



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Ermittlung von DNA Schäden in Gunn Ratten mittels
Comet Assay

Verfasserin

Stephanie Schreidl

gemeinsam mit

Khatereh Najafi

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. Rer.nat)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 474

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Ernährungswissenschaften

Betreuerin / Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei einigen Menschen für ihre besondere Unterstützung während meines Studiums bedanken:

Dies richtet sich besonders an Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner, der mir nicht nur die Mitarbeit an dieser Studie ermöglicht hat, sondern mir auch bei der Vollendung meiner Diplomarbeit eine große Stütze war.

Mag. Marlies Wallner, die mich in ihrem Forschungsteam herzlich willkommen geheißen hat, bei allen Fragen stets ein offenes Ohr hatte und mich im Labor immer unterstützte.

Meine Laborkollegin Khatereh Najafi, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden ist und durch ihre Motivations- und Zusammenarbeit mir nicht nur eine gute Kollegin war, sondern auch eine gute Freundin für mich geworden ist.

Auch bei Mag. Elisabeth Müllner, Mag. Christine Mölzer, Mag. Katharina Helmich, Katharina Diem BSc., Mag. Billy Franzke für ihre tatkräftige als auch beratende Unterstützung im Labor, möchte ich mich auf diesem Weg bedanken.

Besondere Anteilnahme während meines gesamten Studiums kam stets von meiner Familie und meinen Freunden, die mir immer viel Kraft gespendet haben und denen ich hiermit ebenfalls meinen besonderen Dank zum Ausdruck bringen möchte.

Vor allem möchte ich mich hiermit bei meiner Schwester Diana bedanken, die während der ganzen Jahre die wichtigste und größte Unterstützung nicht nur während meines Studiums, sondern auch in allen anderen Bereichen meines Lebens war.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
1. Einleitung (von K. Najafi)	1
2. Literaturübersicht	3
2.1. Oxidativer Stress (von K. Najafi).....	3
2.1.1. Freie Radikale und oxidativer Stress.....	3
2.1.2. Oxidativer Stress, DNA-Schäden und der Zusammenhang mit Krebs	6
2.2. Comet Assay (von S. Schreidl).....	8
2.2.1. Entwicklung	8
2.2.2. Vorteile	9
2.2.3. Zellen.....	10
2.2.4. Enzyme.....	11
2.2.5. Auswertung.....	12
2.3. Bilirubin (von K. Najafi)	13
2.3.1. Struktur und Eigenschaften.....	13
2.3.2. Stoffwechsel	14
2.4. Antioxidative Wirkung von Bilirubin (von K. Najafi)	16
2.4.1. Antioxidative Wirkung allgemein	16
2.4.2. Bilirubin und Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	17
2.4.3. Bilirubin und Krebs.....	18
2.5. Hyperbilirubinämie (von K. Najafi)	20
2.5.1. Gilbert Syndrom.....	20
2.5.2. Crigler-Najjar Syndrom	21
2.5.3. Neugeborenenhyperbilirubinämie und neurotoxische Effekte.....	22
2.6. Gunn Ratten (von S. Schreidl).....	23
2.7. Ionisierende Strahlung (von S. Schreidl)	24
2.7.1. Allgemein	24
2.7.2. Indirekt ionisierende Strahlung: Gammastrahlung.....	24
3. Material und Methoden (von S. Schreidl)	28
3.1. Studiendesign	28
3.2. Material (von S. Schreidl)	31

3.2.1. Geräte (inkl. Firma und Bestellnummer bzw. Typ).....	31
3.2.2. Chemikalien.....	32
3.2.3. Lösungen.....	34
3.3. Methode (von S. Schreidl)	36
3.3.1. Bestrahlung	36
3.3.2. Isolation der Gewebe	38
3.4. Statistische Analyse (von K.Najafi)	42
4. Ergebnisse und Diskussion (von S. Schreidl).....	44
4.1. Kolonozyten (von S. Schreidl)	44
4.1.1. DNA Schädigung, UCB-Konzentrationen und Gewicht	45
4.1.2. Unterschiede zwischen den Geschlechtern	48
4.2. Lymphozyten.....	49
4.2.1. DNA Schädigung, UCB Konzentrationen und Gewicht.....	49
(von S. Schreidl und K. Najafi)	49
4.2.2. Unterschiede zwischen den Geschlechtern (von S. Schreidl)	53
4.3 Korrelation zwischen UCB-Konzentration, Körpergewicht und Geschlecht (von S. Schreidl und K.Najafi)	55
4.4. Mittelwertsvergleiche von Körpergewicht und UCB – Konzentration der homozygoten und heterozygoten Tiere (von S. Schreidl)	57
5. Conclusio (von S. Schreidl).....	58
6. Zusammenfassung (von S. Schreidl)	61
7. Summary (von S. Schreidl)	63
8. Literatur	65

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
Alb-Br	Albumin-gebundenes Bilirubin
Aqua bidest.	Zweifach destilliertes Wasser
BR	Bilirubin
BV	Biliverdin
CNS	Crigler-Najjar-Syndrom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ENDO III	Endonuklease III
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
GI	Gastrointestinal
GS	Gilbert Syndrom
GSH-Px	Glutathionperoxidase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
LDL	low density lipoprotein
LET	Linearer Energietransfer
MRP2	multidrug resistance protein 2
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NO·	Stickstoffradikale
O ₂ · ⁻	Superoxidradikale
OH·	Hydroxylradikale
OT	Objektträger
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung

PUFA	mehrfachungesättigte Fettsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	reactive nitrogen species
RO ₂ ·	Peroxyradikale
ROS	reactive oxygen species
SB	Strangbrüche
SOD	Superoxiddismutase
STABW	Standardabweichung
TA	Thymin-Adenin
UCB	Unkonjugiertes Bilirubin
UDP	Uridindiphosphoglucuronat
UGT1A1	Uridindiphosphoglucuronat-glucuronosyltransferase-1A1
8-OH-G	8-Hydroxyguanin
8-OHdG	8-hydroxy-2'-desoxyguanosin

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Reaktion von Guanin mit Hydroxylradikal	7
Abb. 2. Zwei- und dreidimensionale Struktur von Unkonjugiertem Bilirubin und Biliverdin	13
Abb. 3. Bilirubin Stoffwechsel	15
Abb. 4. Umwandlungsschema für Kobalt-60	26
Abb. 5. Radiolyse des Wassers	27
Abb. 6. ⁶⁰ Co-Strahlenquelle Gammacell 220	36
Abb. 7. Aufbau einer zylindrischen Quelle aus Einzelstäben.....	37
Abb. 8. Homogenisator	39
Abb. 9. Darstellung der Basis DNA Schädigung (SB) der Kolonozyten, in den bestrahlten und unbestrahlten heterozygoten bzw. bestrahlten und unbestrahlten homozygoten Gruppen	46
Abb. 10. Vergleich der Mittelwerte der DNA Schädigung in den Kolonozyten nach der Behandlung der Restriktionsenzyme ENDO III und FPG.....	47
Abb. 11. Darstellung der Basis DNA Schädigung (SB) der Lymphozyten, in den bestrahlten und unbestrahlten heterozygoten bzw. bestrahlten und unbestrahlten homozygoten Gruppen	50
Abb. 12. Darstellung der DNA Schädigung der Lymphozyten, nach Behandlung des Restriktionsenzym ENDO III, in den bestrahlten und unbestrahlten heterozygoten bzw. bestrahlten und unbestrahlten homozygoten Gruppen	51
Abb. 13. Darstellung der DNA Schädigung der Lymphozyten, nach Behandlung des Restriktionsenzym FPG, in den bestrahlten und unbestrahlten heterozygoten bzw. bestrahlten und unbestrahlten homozygoten Gruppen	51
Abb. 14. Vergleich der Mittelwerte der DNA Schädigung in den Lymphozyten nach der Behandlung der Restriktionsenzyme ENDO III bzw. FPG	52
Abb. 15. UCB-Konzentration in Relation zum Körpergewicht.....	56

Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Aufteilung der Versuchsgruppen.....	30
Tab. 2. Geräte und Materialien	31
Tab. 3. Für die Versuche benötigte Chemikalien	33
Tab. 4. Pipettierschema	40
Tab. 5. Mittelwerte (Standardabweichung) in den Kolonozyten, Aufteilung nach unbestrahlte bzw. bestrahlte heterozygote und unbestrahlte bzw. bestrahlte homozygoten Gunn Ratten	45
Tab. 6. Mittelwerte (Standardabweichung) in den Kolonozyten, Aufteilung nach unbestrahlte bzw. bestrahlte männliche und weibliche Gunn Ratten.....	48
Tab. 7. Mittelwerte (Standardabweichung) in den Lymphozyten, Aufteilung nach unbestrahlte bzw. bestrahlte heterozygote und unbestrahlte bzw. bestrahlte homozygoten Gruppen.	49
Tab. 8. Mittelwerte (Standardabweichung) in den Lymphozyten, Aufteilung nach unbestrahlte bzw. bestrahlte männliche und weibliche Gunn Ratten.....	53
Tab. 9. Korrelation zwischen Geschlecht und den mittleren UCB Konzentrationen bzw. dem durchschnittlichen Körpergewicht der Tiere.....	55
Tab. 10. Korrelation zwischen den mittleren UCB – Konzentrationen und dem durchschnittlichen Körpergewicht der Tiere	55
Tab. 11. Mittelwertsvergleich des Körpergewichts zwischen homozygoten und heterozygoten Tiere.....	57
Tab. 12. Vergleich der mittleren UCB-Konzentrationen und dem durchschnittlichen Körpergewicht der Tier.....	57

1. Einleitung (von K. Najafi)

Die folgende Arbeit ist Teil des vom Österreichischen Wissenschaftsfonds (FWF) unterstützten Projekts „antioxidatives und antigenotoxisches Potential von Gallenfarbstoffen“ und stellt die Nachfolgearbeit der Humanstudie, beschrieben in den Diplomarbeiten von Barbara Rittmannsberger und Nadja Antl, dar. Durchgeführt wurde die Studie am Department für Ernährungswissenschaften an der Universität Wien, im Rahmen des Emerging Fields Oxidative Stress and DNA-Stability.

Bilirubin wurde lange Zeit lediglich als Abfallprodukt des Hämstoffwechsels betrachtet. Es entsteht im Körper zu etwa 80 % aus Hämoglobin, was durch den Abbau von alternden Erythrozyten geschieht. Täglich wird eine Menge von ca. 300 bis 400 mg Bilirubin produziert. Unter physiologischen Bedingungen beträgt die Plasma Bilirubinkonzentration 5 bis 17 $\mu\text{mol/L}$, bestimmte Voraussetzungen können jedoch zu einem leichten bis starken Anstieg führen.

Stark erhöhte Bilirubinlevel wurden überwiegend mit Neurotoxizität assoziiert, wie beispielsweise bei der Neugeborenenengelbsucht oder beim Crigler-Najjar-Syndrom. Heute zeigen immer mehr Studien, dass ein leicht erhöhter Bilirubinspiegel eher positive Effekte mit sich bringen kann. Im Besonderen wird Personen mit Gilbert Syndrom (GS) ein gewisser Schutz gegenüber oxidativem Stress zugesprochen. Das antioxidative Potential kann weiters zu geringerer Inzidenz an Erkrankungen wie Krebs und kardiovaskulären Erkrankungen führen, was in einigen Studien bestätigt worden ist. Die schädigende Wirkung von freien Radikalen kann zu oxidativem Stress führen und Proteine und auch DNA angreifen. Antioxidantien bieten dem Körper Schutz vor solchen Schäden.

