIBBY P: *Harrison's Principles of Internal Medicine*, The McGraw-Hill Comp., USA, Kap. The Pathogenesis, Prevention, and Treatment of Atherosclerosis, 1983–1991. 18 Aufl., 2012.
- LIN L Y, KUO H K, HWANG J J, LAI L P, CHIANG F T, TSENG C D und LIN J L: *Serum bilirubin is inversely associated with insulin resistance and metabolic syndrome among children and adolescents. Atherosclerosis* 203: 563–568, 2009.
- LIN J P, O'DONNELL C J, SCHWAIGER J P, CUPPLES L A, LINGENHEL A, HUNT S C, YANG S und KRONENBERG F: *Association Between the UGT1A1*28 Allele, Bilirubin Levels, and Coronary Heart Disease in the Framingham Heart Study. Circulation* 114: 1476–1481, 2006.
- LIN J P, VÍTEK L und SCHWERTNER H A: *Serum bilirubin and genes controlling bilirubin concentrations as biomarkers for cardiovascular disease. Clinical Chemistry* 56 (10): 1535–1543, 2010.
- LINGENHEL A, KOLLERITS B, SCHWAIGER J P, HUNT S C, GRESS R, HOPKINS P N, SCHOENBORN V, HEID I M und KRONENBERG F: *Serum bilirubin levels, UGT1A1 polymorphisms and risk for coronary artery disease. Experimental Gerontology* 1102–1107, 2008.
- LIU Y, LIU J, TETZLAFF W, PATY D W und CYNADER M S: *Biliverdin reductase, a major physiologic cytoprotectant, suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. Free Radical Biology & Medicine* 40: 960–967, 2006.

LÖFFLER G und BRIGELIUS-FLOHÉ R: *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer-Verlag GmbH, Berlin/ Heidelberg/ New York, Kap. Stoffwechsel des Organismus: Bedeutung von Nahrungskomponenten - Vitamine, 683–710. 8 Aufl., 2007.

LUNDH B, JOHANSSON M B, MERCKE C und CAVALLIN-STAHN E: *Enhancement of heme catabolism by caloric restriction in man. Scand J Clin Lab Invest* 30: 421–427, 1972.

MADHAVAN M, WATTIGNEY W A, SRINIVASAN S R und BERENSON G S: *Serum bilirubin distribution and its relation to cardiovascular risk in children and young adults. Atherosclerosis* 131: 107–114, 1997.

MANCUSO C, BARONE E, GUIDO P, MICELI F, DI DOMENICO F, PERLUIGI M, SANTANGELO R und PREZIOSI P: *Inhibition of lipid peroxidation and protein oxidation by endogenous and exogenous antioxidants in rat brain microsomes in vitro. Neuroscience Letters* 518: 101–105, 2012.

MAYER M: *Association of Serum Bilirubin Concentration with Risk of Coronary Artery Disease. Clinical Chemistry* 46 (11): 1723–1727, 2000.

MEULENGRACHT E: *Icterus intermittens juvenilis. Klin Wchnschr* 45: 118–121, 1939.

MURACA M und FEVERY J: *Influence of sex and sex steroids on bilirubin uridine diphosphate-glucuronosyltransferase activity of rat liver. Gastroenterology* 87: 308–313, 1984.

NAKAGAMI T, TOYOMURA K, KINOSHITA T und MORISAWA S: *A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: Anticomplement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. Biochim Biophys Acta* 1158: 189–193, 1993.

NEUŽIL J und STOCKER R: *Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. FEBS* 331 (3): 281 – 284, 1993.

NEUŽIL J und STOCKER R: *Free and Albumin-bound Bilirubin are Efficient Co-antioxidants for α -Tocopherol, Inhibiting Plasma and Low Density Lipoprotein Lipid Peroxidation. The Journal of Biological Chemistry* 269 (24): 16712–16719, 1994.