Das Gilbert Syndrom ist eine milde homozygot vererbte Form der Hyperbilirubinämie. Sie kommt in etwa 3 bis 17 % der Bevölkerung vor und die Bilirubinkonzentrationen liegen zwischen 17 und 84 $\mu\text{mol/L}$. Verantwortlich für diese erhöhten Werte ist die verminderte Aktivität der Uridindiphosphoglucuronat (UDP)-glucuronosyltransferase-1A1 (UGT1A1), die

in der Leber Unkonjugiertes Bilirubin (UCB) in seine konjugierten Formen umwandelt. Dies ist auf einen Polymorphismus an der Promoterregion des UGT1A1-Gens zurückzuführen.

Die Gunn Ratte ist ein weiter entwickelter Stamm der Wistar Ratte, die speziell gezüchtet wurde und einen autosomal rezessiv vererbten Mangel an UGT1A1 aufweist. Hierdurch kommt es zu einem erhöhten Wert an UCB im Plasma. Dies ermöglicht es, das beim Menschen vorkommende GS und Crigler-Najjar Syndrom Typ 1 an diesen Ratten zu untersuchen, da ihre UCB Konzentrationen diese Bereiche abdecken. Charakteristisch sind die gelbliche Fellfarbe und oft auch ein wackeliger Gang.

Der mögliche Zusammenhang zwischen leicht erhöhtem Bilirubinspiegel in GS und geringerem oxidativen Stress war Ausgangspunkt dieser Arbeit. Da Gunn Ratten durch ihren Gendefekt und dem daraus resultierenden hohen Bilirubinlevel ein gutes Modell dazu darstellen, wurden diese zur Untersuchung herangezogen. Lymphozyten, Kolon- und auch Leberzellen wurden isoliert und die jeweiligen DNA Schäden analysiert.

Diese Fall-Kontroll-Studie umfasste eine Gesamtzahl an 40 Ratten, die in vier Gruppen (n = 10 Tiere pro Gruppe) unterteilt wurden. Zwei repräsentierten die GS Gruppen (n = 20, homozygote Gunn Ratten), die anderen beiden die Kontrollgruppen (n = 20, heterozygote Gunn Ratten). Je eine Gruppe wurde oxidativem Stress durch Gammastrahlen ausgesetzt. Mittels Comet Assay wurden die DNA Schäden in den jeweiligen Zellen *ex vivo* analysiert.

Die Hypothese war, dass durch den erhöhten Bilirubinspiegel die bestrahlten Gunn Ratten geringere DNA Schäden aufweisen als ihre heterozygoten Artgenossen.

Die Durchführung der Studie, Laborarbeit, Auswertung der Daten und Literaturteil dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit Khatereh Najafi durchgenommen. Die Teile „*Literaturübersicht*“ und „*Material und Methoden*“ sind daher in beiden Arbeiten gleich.

2. Literaturübersicht

2.1. Oxidativer Stress (von K. Najafi)

2.1.1. Freie Radikale und oxidativer Stress

Unter dem Begriff "Freie Radikale" werden alle chemischen Verbindungen zusammengefasst, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen. Diese Verbindungen sind meist nicht stabil, jedoch hochreaktiv und können mit anderen Radikalen oder Molekülen reagieren, denen dabei ein Elektron entzogen wird [Aruoma, 1998].

Bereits im Jahr 1954 beschrieben Gerschman *et al.* die Bildung von oxidierenden freien Radikalen als die Ursache von Schädigungen durch Sauerstoffverbindungen [Gerschman et al., 1954].

Die für den menschlichen Körper relevantesten freien Radikale sind Hydroxylradikale ($\text{OH}\cdot$), Superoxidradikale ($\text{O}_2\cdot^-$), Peroxylradikale ($\text{RO}_2\cdot$) und Stickstoffradikale ($\text{NO}\cdot$). Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gehört ebenfalls zu dieser Gruppe, obwohl es selbst kein freies Radikal ist, es jedoch Radikalreaktionen hervorrufen kann. Daher wird überwiegend der Begriff „reactive oxygen species“ (ROS) oder „reactive nitrogen species“ (RNS) verwendet, um alle Verbindungen miteinzubeziehen [Aruoma, 1998; Valko et al., 2006].

Freie Radikale werden beispielsweise durch Bestrahlung mit UV-Licht, Röntgen- oder Gammastrahlen, durch Neutrophile und Makrophagen in Entzündungsreaktionen des Immunsystems, in Reaktionen von Metallionen, wie bspw. Eisen, oder als Nebenprodukte der Atmungskette in Mitochondrien gebildet, oder sind als Schadstoffe in der Atmosphäre vorhanden. Sie wirken demnach nicht nur von außen auf den Körper ein, sondern entstehen auch endogen [Cadenas, 1989; Valko et al., 2006]. Hierdurch haben freie Radikale oft eine gegensätzliche Wirkung – sie können einerseits in niedrigen Konzentrationen dem menschlichen Organismus dienlich sein (bspw. im

Immunsystem), oder aber auch höher konzentriert dem Körper schaden [Valko et al., 2004].

Mitochondrien sind endogen, durch die hohe Sauerstoffkonzentration, eine der Hauptquellen für Superoxidradikale [Inoue et al., 2003; Valko et al., 2006], Makrophagen und Peroxisome hingegen produzieren überwiegend Wasserstoffperoxid [Conner, Grisham, 1996; Valko et al., 2006].

Eisen ist unter normalen Umständen an Transferrin gebunden und wird durch dieses Protein transportiert. Ist es im Überfluss vorhanden, wird es als Ferritin gespeichert [Aruoma, 1998]. Während der Fenton-Reaktion reagiert jedoch freies Eisen, welches bei gestörter Hämostase gebildet wird, mit Wasserstoffperoxid, wobei Hydroxylradikale entstehen können [Aruoma, 1998].

Im Stoffwechsel von Bedeutung sind Antioxidantien, die freie Radikale durch Bereitstellung eines Wasserstoffatoms abfangen und somit ihre schädigende Wirkung eindämmen. Hierbei unterscheidet man zwischen enzymatischen und nicht enzymatischen Antioxidantien. Zur Gruppe der Enzyme gehören die Superoxiddismutase (SOD), die Glutathionperoxidase (GSH-Px) und die Katalase. Die SOD ist für die Beseitigung von Superoxidradikalen zuständig, wobei sie hier $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 und O_2 dismutiert. H_2O_2 wird wiederum durch die GSH-Px oder die Katalase abgebaut. Zu den nicht enzymatischen Antioxidantien gehören Vitamin C (Ascorbinsäure), Vitamin E (Tocopherol), Carotinoide, Ubiquinon, Harnsäure, Glutathion, Bilirubin oder α -Liponsäure [Aruoma, 1998; Valko et al., 2006].

Die Bildung von freien Radikalen im Organismus ist Teil des Stoffwechsels. Daher hat sich ein System von Antioxidantien zum Schutz gegen ihre schädliche Wirkung entwickelt. Von oxidativem Stress spricht man, wenn ein Ungleichgewicht zwischen ROS/RNS und entsprechenden Antioxidantien herrscht. Dieser kann zu Zellschäden, Gewebsschädigungen und anderen Krankheiten führen. Störungen des Gewebes können wiederum diesen Stress verstärken, da Phagozyten im aktivierten Zustand freie Radikale zur Abwehr bilden [Duthie et al., 1996; Aruoma, 1998].

Beispiele für die Wirkung von Radikalen sind folgende:

Peroxyradikale sind in der Lipidperoxidation involviert. Diese wird durch den Abzug eines Wasserstoffatoms an einer Seitenkette einer mehrfachungesättigten Fettsäure (PUFA) initiiert. Einige der Endprodukte der Lipidperoxidation scheinen als Promoter in der Karzinogenese zu dienen [Aruoma, 1998]. Als Beispiel hierfür wäre zu erwähnen, dass Lipidhydroperoxide proliferative Effekte auf die Kolonschleimhaut in Ratten gezeigt haben [Bull et al., 1984; Bull et al., 1988; Stone, Papas, 1997]. Weiters wäre Malondialdehyd zu nennen, welches als Produkt der Lipidperoxidation mutagen auf die DNA (Desoxyribonukleinsäure) in der Leber von Menschen zu wirken scheint [Chaudhary et al., 1994; Stone, Papas, 1997].

Hydroxylradikale sind hingegen hochreaktiv. In Kontakt zu anderen Molekülen entstehen weitere Radikale. Beliebte Reaktionspartner sind vor allem Proteine, DNA und PUFA [Aruoma, 1998].

Oxidativer Stress spielt ebenfalls eine Rolle in der Entstehung von Krankheiten, die besonders mit dem Alterungsprozess assoziiert sind. Schäden an DNA, Lipiden und Proteinen sind bekannt dafür, Atherosklerose, Arthritis und Krebs auslösen zu können [Valko et al., 2006;].

2.1.2. Oxidativer Stress, DNA-Schäden und der Zusammenhang mit Krebs

Oxidativer Stress wird vielfach mit der Entstehung und dem Verlauf verschiedener Erkrankungen in Zusammenhang gebracht. Hierzu gehören Krebs, Diabetes, Atherosklerose, (chronische) Entzündungen, Ischämie und HIV (human immunodeficiency virus) [Dröge, 2002].

Bei einigen Erkrankungen sind oxidative Veränderungen des Thiol/Disulfid-Redox Status zu verzeichnen, wobei eine erhöhte Produktion an freien Radikalen durch Mitochondrien zu finden ist. Bei Entzündungen entsteht oxidativer Stress beispielsweise durch eine erhöhte Aktivität der NAD(P)H-Oxidase, bedingt durch Cytokine [Dröge, 2002].

Die DNA besteht aus drei verschiedenen Bausteinen. Den Hauptstrang bilden die Desoxyribose und die Phosphatgruppe, an den Zuckerring gebunden sind die Purin- und Pyrimidinbasen. Zu den Purinen gehören Adenin und Guanin, zu den Pyrimidinen Thymin und Cytosin. Üblicherweise bilden zwei DNA-Stränge eine Doppelhelix, indem zwischen den Strängen Basenpaare hergestellt werden [Perona et al., 2001].

Wie bereits oben erwähnt sind Hydroxylradikale besonders reaktionsfreudig und greifen vorzugsweise Proteine und die DNA an. Zu diesem Effekt zählen Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA, Schädigungen der Purin- und Pyrimidinbasen, wobei die Purine vorzugsweise angegriffen werden, oder Abwandlungen der Desoxyribose [Dizdaroglu et al., 2002; Valko et al., 2006; Azzam et al., 2011a]. Ein Resultat davon könnten Veränderungen des genetischen Materials sein, was wiederum zu Mutation, der Karzinogenese und Alterung führt [Valko et al., 2006].

Als Biomarker für oxidativen Stress, der auch involviert ist in die Karzinogenese, kann das 8-Hydroxyguanin (8-OH-G) dienen. Es entsteht in Folge der Reaktion von Guanin mit einem Hydroxylradikal (siehe Abb. 1.) [Valko et al., 2006].

8-OH-G, oder auch 8-oxo-G genannt, wird mit Mutationen in Zusammenhang gebracht [Grollman, Moriya, 1993; Collins, 2009b].

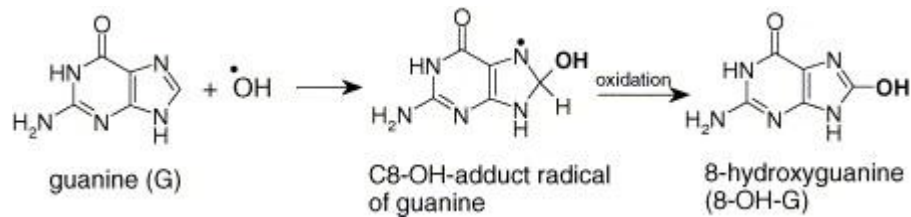


Abb. 1. Reaktion von Guanin mit Hydroxylradikal [nach Valko et al., 2006]

Ein weiterer Einflussfaktor könnte auch die Wirkung von freien Radikalen als *secondary messenger* auf Signaltransduktionswege sein. Durch diese ist es Zellen möglich, miteinander zu kommunizieren. Informationen werden von außen, bspw. von Hormonen, Neurotransmittern, Cytokinen oder Wachstumsfaktoren, in die Zelle weitergegeben. Diese Informationen können zum Beispiel der Genexpression dienen und werden in der Zelle durch Transkriptionsfaktoren an den Zellkern übertragen [Hensley et al., 2000; Poli et al., 2004; Valko et al., 2006].

Freie Radikale beeinträchtigen solche Signaltransduktionswege aufgrund ihrer Fähigkeit, auf den Redox-Status einwirken zu können [Thannickal, Fanburg, 2000; Valko et al., 2006]. Sie können entweder eine Zellproliferation oder aber auch den Zelltod hervorrufen [Valko et al., 2006].

2.2. Comet Assay (von S. Schreidl)

Comet Assay, auch genannt Einzelgelelektrophorese (engl.: single cell gel electrophoresis, SCGE), ist eine sehr effiziente Methode für die Detektion oxidativer Schäden in der DNA [Collins, 2009a]. Es eignet sich für die Detektion von Doppel- und Einzelstrangbrüchen, alkalisch-sensitive-Brüche und DNA-crosslinks [Hartmann et al., 2003; Olive, Banath, 2006]. Um genotoxische Effekte in experimentellen Human- und Tierstudien nachzuweisen, ist Comet Assay eine vertrauenswürdige und geeignete Methode [Moller, 2005].

2.2.1. Entwicklung

Erstmals entwickelt wurde diese spezielle Technik 1984 von Östling und Johanson, die das Verfahren auf vorangegangene experimentelle Untersuchungen betreffend der DNA Doppelhelix von Cook *et al.* 1976, stützen. Durch Lyse einer in Gel eingebetteten Zellsuspension kommt es zu einer Auflösung der Membran, des Zytoplasmas und des Nukleoplasmas der DNA. Die Nukleosomen werden aufgelockert und die Histone gehen in Lösung. Das Nukleotid mit der gelockerten nuklearen Matrix, bestehend aus dem Proteingerüst der RNA (Ribonukleinsäure) und der DNA, bleibt übrig [Cook et al., 1976]. Weiters zeichnen sich DNA Strangbrüche dadurch aus, dass sie sich unter einem Fluoreszenzmikroskop anhand eines Kometenschweifes zeigen, dessen Intensität mit dem Strangbruch in Korrelation steht [Ostling, Johanson, 1984]. Durch die Anwendung des Comet Assay unter stark alkalischen Bedingungen ($\text{pH} > 13$), kommt es zu einer weiteren Lockerung der kompakten negativ geladenen DNA Struktur, die unter elektrophoretischen Bedingungen in Richtung der Anode wandert und dadurch mehr alkali-empfindliche Seiten aufdeckt [Singh et al., 1988; Angelis et al., 2000; Piperakis, 2009].

Die wichtigsten Einflussgrößen des Comet Assays sind der pH Wert der Elektrophoreselösung, die Temperatur, sowie die Zeit der Lyse. Dabei hat sich gezeigt, dass unter stark alkalischen Bedingungen, die Einwirkdauer der Lyse

über Nacht bei einer Temperatur von 5 °C die Effizienz und die Sensitivität signifikant erhöht werden. [Banath et al., 2001; Speit et al., 2004].

2.2.2. Vorteile

Comet Assay ist sehr vielfältig einsetzbar, da es sich für den Nachweis von DNA Schäden, ausgelöst durch Lebensstil, Umwelteinflüsse, Ernährung, Bewegung, Hypoxie und Sonnenlicht, in allen Zellen von Säugetieren, in den verschiedensten Studienbereichen eignet: Für genotoxische Tests, ökologisches Monitoring, als Diagnose und Beurteilungsmethode für DNA Schäden in Human- und Tierstudien, bei *in vitro* Messungen etc. [Collins, 2004; Moller, 2005; Dhawan et al., 2009].

Da nur eine geringe Zellzahl nötig ist (~ 10 000 Zellen) [Singh et al., 1988; Dhawan et al., 2009] müssen aufwendige Methoden wie das radioaktive Markieren des Materials, nicht eingesetzt werden. Dies ermöglicht eine einfache, rasche und dadurch kostengünstige Durchführung [Singh et al., 1988; Moller, 2005; Olive, Banath, 2006]. Unter alkalischen – im Gegensatz zu semialkalisch bzw. neutralen – Bedingungen, zeigt sich eine höhere Sensitivität für alkalisch-empfindliche Brüche, die bereits direkt nach ihrer Entstehung ermittelt werden können [Collins, 2004; Speit et al., 2004; Sasaki et al., 2000].

Bei *in vivo* Modellen lassen sich alle Gewebeeinheiten untersuchen, aus denen man einen Single-Zell/Nukleus-Suspension herstellen kann.

Um die Endergebnisse zwischen unterschiedlichen Laboratorien vergleichbar zu machen, ist es von Bedeutung, die einzelnen Schritte der Durchführung (Agarose- und Enzymkonzentrationen, Dauer der Unwinding- und Elektrophoresephase etc.) zu erläutern, da diese einen erheblichen Einfluss auf die Endergebnisse darstellen. [Forchhammer et al., 2012].

2.2.3. Zellen

In den Zellen des Blutes, des Kolon und der Leber ist der eventuelle antioxidative Effekt des Bilirubins am größten und sollte daher genauer untersucht werden.

Lymphozyten:

Die protektive Wirkung des Bilirubins gegenüber seinem Transportprotein Albumin, die einfache Bestimmbarkeit der Bilirubinkonzentration, als auch die Tatsache, dass im Blut der Transport durch den gesamten Organismus stattfindet, machen diese Zellen zu einem wichtigen Indikator für weitere Untersuchungen [Neuzil, Stocker, 1993b; Bulmer et al., 2008c].

Hepatozyten:

Da die Leber ein wichtiges Medium für den Metabolismus, als auch für absorbierte Substanzen (in unserem Fall Bilirubin) darstellt, empfiehlt es sich dessen Epithelzellen zu untersuchen. [Hartmann et al., 2003].

Kolonozyten:

Kolonkrebs steht in direktem Zusammenhang mit Überernährung und hat in den Industrieländern eine zehnmal höhere Prävalenz als in Entwicklungsländern, wobei Männer meistens häufiger betroffen sind als Frauen [Goldin-Lang et al., 1996; Pool-Zobel et al., 1999a; Sesink et al., 1999; Stone, Papas, 1997]. Die Entstehung ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem die Schlüsselkomponente ein Ungleichgewicht zwischen Zellabbau und Differenzierung ist. Epithelzellen stehen in direktem Kontakt mit dem Darmlumen und zählen zu den am schnellsten sich differenzierenden Zellen in einem lebenden Organismus. Kennzeichnend hierfür sind eine erhebliche Anzahl von DNA Strangbrüchen,

als auch von oxidierten Pyrimidinbasen [Preston-Martin et al., 1990; Pool-Zobel et al., 1999a; Stone, Papas, 1997]. Dadurch gewinnen sie bei unserer Studie an Bedeutung, da sie als Indikator für einen möglichen antioxidativen Effekt des Bilirubins herangezogen werden können.

Aktuelle Studien zeigen sogar einen direkten Zusammenhang zwischen Kolonkrebs und vermindertem Serum Bilirubin [Zucker et al., 2004a; Jiraskova et al., 2012]. Bei *in vitro* Studien löst Bilirubin in Kolonzellen sogar Apoptose aus [Keshavan et al., 2004a].

Kontrollzellen

Als Kontrollgruppe sollten zusätzlich standardisierte Zellen, beispielsweise Lymphozyten, bei jeder Analyse hinzugefügt werden. Diese können im Voraus aufbereitet, aliquotiert und gekühlt gelagert (- 80 °C) werden, um sie nach Bedarf weiter zu verarbeiten [Collins, 2004].

2.2.4. Enzyme

Zu einer Erhöhung der Sensitivität und der Selektivität kommt es durch den Einsatz von spezifischen Reparaturenzymen, die geschädigte DNA Basen zu DNA Strangbrüchen umwandeln und somit mit Comet Assay detektierbar sind [Collins et al., 2008]. Durch die DNA-Glykosylase-Aktivität werden oxidierte Basen und ringgeöffnete Imidazole herausgeschnitten. Dadurch entsteht eine abasische Stelle, die mittels Endonuklease III (ENDO III) für oxidierte Pyrimidinbasen und Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) für oxidierte Purinbasen detektierbar ist [Doetsch et al., 1987; Boiteux, 1993; Laval, 1996]. Eine Verschleierung der enzyminduzierten Strangbrüche kann dann entstehen, wenn bereits eine hohe DNA Schädigung in den Zellen vorhanden ist [Collins, 2009a].

2.2.5. Auswertung

Eine visuelle Beurteilung via Bildanalyse, die durch ein Fluoreszenzmikroskop auf einen Computermonitor übertragen wird, ist eine geeignete Methode, um die Comet Assay Ergebnisse zu analysieren [Forchhammer et al., 2008]. Manche stark geschädigte Zellen erscheinen als sogenannte „Geisterzellen“, ohne messbaren Zellkern. Diese sollten nicht als apoptotische bzw. nekrotische Zellen verstanden werden, da diese (wahrscheinlich während des Elektrophoresevorgangs) aufgrund ihres geringen Molekulargewichts verloren gehen. Wegen des noch nicht geklärten Hintergrunds und vielen theoretischen Ansätzen dieser Zellen, sollten sie nicht in die Bewertung miteinfließen [Hartmann et al., 2003; Collins, 2004].

Die primären Endpunkte des Comet Assay können unter verschiedenen Aspekten betrachtet werden: Tail-Länge, Tail-Moment, Fluoreszenzstärke des DNA Schweifs (%) und eventuelle Kategorisierung der Nuklei in verschiedene Klassen [Forchhammer et al., 2008]. Der Tail-Moment ist die geeignetste Messgröße für die Auswertung der Ergebnisse [Olive et al., 1990; Lee et al., 2004].