- NOVOTNÝ L und VÍTEK L: *Inverse Relationship Between Serum Bilirubin and Atherosclerosis in Men: A Meta-Analysis of Published Studies. Exp Biol Med* 228: 568–571, 2003.
- OHSAKI Y, SHIRAKAWA H, HIWATASCHI K, FURUKAWA Y, MIZUTANI T und KOMAI M: *Vitamin K suppresses lipopolysaccharide-induced inflammation in the rat. Biosci Biotechnol Biochem* 70: 926–932, 2006.
- ÖLLINGER R, BILBAN M, ERAT A, FROIO A, MCDAID J, TYAGIE S, CSIZMADIA E, GRAÇA-SOUZA A V, LILOIA A, SOARES M P, OTTERBEIN L E, USHEVA A, YAMASHITA K und BACH F H: *Bilirubin : A Natural Inhibitor of Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. Circulation* 112: 1030–1039, 2005.
- ÖLLINGER R, WANG K H YAMASHITA, WEGIEL B, THOMAS M, MARGREITER R und BACH F H: *Therapeutic Applications of Bilirubin and Biliverdin in Transplantation. Antioxidants & Redox Signaling* 9 (12): 2175–2185, 2007.
- OLMEDILLA B, GRANADO F, BLANCO I und ROJAS-HIDALGO E: *Seasonal and sex-related variations in six serum carotenoids, retinol, and α -tocopherol. Am J Clin Nutr* 60: 106–110, 1994.
- OTTO-KNAPP R: *Die Regulation antioxidativer Enzyme nach Ozonexposition am Kulturmodell der menschlichen Nasenschleimhaut*, Berlin, 16. 2000.
- OWENS D und SHERLOCK S: *Diagnosis of Gilbert's Syndrome: Role of Reduced Caloric Intake Test. British Medical Journal* 3: 559–563, 1973.
- PARKE D V: *Antioxidants in Human Health and Disease*, CABI Publishing, New York, Kap. Antioxidants and their mechanisms of action, 1–13. 1999.
- PERLSTEIN T S, PANDE R L, BECKMAN J A und CREAGER M A: *Serum Total Bilirubin Level and Prevalent Lower-Extremity Peripheral Arterial Disease: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999 to 2004. Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 166–172, 2008.

- PFLUEGER A, J C A, PETERSON T E, SMITH L A, D'USCIO L A, KATUSIC Z S und NATH K A: *The Hyperbilirubinemic Gunn rat is resistant to the pressor effects of angiotensin II. Am J Physiol Renal Physiol* F552–F558, 2005.
- RANTNER B, KOLLERITS B, ANDERWALD-STADLER M, KLEIN-WEIGEL P, GRUBER I, GEHRINGER A, HAAK M, SCHNAPKA-KÖPF M, FRAEDRICH G und KRONENERG F: *Association between the UGT1A1 TA-repeat polymorphism and bilirubin concentration in patients with intermittent claudication: results from the CAVASIC study. Clinical Chemistry* 54: 851–857, 2008.
- RAYNER M, ALLENDER S und SCARBOROUGH P: *Cardiovascular disease in Europe. European Journal of Cardiovascular Prevention and Rehabilitation* 16: 43–47, 2009.
- RIZZO A M, BERSELLI P, ZAVA S, MONTORFANO G, NEGRONI M, CORSETTO P und BERRA B: *Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors*, Landes Bioscience and Springer Science+Business Media, LLC, Austin, Texas and Berlin/Heidelberg, Kap. Endogenous Antioxidants and Radical Scavengers, 52–67. 2010.
- ROY-CHOWDHURY J, ROY-CHOWDHURY N und JANSEN P L M: *Zakim and Boyer's Hepatology. A Textbook of Liver Disease*, Saunders, Philadelphia, Kap. Bilirubin Metabolism and its Disorders, 1449–1471. 5 Aufl., 2006.
- RYTER S W und TYRELL R M: *The heme synthesis and degradation pathways: Role in oxidant sensitivity. Free Radical Biology & Medicine* 28 (2): 289–309, 2000.
- SCHWERTNER H A, JACKSON W G und TOLAN G: *Association of Low Serum Concentration of Bilirubin with Increased Risk of Coronary Artery Disease. Clin Chem* 40: 18–23, 1994.
- SCHWERTNER H A und VÍTEK L: *Gilbert syndrome, UGT1A1*28 allele, and cardiovascular disease risk: Possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. Atherosclerosis* 198: 1–11, 2008.
- SEDLAK T W, SALEH M, HIGGINSON D S, PAUL B D, JULURI K R und SNYDER S H:

- Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. PNAS* 106 (13): 5171–5176, 2009.
- SHATALOVA E G, WALTHER S E, FAVOROVA O O, REBBECK T R und BLANCHARD R L: *Genetic polymorphisms in human SULT1A1 and UGT1A1 genes associate with breast tumor characteristics: a case-series study. Breast Cancer Res* 7: R909–R921, 2005.
- SHEA M K, BOOTH S L, MASSARO J M, JACQUES P F, D’AGOSTINO SR R B, DAWSON-HUGHES B, ORDOVAS J M, O’DONNELL J O, KATHIRESAN S, KEANEY J F JR, VASAN R S und BENJAMIN E J: *Vitamin K and Vitamin D status: associations with inflammatory markers in the Framingham Offspring Study. Am J Epidemiol* 167: 313–320, 2008.
- SIES H: *Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem* 215: 213–219, 1993.
- SIES H: *Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. Experimental Physiology* 82: 291–295, 1997.
- SIES H und STAHL W: *Vitamins E and C, β - carotene, and other carotenoids as antioxidants. Am J Clin Nutr* 62: 1315–1321, 1995.
- SPARKS R, ULRICH C M, BIGLER J, TWOROGER S S, YASUI Y, RAJAN K B, PORTER P, STANCZYK F Z, BALLARD-BARBASH R, YUAN X, LIN M G, MCVARISH L, AIELLO E J und MCTIERNAN A: *UDP-glucuronosyltransferase and sulfotransferase polymorphisms, sex hormone concentrations, and tumor receptor status in breast cancer patients. Breast Cancer Res* 6: R488–R498, 2004.
- STAHL W und SIES H: *Antioxidant activity of carotenoids. Molecular Aspects of Medicine* 24: 345–351, 2003.
- STAHL W und SIES H: *Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. Biochimica et Biophysica Acta* 1740: 101–107, 2005.
- STATISTIK AUSTRIA: *Die häufigsten Todesursachen im Jahr 2010.* http://www.statistik.at/web_de/statistiken/gesundheit/todesursachen/todesursachen_im_ueberblick/index.html, Stand 24.05.2012.

- STEPHENS J W, KHANOLKAR M P und BAIN S C: *The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. Atherosclerosis* 202: 321–329, 2009.
- STOCKER R: *Antioxidant Activities of Bile Pigments. Antioxidants & Redox Signaling* 6 (5): 841–849, 2004.
- STOCKER R und AMES B N: *Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile. Proc Natl Acad Sci USA* 84: 8130–8134, 1987.
- STOCKER R, BOWRY V W und FREI B: *Ubiquinol-10 protects human low density lipoprotein more efficiently against lipid peroxidation than does α -tocopherol. Proc Natl Acad Sci USA* 88: 1646–1650, 1991.
- STOCKER R, GLAZER A N und AMES B N: *Antioxidant Activity of albumin-bound Bilirubin. Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5918–5922, 1987a.
- STOCKER R und KEANEY JR J F: *Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. Physiol Rev* 84: 1381–1478, 2004.
- STOCKER R, YAMAMOTO Y, MCDONAGH A F, GLAZER A N und AMES B N: *Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. Science* 235: 1043–1047, 1987b.
- TAPAN S, KARADURMUS N, DOGRU T, ERCIN C N, TASCI I, BILGI C, KURT I und ERBIL M K: *Decreased small dense LDL levels in Gilbert's syndrome. Clin Biochem* 44: 300–303, 2011.
- TEMME E H M, ZHANG J, SCHOUTEN E G und KESTELOOT H: *Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population. Cancer Causes and Control* 12: 887–894, 2001.
- TOMARO M L und DEL C BATTLE A M: *Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 34: 216–220, 2002.

- VÍTEK L, JIRSA JR M, BRODANOVÁ M, KALÁB M, MAREČEK Z, DANZIG V, NOVOTNÝ L und KOTAL P: *Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. Atherosclerosis* 160: 449–456, 2002.
- VÍTEK L und SCHWERTNER H A: *The Heme Catabolic Pathway and its Protective Effects on Oxidative Stress-Mediated Diseases. Advances in Clinical Chemistry* 43: 1–57, 2007.
- WANG W W, SMITH D L H und ZUCKER S D: *Bilirubin inhibits iNOS expression and NO production in response to endotoxin in rats. Hepatology* 40: 424–433, 2004.
- WEI M, SCHWERTNER H A, GIBBONS L W, ZHENG T Q und MITCHELL T L: *The inverse association between baseline fasting serum bilirubin and subsequent all-cause mortality in men without baseline liver dysfunctions (abstract). Hepatology* 32 (426A), 2000a.
- WEI M, SCHWERTNER H A, GIBBONS L W, ZHENG Q und MITCHELL T L: *Low fasting serum bilirubin as a predictor of cancer mortality in men (abstract). Hepatology* 32 (427A), 2000b.
- WEI M, SCHWERTNER H A, ZHENG Q und BLAIR S N: *Fasting serum bilirubin concentrations and the risk of subsequent coronary heart disease death in men (abstract). Hepatology* 32 (314A), 2000c.
- WILLIS D, MOORE A R, FREDERIK R und WILLOUGHBY D A: *Heme oxygenase: A novel target for the modulation of the inflammatory response. Nature Med* 2: 87–90, 1996.
- WU T W, CAREY D, WU J und SUGIYAMA H: *The cytoprotective effects of bilirubin and biliverdin on rat hepatocytes and human erythrocytes and the impact of albumin. Biochem Cell Biol* 69: 828–834, 1991a.
- WU T W, FUNG K P und YANG C C: *Unconjugated bilirubin inhibits the oxidation of human low density lipoprotein better than trolox. Life Sci* 54: 477–481, 1994.

WU T W, WU J, LI R K, MICKLE D und CAREY D: *Albumin-bound bilirubins protect human ventricular myocytes against oxyradical damage. Biochemistry and Cell Biology* 69: 683–688, 1991b.

ZELENKA J, MUCHOVA L, ZELENKOVA M, VANOVA K, VREMAN H J, WONG R J und VÍTEK L: *Intracellular accumulation of bilirubin as a defense mechanism against increased oxidative stress. Biochimie* 1–7, 2012.

ZUCKER S D, GOESSLING W und G H A: *Unconjugated Bilirubin Exhibits Spontaneous Diffusion through Model Lipid Bilayers and Native Hepatocyte Membranes. J Biol Chem* 274: 10852–10862, 1999.

ZUCKER S D, HORN P S und SHERMAN K E: *Serum Bilirubin Levels in the U.S. Population: Gender Effect and Inverse Correlation With Colorectal Cancer. Hepatology* 40: 827–835, 2004.