Tail-Moment: Hier wird die Länge des Schweifs mit dem migrierten DNA Anteil im Schweif multipliziert. Die Tail-Länge misst von der vorderen Kopfkante bzw. Mitte des Kopfes bis zum Ende des Schweifs. Sie steht für die maximale Länge der gesamten DNA Migration [Albertini et al., 2000].

Es wird empfohlen die Gele erst nach einer gewissen Lagerungszeit auszuwerten, da die Zellen sich dadurch in der gleichen Ebene befinden und somit das Mikroskopieren erleichtert wird [Collins, 2004].

2.3. Bilirubin (von K. Najafi)

2.3.1. Struktur und Eigenschaften

Bilirubin gehört wie Biliverdin zur Gruppe der Gallenfarbstoffe. Diese endogenen Moleküle, die der Familie der Porphyrine zugesprochen werden, wurden früher als Abfallprodukte des Hämstoffwechsels betrachtet [Neuzil, Stocker, 1993a; Bulmer et al., 2008b].

Die Tetrapyrrol-Struktur und die sechs vorhandenen Wasserstoffbrückenbindungen (siehe Abb. 2.) geben Bilirubin bestimmte biologische und chemische Eigenschaften [Vitek, Ostrow, 2009].

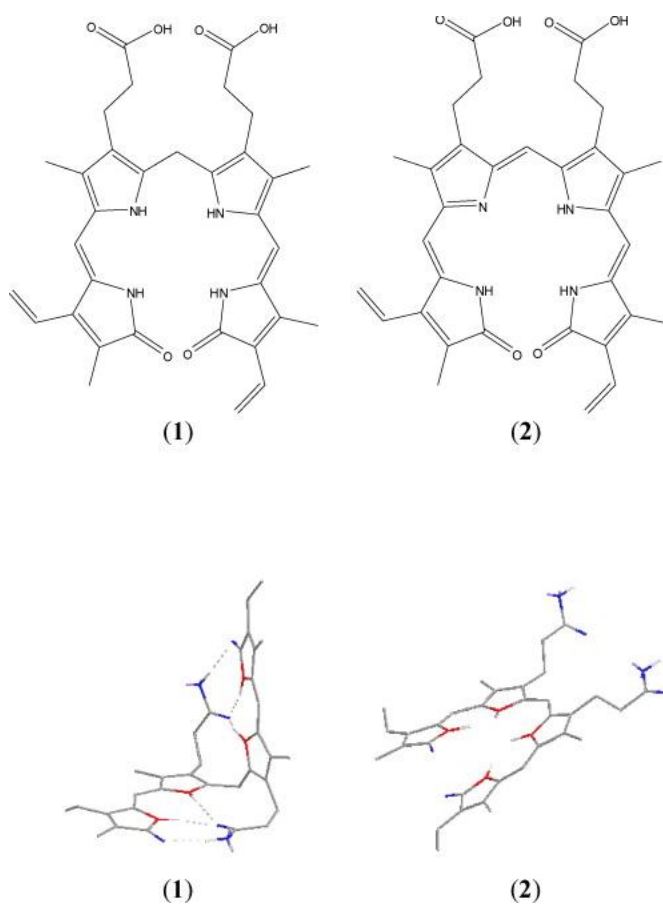


Abb. 2. Zwei- und dreidimensionale Struktur von (1) Unkonjugiertem Bilirubin und (2) Biliverdin [Bulmer et al., 2008b].

Bilirubin ist sehr empfindlich gegenüber Licht und Sauerstoff, wird im sauren und basischen Milieu rasch abgebaut und hat eine starke Affinität zu Proteinen [Zelenka et al., 2008].

2.3.2. Stoffwechsel

Bilirubin wird im menschlichen Körper zu etwa 80 % aus Hämoglobin durch den Abbau von alternden Erythrozyten und zu 20 % aus anderen Häm-haltigen Proteinen produziert. Täglich entstehen etwa 300 bis 400 mg Bilirubin [Robinson, 1968; Schmid, McDonagh, 1975]. Unter physiologischen Bedingungen wird Häm aus roten Blutkörperchen hauptsächlich in der Leber, aber auch in der Milz, im Knochenmark und durch Makrophagen zu Bilirubin umgebaut [Keene et al., 1965; Schmid, McDonagh, 1975].

(Unkonjugiertes) Bilirubin (UCB) entsteht in Folge des Häm-Abbaus durch die Hämoxygenase und die Biliverdinreduktase. [Zelenka et al., 2008]. Die Hämoxygenase arbeitet unter Bildung von Kohlenstoffmonoxid und Eisen und wandelt Häm zu Biliverdin um. Biliverdin wiederum wird durch die Biliverdinreduktase, welche NADPH (Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) abhängig ist, zu Unkonjugiertem Bilirubin reduziert [Pimstone et al., 1971; Bulmer, et al., 2008]. Das daraus resultierende Bilirubin ist lipophil/hydrophob und geht mit Albumin eine starke Bindung ein. In dieser Form wird es auch im Blut transportiert [Brodersen, 1979; Bulmer et al., 2008b].

Unter normalen Umständen wird das Bilirubin anschließend in der Leber weiter umgewandelt und konjugiert. Hierzu wird es im Endoplasmatischen Retikulum (ER) durch die Uridindiphosphoglucuronat (UDP)-glucuronosyltransferase-1A1 (UGT1A1) zu wasserlöslichen Monoglucuroniden und Diglucuroniden umgebaut, welche durch aktiven Transport durch das multidrug resistance protein 2 (MRP2) weiters in die Galle getragen werden (siehe Abb. 3.) [Keppler, König, 2000; Zucker et al., 2004b; Bulmer et al., 2008b].

Durch den Gallengang gelangen die Bilirubinkonjugate in das Duodenum, wobei sie von den im Gastrointestinal (GI) Trakt befindlichen bakteriellen Enzymen wie β -Glucuronidase wieder in die unkonjugierte Form gespalten werden [Skar, Saxerholt, 1989; Bulmer et al., 2008b]. Das Bilirubin wird anschließend größtenteils durch Bakterien zu Urobilin und Stercobilin umgewandelt [Watson et al., 1969; Bulmer et al., 2008b].

Besonders gut zu erkennen ist der Häm-Abbau während des Verlaufs von Blutergüssen. Das Hämoglobin der roten Blutkörperchen, die ins Gewebe eintreten, wird in Gallenfarbstoffe umgewandelt, während sich der Erguss zuerst rot färbt (Häm), dann in eine blau-grüne (Biliverdin) Färbung übertritt und anschließend gelb (Bilirubin) erscheint [Schmid, McDonagh, 1975].

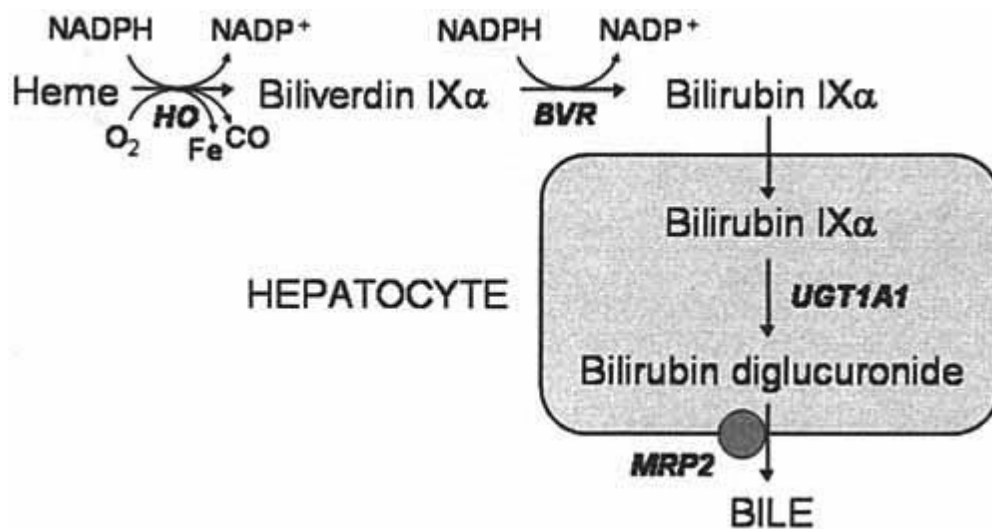


Abb. 3. Bilirubin Stoffwechsel [Zucker et al., 2004b]

Bei stark erhöhter Konzentration – bei übermäßiger Hämolyse, verringerter Aktivität der UGT1A1 (siehe Gilbert Syndrom und Crigler-Najjar) oder verminderter Aufnahme – kann Bilirubin neurotoxisch wirken [Zucker et al., 2004b; Zelenka et al., 2008].

2.4. Antioxidative Wirkung von Bilirubin (von K. Najafi)

2.4.1. Antioxidative Wirkung allgemein

Es ist bekannt, dass Unkonjugiertes Bilirubin im Organismus bei leicht erhöhter Konzentration als Antioxidans wirksam sein kann, was positive Effekte auf die Prävention von Krankheiten wie Krebs und Atherosklerose haben könnte [Barañano et al., 2002; Vitek, Schwertner, 2007; Zelenka et al., 2008].

Ob es neurotoxisch oder antioxidativ wirkt, hängt von der Plasmakonzentration von freiem Bilirubin ab [Doré et al., 1999; Ostrow et al., 2004b; Zelenka et al., 2008].

Bilirubin wird größtenteils gebunden an das Protein Albumin im Blut transportiert. Es wird angenommen, dass Bilirubin sein Trägerprotein vor Oxidation durch Hydroxyl-, Hydroperoxyl- und Superoxidradikalen schützt und eine durch diese ausgelöste Radikalreaktionskette unterbricht [Neuzil, Stocker, 1993a].

In einer neueren Studie aus Japan wurde der Status an oxidativem Stress in Männern mit Gilbert Syndrom mit dem von gesunden Männern verglichen. Gemessen wurde das Ausmaß an oxidativem Stress anhand der Serumkonzentration von Malondialdehyd und an der Ausscheidung von 8-hydroxy-2'-desoxyguanosin (8-OHdG) im Urin. Die Ergebnisse demonstrierten, dass Personen mit Gilbert Syndrom, die demnach einen leicht erhöhten Bilirubinspiegel aufwiesen, geringere Level an oxidativem Stress verzeichneten als gesunde [Maruhashi et al., 2012].

Bilirubin hat nicht nur die Fähigkeit, sein Trägerprotein vor oxidativen Angriffen zu schützen. Albumin-gebundenem Bilirubin (Alb-Br) wird ebenfalls die Fähigkeit nachgesagt, Peroxylradikale abzufangen und damit besonders vor Lipidperoxidation zu schützen. Die Reaktion läuft folgendermaßen ab: $\text{Alb-Br} + 2\text{ROO}\cdot \rightarrow \text{Alb-BV} + 2\text{ROOH}$. Hierbei entsteht Biliverdin, was wiederum rasch durch die Biliverdinreduktase zu Bilirubin reduziert wird. Die

Biliverdinreduktase hat dadurch eine Art Recyclingeigenschaft inne. Durch die Bindung an Albumin kann es weiters durch den kompletten Kreislauf getragen werden [Stocker et al., 1987; Barañano et al., 2002].