Abbildungsverzeichnis

1	Abbau des Häms (Eisenprotoporphyrin IX)	4
2	Länge der TATAA-Promotorregion des UGT1A1-Gens	7
3	Ursachen und Folgen von oxidativem Stress	13
4	Wie können Antioxidativen wirken?	17
5	Das komplexe Zusammenspiel der antioxidativen Enzyme Katalase, Glutathion- Peroxidase und Superoxid-Dismutase	28
6	Die synergistischen Wirkungen von Ascorbinsäure, α -Tocopherol und Glutathion	30
7	Einteilung des Studienkollektivs	42
8	Chromatogramm von Retinol und ausgewählter Carotinoide	55
9	Chromatogramm von Tocopherol, γ -Tocopherol und α -Tocopherol	56
10	Chromatogramm von Ubichinon 50 im Plasma	60
11	Chromatogramm von α -Phyllochinon und 2',3'-Dihydrophyllochinon im Plasma	65
12	Durchschnittliche Retinolkonzentration in Abhängigkeit vom Alter so- wie der Konzentration an UCB	71
13	Durchschnittliche Konzentration an Retinol von Frauen im Vergleich zu Männern	72
14	Durchschnittliche Luteinkonzentration in Abhängigkeit vom Alter so- wie der Konzentration an UCB	74
15	Durchschnittliche Konzentration an Lutein von Frauen im Vergleich zu Männern (** Männer < Frauen, P < 0,001)	74

16	Durchschnittliche β -Cryptoxanthinkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB (** GS>30 J > GS<30 J, P <0,001)	76
17	Durchschnittliche Konzentration an β -Cryptoxanthin von Frauen im Vergleich zu Männern	77
18	Durchschnittliche Lycopinkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB	79
19	Durchschnittliche Konzentration an Lycopin von Frauen im Vergleich zu Männern	80
20	Durchschnittliche α -Carotinkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB	82
21	Durchschnittliche Konzentration an α -Carotin von Frauen im Vergleich zu Männern	82
22	Durchschnittliche β -Carotinkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB (# Tendenz: GS>30 J > Kontrolle>30 J, P = 0,078)	84
23	Durchschnittliche Konzentration an β -Carotin von Frauen im Vergleich zu Männern	85
24	Durchschnittliche α -Tocopherolkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB	87
25	Durchschnittliche Konzentration an α -Tocopherol von Frauen im Vergleich zu Männern	88
26	Durchschnittliche γ -Tocopherolkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB	90
27	Durchschnittliche Konzentration an γ -Tocopherol von Frauen im Vergleich zu Männern	90
28	Durchschnittliche Phyllochinonkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB	92
29	Durchschnittliche Konzentration an Phyllochinon von Frauen im Vergleich zu Männern	93

30	Durchschnittliche Ubichinon 50-Konzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB	95
31	Durchschnittliche Konzentration an Ubichinon 50 von Frauen im Vergleich zu Männern	95
32	Durchschnittliche Ascorbinsäurekonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB	97
33	Durchschnittliche Konzentration an Ascorbinsäure von Frauen im Vergleich zu Männern	98
34	Durchschnittliche Glutathionkonzentration in Abhängigkeit vom Alter sowie der Konzentration an UCB (** Kontrolle>30 J > GS<30 J, Kontrolle<30 J, P <0,01)	100
35	Durchschnittliche Konzentration an Glutathion von Frauen im Vergleich zu Männern	101

Tabellenverzeichnis

2.2.1	Nomenklatur reaktiver Verbindungen	11
2.3.1	Cytoprotektive Eigenschaften von Bilirubin und Biliverdin	19
3.2.1	Reagenzien zum Nachweis von Vitamin C	44
3.2.2	Verdünnungsreihe der Standards von Vitamin C	46
3.2.3	Pipettierschema für die Testansätze von Vitamin C	46
3.2.4	Fortsetzung: Pipettierschema für die Testansätze von Vitamin C	47
3.2.5	Reagenzien zum Nachweis von Glutathion	48
3.2.6	Verdünnungsreihe der Standards von Glutathion	50
3.2.7	Pipettierschema für die Testansätze von Glutathion	50
3.2.8	Fortsetzung: Pipettierschema für die Testansätze von Glutathion	51
3.3.1	Reagenzien zum Nachweis von Vitamin A, Vitamin E und Carotinoiden im Plasma	53
3.3.2	Laufmittelzusammensetzung und Flussrate (Flow) für die Analysen von Vitamin A, Vitamin E und den Carotinoiden im Plasma	54
3.3.3	Standardkonzentrationen (ng/ml) der Kalibriergeraden für Vitamin A, Vitamin E und die Carotinoide	57
3.3.4	Intra- und Inter-VK [%] der Analyse von Vitamin A, Vitamin E und die Carotinoide im Plasma	57
3.3.5	Reagenzien zum Nachweis von Ubichinon 50 im Plasma	58
3.3.6	Laufmittelzusammensetzung und Flussrate (Flow) für die Analyse von Ubichinon 50 im Plasma	59
3.3.7	Standardkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) der Kalibriergeraden für Ubichinon 50	61
3.3.8	Reagenzien zum Nachweis von Phyllochinon im Plasma	62

3.3.9	Laufmittelzusammensetzung und Flussrate (Flow) für die Analyse von Phyllochinon im Plasma	64
3.3.10	Phyllochinon-Standardkonzentration und 2',3'-Dihydrophyllochinon [ng/ml mobile Phase]	66
4.1.1	Mittelwert \pm Standardabweichung der analysierten Parameter	69
4.2.1	Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum, Maximum von Retinol in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration	70
4.2.2	Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum, Maximum von Lutein in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration	73
4.2.3	Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum, Maximum von β -Cryptoxanthin in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration	75
4.2.4	Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum, Maximum von Lycopin in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration	78
4.2.5	Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum, Maximum von α -Carotin in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration	81
4.2.6	Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum, Maximum von β -Carotin in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration	83
4.3.1	Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum, Maximum von α -Tocopherol in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration	86
4.3.2	Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum, Maximum von γ -Tocopherol in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration	89
4.4.1	Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum, Maximum von Phyllochinon in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration	91
4.5.1	Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum, Maximum von Ubichinon 50 in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration	94
4.6.1	Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum, Maximum von Vitamin C in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration	96
4.7.1	Mittelwert \pm Standardabweichung, Minimum, Maximum von Glutathion in Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration	99

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name Melanie Gierer
Adresse Gymnasiumstraße 52/2/10, 1190 Wien
Geburtsdatum- und ort 30.0.1987, Melk
Staatsbürgerschaft Österreich
e-Mailadresse melaniegierer@gmx.at

Ausbildung

seit 03/2006 Studium der Ernährungswissenschaften an der Universität Wien
Wahlfach: Lebensmitteltechnologie
06/2005 Reifeprüfung am BG/BRG Wieselburg
1997–2005 BG/BRG Wieselburg
1993–1997 Volksschule Neumarkt/Ybbs

Berufserfahrung

02/2011–04/2012 Tutor für das lebensmittelchemische Praktikum am Institut für Ernährungswissenschaften

Berufsbezogene Praktika

12/2010–01/2011 Praktikum im Bereich Daten, Statistik und Risikobewertung am Zentrum Ernährung & Prävention der Österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH
09/2010 Praktikum im Bereich Probenvorbereitung, Blutgruppenserologie, Diabeteskontrolle, Fettstoffwechselfparameter und Blutbilder im Zentrallasbor des Landesklinikums Mostviertel Scheibbs
08/2010 Praktikum im Bereich Probenvorbereitung, Blutgerinnung, Blutbilder, Harn- und Stuhluntersuchungen im Zentrallabor des Landesklinikums Melk
08/2009 Praktikum im Bereich Daten, Produktion, Produktentwicklung bei Anton Haubenberger GesmbH

Sprachkenntnisse

Deutsch Muttersprache
Englisch Fließend in Wort und Schrift
Französisch Grundkenntnisse in Wort und Schrift

Zusatzqualifikationen

Grundkenntnisse Microsoft Office, SPSS Statistics, L^AT_EX