2.4.2. Bilirubin und Kardiovaskuläre Erkrankungen

Die Entstehung von Atherosklerose wird unter anderem auf die Oxidation von LDL (low density lipoprotein) zurückgeführt, was wiederum infolge von Lipidperoxidase durch freie Radikale geschieht [Esterbauer et al., 1993]. Wu *et al.* zeigten in ihrer *in vitro* Studie, dass höhere Konzentrationen an Unkonjugiertem als auch Konjugiertem Bilirubin das LDL vor Oxidation durch künstlich zugesetzte Peroxylradikale schützten, wobei der Effekt für UCB stärker war. Somit könnte Bilirubin einen möglichen Schutz gegenüber Plaque und in weiterer Folge Kardiovaskulären Erkrankungen bieten [Wu et al., 1996].

In einer Studie von Bulmer *et al.* wurde an neun Personen mit Gilbert Syndrom und zwölf Kontrollen der Antioxidationsstatus im Plasma, das Plasma-Malondialdehyd, die antioxidative Enzymaktivität von roten Blutkörperchen, etc. gemessen. Ziel war es, einen Zusammenhang zwischen erhöhtem Bilirubinspiegel, ausgelöst durch das Gilbert Syndrom, und verringerter Serum-Oxidation zu ziehen. Das Ergebnis zeigte, dass Personen mit GS einen höheren antioxidativen Status haben und resistenter gegenüber Serum-Oxidation sind. Dies könnte auch eine verringerte Prävalenz für Kardiovaskuläre Erkrankungen mit sich bringen [Bulmer et al., 2008a].

2.4.3. Bilirubin und Krebs

Einige Studien haben sich bereits mit dieser Thematik auseinandergesetzt.

In der Belgium Inter-university Research on Nutrition and Health (BIRNH) Studie wurden an 5460 Männern und 4843 Frauen über einen Zeitraum von 10 Jahren unter anderem die Auswirkungen des Serum Bilirubinstatus auf Krebsmortalität untersucht. Die Studie brachte hervor, dass Männer mit einem hohen Serum Bilirubinspiegel eine signifikant geringere Nicht-Lungen-Krebsmortalität aufweisen als solche mit einem niedrigen. Für Frauen wurde ein ähnlicher Effekt zugeschrieben, die Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant. Nicht nachgewiesen werden konnte ein Zusammenhang zwischen Bilirubinkonzentration und Kardiovaskulären Erkrankungen [Temme et al., 2001].

Im großangelegten Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) in den USA wurde unter anderem die Serum Bilirubinkonzentration in Männern und Frauen unterschiedlichen Alters und unterschiedlicher Herkunft gemessen. Die Untersuchungen ergaben, dass die Konzentration an Serum Bilirubin bei Männern höher war als bei Frauen, bei Rauchern verringert war und sich nach Ethnie unterschied. Ebenfalls ließ die Studie durchscheinen, dass Personen mit Krebsinzidenz geringere Konzentrationen an Bilirubin aufwiesen als gesunde. Dieses Ergebnis war sogar deutlicher in Krebsarten, die den GI Trakt (z.B. Kolon oder Rektum) betrafen, zu sehen. Eine Steigerung von 1 mg/dL Bilirubin im Serum wurde mit einer verminderten Prävalenz an Kolonrektal-Krebs assoziiert, wobei dieser Zusammenhang bei Frauen stärker zu erkennen war [Pool-Zobel et al., 1999b; Zucker et al., 2004b].

Ein Grund für die differierenden Serum Bilirubinkonzentrationen zwischen Männern und Frauen könnte die verschiedene Wirkung der Steroidhormone auf die UGT1A1 Aktivität sein. Testosteron könnte die Enzymaktivität dämpfen, während Estradiol und Progesteron diese steigern.

Geringere Bilirubinkonzentrationen bei Rauchern könnten auf einen gesteigerten „Verbrauch“ an Bilirubin, ausgelöst durch hohe Präsenz an freien Radikalen, zurückzuführen sein [Zucker et al., 2004b].

In einer *in vitro* Studie wurde Bilirubin eine apoptotische Wirkung nachgewiesen. Bei einer Konzentration von bis zu 50 μM Bilirubin wurde Apoptose in Kolonkrebszellen induziert [Keshavan et al., 2004b].

2.5. Hyperbilirubinämie (von K. Najafi)

Unter physiologischen Bedingungen beträgt die Plasma Bilirubinkonzentration 5 bis 17 $\mu\text{mol/L}$ [Stocker et al., 1987].

Unter bestimmten Voraussetzungen kann diese jedoch leicht bis stark erhöht sein und differierende Folgen mit sich ziehen. Es wird je nach Höhe des Bilirubinspiegels zwischen verschiedenen Formen der Hyperbilirubinämie unterschieden. Die wichtigsten sind das Gilbert Syndrom, das Crigler-Najjar Syndrom und die Neugeborenenhyperbilirubinämie, die in Folge besprochen werden.

2.5.1. Gilbert Syndrom

Das Gilbert Syndrom wurde zum ersten Mal 1901 von Gilbert und Lereboullet beschrieben.

Personen mit Gilbert Syndrom (GS) weisen eine leichte chronische (unkonjugierte) Hyperbilirubinämie auf, die jedoch als unbedenklich einzustufen ist. Lebererkrankungen und offenkundige Hämolyse bleiben hierbei aus. Nur etwa 3 bis 17 % der Bevölkerung betrifft dieses Syndrom, welches autosomal rezessiv vererbt wird. [Bosma et al., 1995; Fertrin et al., 2002; Bulmer et al., 2008a].

Die Aktivität des UGT1A1-Enzyms in der Leber liegt bei etwa 30 %, wodurch es zu einem Anstieg an Unkonjugiertem Bilirubin im Körper kommt [Bosma et al., 1995].

GS wurde mit einem Polymorphismus an der Promoterregion des UGT1A1-Gens in Verbindung gebracht, in dem eine veränderte Anzahl an TA (Thymin-Adenin) Wiederholungen die Länge des TATA-Elements abändert. Dieses

Element stellt die Bindungsstelle für Faktor IID, welches für Transkriptionsinitiation wichtig ist, dar. Diese Wiederholungen – (TA)₇ statt normal (TA)₆, oder besser A(TA)₇TAA statt A(TA)₆TAA – werden mit einer verringerten Transkription des UGT1A1-Gens und mit einer erhöhten Bilirubinkonzentration assoziiert. Weiters scheinen Personen mit GS homozygot für dieses zusätzliche Allel zu sein [Bosma et al., 1995; Fertrin et al., 2002].

Die durchschnittlichen Konzentrationen dieser benignen Hyperbilirubinämie liegen bei > 17,1 µmol/L (bzw. bis 84 µmol/L) [Kamisako et al., 2000; Bulmer et al., 2008a].

2.5.2. Crigler-Najjar Syndrom

Das Crigler-Najjar Syndrom (CNS) gehört wie GS zu den unkonjugierten Hyperbilirubinämien. Hier werden jedoch zwei Typen unterschieden.

CNS Typ I wird ausgelöst durch genetische Läsionen, die eine komplette Inaktivität der UGT1A1 hervorrufen. Dies führt zu einer schweren Hyperbilirubinämie, mit Bilirubinkonzentrationen größer als 340 µmol/L [Bosma et al., 1995; Kamisako et al., 2000].

CNS Typ II stellt eine moderate bis schwere Hyperbilirubinämie dar und ist charakterisiert durch Bilirubinspiegel von etwa 85 bis 339 µmol/L. Die Aktivität der UGT1A1 liegt hier bei ca. 10 % [Kamisako et al., 2000].

Schwere Hyperbilirubinämien wie in Typ I können eine Bilirubin Enzephalopathie (Kernikterus) hervorrufen, was nicht nur in Neugeborenen (siehe auch Kapitel 2.5.3.) ernste Folgen hat, sondern auch beim Erwachsenen neurotoxische Effekte mit sich bringt [Kadacol et al., 2000].

2.5.3. Neugeborenenhyperbilirubinämie und neurotoxische Effekte

In einigen Fällen kann es beim Neugeborenen auf Grund fehlender bzw. noch nicht ausgereifter physiologischer Funktionen zu einer Anhäufung an Bilirubin, sprich Neugeborenenengelbsucht, kommen. Exzessive Produktion und auch der beeinträchtigte Konjugationsschritt in der Leber führen hier zu einem Überschuss an Bilirubin, was wiederum eine Enzephalopathie bzw. Kernikterus hervorrufen kann [Gourley, 1997; Ostrow et al., 2004b].

UCB kann sich stark auf das Nervensystem auswirken. Selbst kurzfristige Belastungen können bereits die Übertragungsfähigkeit von Synapsen im Hippocampus beeinflussen und Störungen in Lernfähigkeit und Erinnerungsvermögen hervorrufen [Ostrow et al., 2004b].

Kann die Leber das Bilirubin nicht ausscheiden bzw. sind die Kapazitäten erschöpft, kann chronische und übermäßige Produktion an Bilirubin, wie es bei Neugeborenenhyperbilirubinämie der Fall ist, zu Toxizität und akuten neurologischen Schäden führen [Bulmer et al., 2008b]. Vor allem in den ersten Tagen nach der Geburt sollte auf Neugeborene mit Gelbsucht geachtet werden, da ein längerfristig angestiegenes Level an Bilirubin gerade in diesem frühen Stadium weitreichende Folgen auf die neurologische Entwicklung haben könnte [Maisels, Newman, 1998].

Weiters können erhöhte Konzentrationen an UCB in Astrozyten und Neuronen toxisch wirken und Schäden an Mitochondrien und Plasmamembranen erzeugen [Ostrow et al., 2004b].

2.6. Gunn Ratten (von S. Schreidl)

Die Gunn-Ratte ist ein weiter entwickelter Stamm der Wistar-Ratte (Wistar Institute for Anatomy and Biology, University of Pennsylvania, USA) und wurde 1934 in Toronto (Kanada) erstmals gezüchtet. Aufgrund des autosomal rezessiv vererbten Mangels des Enzyms UGT1A1 kommt es zu einem erhöhten Wert des Unkonjugierten Bilirubins im Blutplasma.

Ihr äußeres Erscheinungsbild zeichnet sich durch ein gelbliches Fell als auch durch einen wackeligen Gang aus [Gunn, 1944]. Sie ist ein geeignetes Modell, um zirkulierendes Bilirubin in der Blutbahn als auch in Organen wie Leber und Kolon zu untersuchen [Gunn, 1944; Fevery et al., 1977; Iyanagi, 1991]. Daher kann die Gunn Ratte mit dem beim Menschen vorkommenden Crigler-Najjar Typ 1 und Gilbert Syndrom verglichen werden [Toietta et al., 2005]. Bei stark erhöhten Werten des Unkonjugierten Bilirubin kommt es zu Schäden des Zentralnervensystems als auch des Gehirns der Ratte [McDonald et al., 1998; Ostrow et al., 2004a].

Eine Normalisierung des Serum Spiegels in Gunn Ratten bewirkt man durch:

- Gabe von pharmazeutischen Präparaten, beispielsweise durch entsprechende UGT1A1 Enzyme [Toietta et al., 2005; Schmitt et al., 2010b], Gallensalze [Cuperus et al., 2009], Zinksalze [Vitek et al., 2005].
- durch operative Eingriffe der Leber [Schmitt et al., 2010a]
- Phototherapie [Ostrow, 1971, Chang et al., 2005].

Die Gunn Ratte zeigt eine Resistenz gegen Angiotensin II induzierten oxidativen Stress [Pflueger et al., 2005], weist eine erhöhte Urin Ausscheidung auf (Polyurie) [Gunn, 1944] und ihr erhöhter Bilirubinspiegel wird auch als Wirkung gegen Hypertonie und dadurch eventuell protektiv gegen Kardiovaskuläre Erkrankungen diskutiert [Nath et al., 2007].

2.7. Ionisierende Strahlung (von S. Schreidl)

2.7.1. Allgemein

Ionisierende Bestrahlung eignet sich als Methode, um in einem Organismus eine Radikalproduktion zu bewirken [Riley, 1994]. Sie kann durch unterschiedliche Mechanismen zu einem Zelluntergang führen. Entweder auf direktem Weg auf die Atomstruktur einer Zelle und verändert diese, oder indirekt durch die Radiolyse des Wassers, indem sie die Nukleinsäuren, Proteine und Lipide schädigt und freie Radikale erzeugt [Hall, 2006 ; Azzam et al., 2011b].

Allgemein unterscheidet man zwischen einer niedrigen (~ 1 Gy) und einer hohen (> 10 Gy) Strahlendosis [Somosy et al., 2002]. Die Energiedosis wird durch die Formel $\frac{\text{Energie (J)}}{\text{Masse (kg)}}$ definiert. Einheit: Gray (Gy)

2.7.2. Indirekt ionisierende Strahlung: Gammastrahlung

Unter Gammastrahlung versteht man eine elektromagnetische Strahlung, die 1900 durch den französischen Chemiker Paul Ulrich Villard entdeckt wurde [Gerward, 1999]. Sie entsteht durch den radioaktiven Zerfall von bspw. ^{60}Co , ^{137}Cs und weist einen niedrigen linearen Energietransfer (LET) auf.

Da bei der Absorption der Gammastrahlung immer eine Ionisation stattfindet und es daher zur Wechselwirkung mit der Elektronenhülle des Materials kommt, gibt es keine Kernreaktion. Zwar ändert sich der Energiegehalt des Kerns, nicht jedoch seine Kernladungs- und Massenzahl. Daher entsteht auch kein radioaktives Material. Interagieren nun Gammastrahlen mit Materie, so kommt es zu einer Reihe von Wechselwirkungen [Volkmer, 2007].

Es findet immer eine Abschwächung des γ -Strahls statt, welche durch die Formel $I/I_0 = \exp(-\mu \cdot d)$ definiert ist. I/I_0 gibt den Bruchteil der durchgelassenen

Intensität an, die durch den Abschwächungskoeffizient μ und der Schichtdicke d bestimmt wird [G. Schatz, 2010].

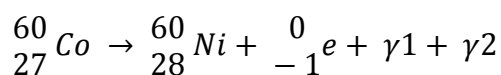
Der lineare Schwächungskoeffizient μ hängt nicht nur von der Eigenschaft des Materials ab, sondern auch von der Energie der eintreffenden Photonen. Der Grund hierfür hängt von drei elementaren Schritten ab, die hier zum Einsatz kommen: Der Photoeffekt τ , der die Umwandlung des Photons in ein Elektron beschreibt, der Compton-Effekt σ , der für die Streuung des Photons und die Entstehung eines Elektrons verantwortlich ist und der sogenannte Paarbildungseffekt κ , der bei Photoenergien $> 1.02 \text{ MeV}$ das Photon in ein Elektron-Positron Paar umwandelt. Die Formel hierfür lautet $\mu = \tau + \sigma + \kappa$ [Volkmer, 2007; G. Schatz, 2010].

Gammastrahlung besitzt eine hohe Durchtrittskraft gegenüber dem zu bestrahlenden Material. Das bedeutet einerseits, dass dadurch eine repräsentative Bestrahlung gewährleistet wird, andererseits die Abschirmung der nicht zu bestrahlenden Umwelt ebenfalls eine große Rolle spielt. Einzelne Gammaquanten können beliebig dicke Materieschichten durchdringen, wobei die Wahrscheinlichkeit hierfür mit wachsender Schichtdicke immer geringer wird. Die sogenannte Halbwertsschicht, ist von der Strahlungsintensität und vom verwendeten Material abhängig und verringert die Energie der Gammaquanten auf die Hälfte [Hoffmann, Krischewski, 2002; IAEA, 2005; G. Schatz, 2010; Volkmer, 2007].

Kobalt-60

Dieses Radionuklid wird, aufgrund seines leichten Herstellungsverfahrens und seiner hydrophoben Eigenschaft gerne als Quelle für Gammastrahlung verwendet [IAEA, 2005].

^{60}Co zerfällt durch Beta-Zerfall in ein stabiles, nicht radioaktives Nickelisotop $^{60}\text{Ni}_{28}$, wobei es bei einem maximalen Energieniveau von 0.313 MeV ein negatives Beta-Teilchen emittiert. Das Reaktionsschema hierfür lautet:



Die zwei freigesetzten Photonen (γ_1 , γ_2), welche für die Bestrahlung des zu untersuchenden Organismus verantwortlich sind, besitzen eine Energie von 1.173 MeV und 1.332 MeV (siehe Abb. 4.). Die Halbwertszeit von ^{60}Co beträgt 5.27 Jahre [IAEA, 2005; Volkmer, 2007].

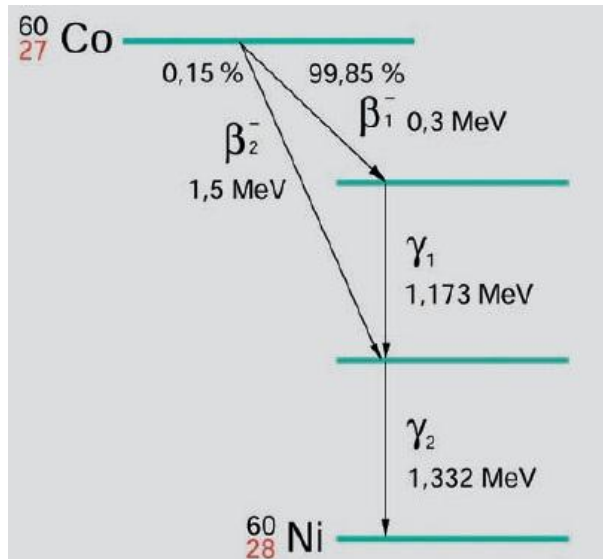


Abb. 4. Umwandlungsschema für Kobalt-60 [Volkmer, 2007]

Bei der Interaktion mit biologischer Masse findet Wasserradiolyse statt. Die Absorption der energiereichen Photonen führt zu einem Zerfall der angeregten Wassermoleküle und zur Erzeugung folgender Produkte: H^\cdot , e_{aq}^- , OH^\cdot , H_2 , H_2O_2 , H_3O^+ (Abb. 5.) [Hochanadel, 1952; Pastina, LaVerne, 2001]. Die OH^\cdot Radikale und H_2O_2 Moleküle sind die reaktionsfreudigsten Produkte, die für die meisten Oxidationen in einem biologischen System verantwortlich sind. Je höher der lineare Energietransfer (LET), desto mehr Endprodukte werden hervor gebracht [Azzam et al., 2011b].

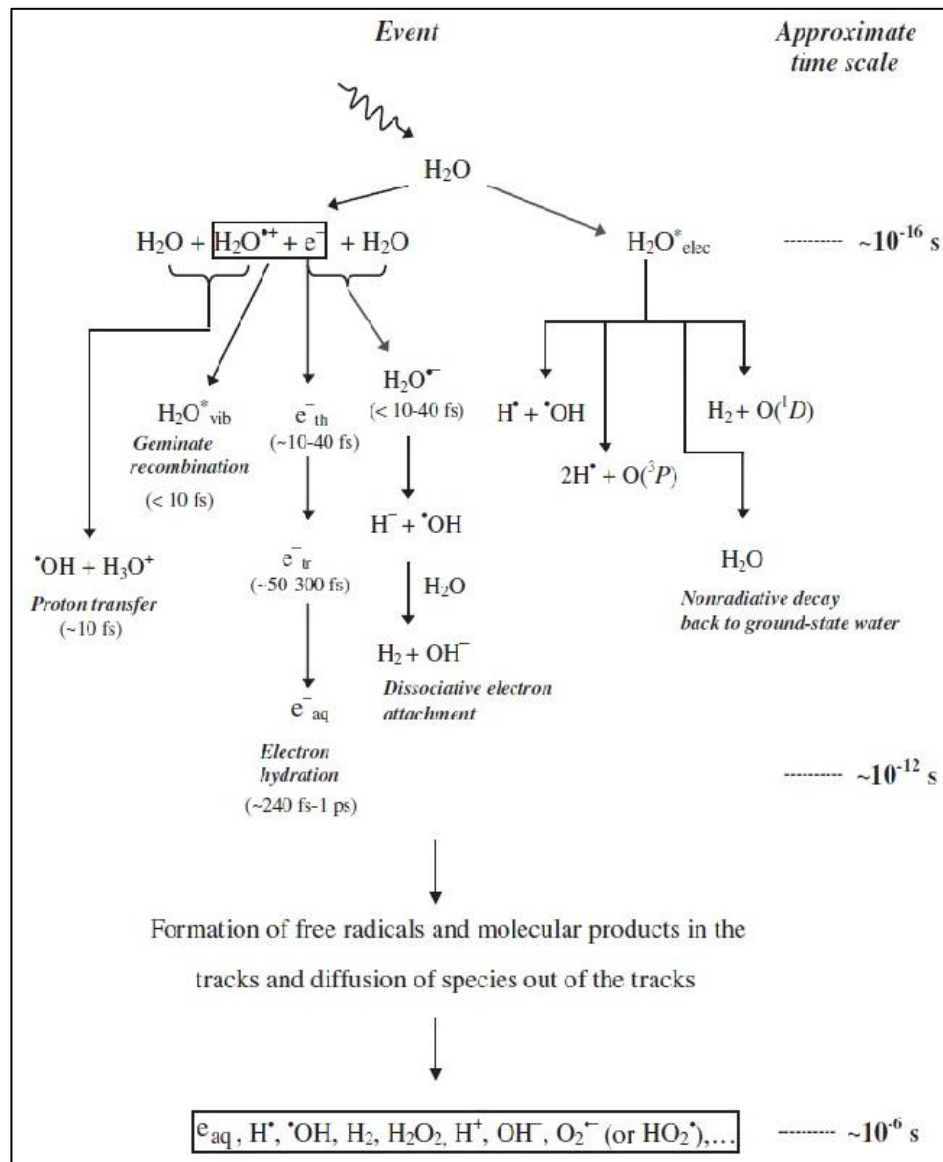


Abb. 5. Radiolyse des Wassers [Azzam et al., 2011b]

Eine wichtige Determinante des Zelltods durch Strahlung ist die Sensitivität des Gewebes gegenüber der Strahlendosis. Daher ist der Zelltod in den verschiedensten Organen auch unterschiedlich charakterisiert. [Verheij, Bartelink, 2000]. Beispielsweise führt schon geringe Strahlung (ca. 1 Gy) zu einer direkten Veränderung des Darms und dessen Motilität bei Nagetieren [Borowska et al., 1979].

3. Material und Methoden (von S. Schreidl)

Für die vorliegende Arbeit wurde der antioxidative Effekt von mäßig erhöhtem Unkonjugiertem Bilirubinspiegel auf die DNA in unterschiedlichen Zelltypen untersucht. Dieses Experiment fand im Rahmen von *in vitro* und organismischen Studien zu Gallenfarbstoffen an der Universität Wien (Institut für Ernährungswissenschaften) statt.

3.1. Studiendesign

Die Studie wurde seitens der Tierversuchskommission des Bundesministeriums für Wissenschaft und Forschung (Wien, Österreich) bewilligt. Die Aufzucht der Tiere erfolgte in der Charles Universität in Prag (Prag, Tschechien). Diese teilte man in folgende Gruppen ein:

- a. Hyperbilirubinämie, homozygote UGT1A1, jj
- b. Normobilirubinämie, heterozygot UGT1A1, Jj

Die 7-8 wöchigen (18 männliche und 22 weibliche) Gunn Ratten (Körpergewicht: 200 g \pm 10 g) kamen für eine Woche zur Akklimatisierung in die Zuchtstätte der Medizinischen Universität Wien (Forschungsinstitut Himberg, Österreich). Unter standardisierten Bedingungen (24 \pm 1 °C, Luftfeuchtigkeit 50 \pm 20 %, 12 stündigem Tag- und Nachtzyklus) hielt man die Tiere in Plastikkäfigen (Marcolon Typ IV, Techniplast GmbH, Deutschland).

<u>Zeitplan</u>	<u>Tätigkeit</u>	<u>Tieranzahl</u>
Mai 2011	Vorversuch 1	2
Juni 2011	Vorversuch 2	4
Juli 2011	Hauptversuch	<u>40</u>
		Σ 46

JJ... homozygot UGT1A1, Hyperbilirubinämie,

Jj... heterozygot UGT1A1, Normobilirubinämie

Vorversuche

Um eine bestmögliche Vorbereitung für den Hauptversuch gewährleisten zu können, fand im Mai und Juni 2011 jeweils ein Vorversuch statt. Dabei wurde die organisatorische Durchführbarkeit der Studie untersucht und die optimale Strahlendosis bestimmt.

Hauptversuch

Der Hauptversuch fand im Juli 2011 statt. Um eine eventuelle Resistenz aufgrund erhöhter Bilirubinspiegel gegen oxidative Schädigung der DNA zu untersuchen, wurde ein randomisierter Teil der Gunn Ratten mittels γ -Strahlenquelle bestrahlt. Deren Zuteilung in Gruppen ist Tab. 1. zu entnehmen. Den Tieren wurde nach Dekapitation Kolon, Leber und Blut entnommen und mittels Comet Assay auf ihre oxidativen Schäden detektiert. Unter Anwendung von den läsionsspezifischen Enzymen Endonuklease III (ENDO III) und Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) wurde eine quantitative Detektion von oxidierten Basen ermöglicht.

	Tiere gesamt	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
Gruppe 1 JJ bestrahlt	11	2	3	4	3
Gruppe 2 Jj bestrahlt	11	2	3	4	3
Gruppe 3 JJ unbestrahlt	9	2	2	2	2
Gruppe 4 Jj unbestrahlt	9	2	2	2	2
Gesamtzahl	40	8	10	12	10

Tab. 1. Aufteilung der Versuchsgruppen

3.2. Material (von S. Schreidl)

3.2.1. Geräte (inkl. Firma und Bestellnummer bzw. Typ)

<u>Geräte / Materialien</u>	<u>Typ</u>	<u>Firma</u>
Deckgläser 20mm x 20mm, 22mm x 22mm	ECN 631-1551	VWR
Elektrophorese	Seriennummer: C5 08091040, Stock	Biozym
Färbetröge	2460	Hellendahl
Fluoreszenzmikroskop	89559	Zeiss
Homogenisator	Potter-Elvehjem	B.Braun
Mikrowellenherd	MW170 (17MXS1)	ELTA
pH Meter	827	Metrohm
Power – Supply - Gerät	EV 231	PEQ Lab
⁶⁰ Co- Strahlenquelle	Gammacell 220	MDS Nordion
Zellgerät	Countess	Invitrogen
Zentrifuge	5417R	Eppendorf

Tab. 2. Geräte und Materialien

3.2.2. Chemikalien

Chemikalien	Formel	Serien Nummer	Verwendung	Firma
Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt	LMA	144556	Präparation der Zellen auf die OT	Invitrogen
Agarose mit normalem Schmelzpunkt	NMA	153001 16500?	Beschichtung der OT	Invitrogen
Bovin Serum Albumin	BSA	A2153	Enzympuffer	Sigma Life Science
Endonuklease III	ENDO III		Detektion oxidierter Pyrimidine	Institute of Basic Medical Sciences, Oslo
Ethidiumbromid	EtBr	E1510	Ethidiumbromid-lösung 20µg/ml	Sigma Life Science
Ethylendiamin-Tetraessigsäure	EDTA	E6758	Elektrophorese-lösung, Lyselösung, Enzympuffer, Homogenisations puffer	Sigma Life Science
Formamidopyrimidin-Glycosylase	FPG		Detektion oxidierter Purine	Institute of Basic Medical Sciences, Oslo
Hydrogenchlorid	HCl	E1510	Neutralisations-puffer	Sigma Life Science

4-2-Hydroxyethyl-Piperazin-1-Ethan-Sulfonsäure	HEPES	H3375	Enzympuffer	Sigma Life Science
Kaliumchlorid	KCl	31248	Enzympuffer,	Riedel-de-Haen
Kaliumhydroxid	KOH	60370	Enzympuffer	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	NaCl	71380	Lyselösung, Homogenisationspuffer	Sigma-Aldrich
Natriumhydroxid	NaOH	06203	Elektrophorese-lösung, Lyselösung, Homogenisationspuffer	Riedel – de Haen
Phosphatgepufferte Salzlösung	PBS	D8537	Präparation der Zellen auf die OT	Sigma Life Science
Triton X		X-100	Lyselösung	Sigma Aldrich
Trizma – Base	Tris	93350	Lyselösung, Neutralisationspuffer,	Fluka Analytical
Trypanblau 0,4 %		T10282	Färbung zur Ermittlung der Zellenanzahl	Invitrogen

Tab. 3. Für die Versuche benötigte Chemikalien

3.2.3. Lösungen

Alle Lösungen wurden auf eine Temperatur von 4 °C gekühlt.

Elektrophoreselösung, pH > 13 (V = 2 L):

24.00 g NaOH (3 mM) und 0.58 g EDTA (1 mM) wurden mit Aqua bidest. auf 2.00 L aufgefüllt.

Lyselösung, pH= 10 (V= 1 L):

146.10 g NaCl (2,5 M), 29.20 g EDTA (100 mM), 1.211 g Tris (10 mM) werden in Aqua bidest. gelöst und mit 10 M NaOH auf pH = 10 eingestellt. Kurz vor der Verwendung erfolgt die Zugabe von 1 mL Triton X-100 pro 100 mL Lyselösung.

Neutralisationspuffer, pH = 7.5 (V = 2 L):

96.88 g Tris Base (400 mM) werden in Aqua bidest. gelöst und mit konzentrierter HCl (37 %) auf einen pH = 7.5 eingestellt.

Enzympuffer (V = 1L):

9.53 g HEPES (40 mM), 7.46 g KCl (100 mM), 0.15 g EDTA (0.5 mM), 0.20 g BSA (0.2 mg/mL) werden in Aqua bidest. gelöst und mit 1 M KOH auf pH = 8.0 eingestellt. Die Zubereitung sollte frisch vor der Verwendung (eventuell am Vortag) erfolgen.

Agarose-Lösung, mit NMA, 1 %:

200 mg NMP Agarose werden in 20 mL Aqua bidest. in einer Mikrowelle gelöst.

Agarose-Lösung, mit LMA, 1 %:

200 mg LMP Agarose werden in 20 mL PBS in einer Mikrowelle gelöst.

Homogenisationspuffer, pH = 7.5 (V = 1L):

4.38 g NaCl, 8.93 g Na₂EDTA (bzw. 7.01 g EDTA) werden mit Aqua bidest. gelöst und mittels NaOH pH = 7.5 eingestellt.

Ethidiumbromid-Lösung:

2 µL Ethidiumbromid (Stocklösung) in 1 mL Aqua bidest. vermengen.

3.3. Methode (von S. Schreidl)

Oxidative Schäden in der DNA der Gunn Ratte wurden mittels γ Strahlung induziert und anhand Comet Assay nach Singh *et al* [Singh *et al.*, 1988] ausgewertet. Gunn Ratten sind ein geeignetes Modell, um zirkulierendes Bilirubin in der Blutbahn und in den Organen wie Leber und Kolon zu untersuchen.

3.3.1. Bestrahlung

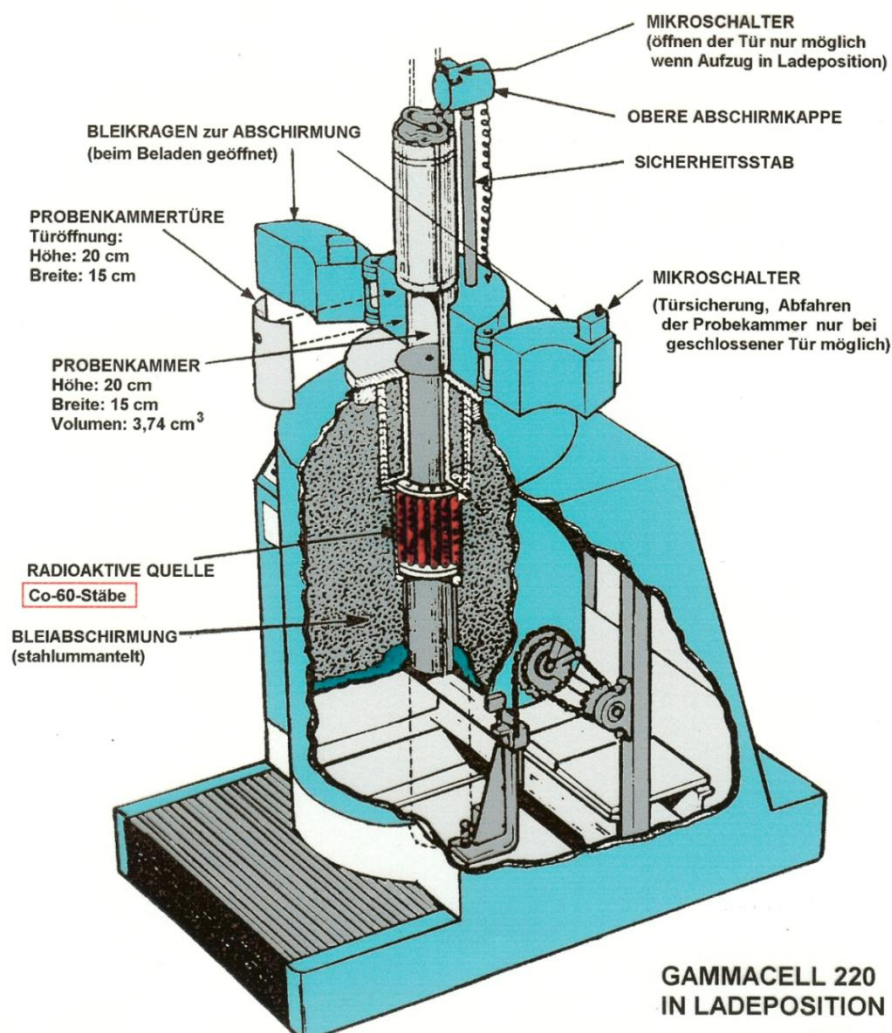


Abb. 6. ⁶⁰Co-Strahlenquelle Gammacell 220 (MDS Nordion)

Die Ganzkörperbestrahlung der Tiere erfolgte mittels ^{60}Co -Strahlenquelle (Aktivität, Juni 2011: 1.913 Ci). ^{60}Co besitzt eine Halbwertszeit von 5.27 Jahren. Beim Zerfall in $^{60}\text{Ni}_{28}$ werden neben der β^- -Strahlung zwei γ -Quanten ($\sim 3 \text{ MeV}$) abgegeben. Diese bewirken die strahlenchemischen Veränderungen in der Probe.

Die vorangegangenen Vorversuche wurden bei drei verschiedenen Strahlendosen (7.18 Gy, 10.12 Gy, 29.87 Gy) durchgeführt.

Der Hauptversuch fand bei einer eingestellten Dosis von 10 Gy statt und betrug für die Dauer von 24 Sekunden eine Höhe von 10.12 Gy.

Abb. 7. zeigt den Aufbau eines einzelnen Zylinders, welcher mit Kobaltkugelnchen befüllten Stäben besetzt ist.

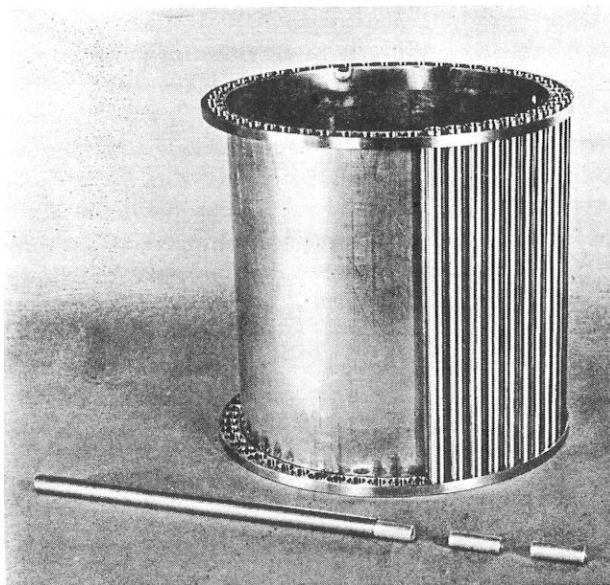


Abb. 7. Aufbau einer zylindrischen Quelle aus Einzelstäben (Photo: Atomic Energy of Canada, Ltd.)

3.3.2. Isolation der Gewebe

Nach der Gewebsentnahme von Kolon und Leber bzw. Isolation der PBMCs wurden alle weiteren Verarbeitungsschritte auf Eis durchgeführt. Um eventuelle oxidative DNA Schäden zu verhindern, wurden nur gekühlte Lösungen verwendet.

Isolation der Lymphozyten

Aus dem befüllten Heparinröhrchen (Ebewe Pharma, Österreich) werden 6-7 mL Vollblut in jeweils ein Leucosep Röhrchen überführt und diese anschließend für 15 min, 1000 rcf/g, 16 °C (ohne brake) zentrifugiert. Nach der Übertragung der Lymphozytensuspension (PBMCs) in ein neues Röhrchen erfolgt die Waschung der Zellen mit kalter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS). Hierzu werden die Röhrchen auf 15 mL aufgefüllt und nach anschließender Vermengung durch mehrmaliges Schwenken, zentrifugiert (304 rcf/g, 15 min, 4 °C, brake). Nach Absaugung des Überstandes, wird durch Zugabe von 1 mL PBS das Zellpellet gelöst. Anschließend wird auf 10 mL PBS zugegeben und vermengt. Nach der Zentrifugation (304 rcf/g, 10 min, 4 °C, brake) kommt es zum Absaugen des Überstands und zu einer Resuspendierung in 1 mL PBS.

Um eine optimale Zellkonzentration von 10^6 Zellen/mL einzustellen, erfolgt eine Überprüfung mittels Zellzahlgerät.

Isolierung der Hepatozyten



Abb. 8. Homogenisator (Potters, B. Braun)

Das schonende Lösen des Zellverbandes gewährleistet ein Homogenisator (Abb. 8.). Hierfür wird ca. 1 g Lebergewebe mit 4 mL Homogenisationspuffer (4 °C) gemischt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation (800 g, 4 °C, 10 min) der Zellen.

Isolierung der Kolonozyten

Nach Abschaben der Darmschleimhaut mittels Edelstahl-Doppelspatel (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), werden die Kolonzellen in 2.0 mL Homogenisationspuffer überführt.

Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe wurden bei jedem Comet Assay Durchgang humane PMBCs als Standards genommen.

3.3.3. Comet Assay

Die Durchführung erfolgte nach dem Verfahren von Singh *et al* [Singh et al., 1988].

Nach der Isolierung der PBMCs, der Hepatozyten und Kolonozyten erfolgte das Pipettieren nach folgendem Schema (Tab. 4.):

	Zellen [μ L]	LMA- Lösung [μ L]	Spot [μ L]
Kolonozyten	75	135	2 x 70
Hepatozyten	15	150	2 x 70
Lymphozyten	30	140	2 x 70

Tab. 4. Pipettierschema

Alle verwendeten Objektträger wurden zuvor mit NMA-Lösung beschichtet und vor dem Auftragen abgekühlt, um später die Stabilität der darauf pipettierten Gele zu erhöhen [Hartmann et al., 2003]. Die in Agarose eingebetteten Zellen werden bei einer Temperatur von 4 °C kühl für 5 min gestellt, um die Erhärtung der Gele zu gewährleisten und die Deckgläser entfernen zu können. Die Objektträger werden in Färbetröge mit Triton X hältiger Lyse Lösung für 1 h bis maximal 24 h inkubiert. Ein vorgesehener Teil der Objektträger wird nun für die weitere Enzymbehandlung mit ENDO III und FPG entnommen.

Behandlung mit Restriktionsenzymen

Nach der Inkubation erfolgt eine dreimalige Waschung mittels Enzympuffer für je 5 min. Die Enzyme FPG und ENDO III werden zu jeweils 50 µL auf ein Gel pipettiert, mit einem Deckglas bedeckt und anschließend bei 37 °C für 30 min bei hoher Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Verwendete Enzym-Konzentrationen: ENDO III 1:1500, FPG 1:1500.

Elektrophorese

Alle Objektträger werden nun in eine Elektrophorese geschichtet, es folgt die Unwindingphase für 20 min. Anschließend wird für 30 min ein elektrisches Feld eingebracht, für welches folgende Bedingungen gelten: 25 V, 300 mA, 50 W

Nach erfolgter Waschung mit Neutralisationspuffer (5 min.) und bidestilliertem Wasser (5 min.) werden die Objektträger über Nacht getrocknet und bei 4 °C gelagert.

Auswertung

Die getrockneten Gele werden mit 30 µL Ethidiumbromid-Lösung angefärbt und einem Deckglas abgedeckt [Collins, 2004]. Anschließend erfolgt die Detektion der Zellen mittels Fluoreszenzmikroskop via Bildanalyse, indem 50 repräsentative Zellen pro Gel ausgewählt und mit einem Computer gestützten Auswertungsprogramm analysiert werden.

3.4. Statistische Analyse (von K.Najafi)

Alle Daten wurden mit dem Programm „Statistical Program for Social Sciences (SPSS) Version 17.0 for Windows“ statistisch analysiert und ausgewertet.

Um Extremwerte ausschließen zu können, wurde Boxplot verwendet. Drei Werte wurden ausgeschlossen. Mittels Kolmogorov-Smirnov Test (K-S Test) wurde bei einer Stichprobe die Normalverteilung der Werte geprüft. Um zwei Gruppen miteinander zu vergleichen, wurde der T-Test bei unabhängigen Stichproben angewandt, wenn die Werte dazu normalverteilt waren (bspw. aufgeteilt nach Geschlecht). Für den Vergleich von drei oder mehr Gruppen (wie der Vergleich zwischen homozygoten und heterozygoten, bestrahlten und unbestrahlten Ratten) wurde die einfaktorielle ANOVA verwendet. Mit der bivariaten Pearson oder Spearman Korrelation wurden Korrelationen zwischen den Werten getestet. Anschließend wurde für den Zusammenhang zwischen UCB-Konzentration, Masse und Geschlecht eine Regressionsgerade gezogen.

Die Werte werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (STABW) angegeben. Eine statistische Signifikanz galt bei einem p-Wert von < 0.05 .

Die Tiere wurden zuerst in vier Gruppen eingeteilt: homozygot unbestrahlt, homozygot bestrahlt, heterozygot unbestrahlt, heterozygot bestrahlt. Die DNA Schäden wurden in diesen vier Gruppen miteinander verglichen und anhand der Werte für Lyse (Basis DNA Schaden bzw. Strangbrüche), ENDO III und FPG beschrieben.

Weiters wurden die Werte für ENDO III und FPG miteinander verglichen, um ihre (unterschiedliche) Aktivität zu demonstrieren.

Anschließend gab es eine Unterteilung der Tiere nach Geschlecht, um UCB-Konzentration, Masse und DNA Schäden miteinander vergleichen zu können.

Zur Darstellung der Korrelation zwischen UCB-Konzentration, Masse und Geschlecht wurde eine Grafik erstellt.

Abschließend wurden die Mittelwerte des Körpergewichts und der UCB-Konzentration zwischen homozygoten und heterozygoten Tieren miteinander verglichen.

In dieser Arbeit sollen die DNA Schäden der vier Gruppen verglichen und diskutiert werden, wobei sich die Ergebnisse auf die Untersuchung an Kolonozyten und Lymphozyten beziehen. Dies gilt auch für die Aufteilung der Tiere nach Geschlecht.

Die Arbeit von Khatareh Najafi bezieht sich auf die DNA Schäden in Hepatozyten und Lymphozyten.

4. Ergebnisse und Diskussion (von S. Schreidl)

In dieser Arbeit soll einerseits die Auswirkung eines erhöhten Blutbilirubinspiegels im lebenden Organismus (Gunn Ratten) auf Strangbrüche und oxidierte Basen der DNA in Kolonozyten und Lymphozyten untersucht werden. Andererseits die Resistenz der Gunn Ratten gegenüber oxidativ induzierter Schädigung durch γ -Bestrahlung gezeigt werden. Um eventuelle Unterschiede festzustellen, wurde eine heterozygote Kontrollgruppe verwendet, die physiologische Blutbilirubinspiegel besitzt.

Die Arbeit von Khatereh Najafi bezieht sich auf die Schädigung der DNA in Hepatozyten und Lymphozyten.

Die Einzelzellgel-Elektrophorese wurde bewusst gewählt, da sich diese in vorangegangenen Studien zum Nachweis von DNA Schädigung bereits als zuverlässig bewährt hat [Collins 2009a; Dhawan et al., 2009].

4.1. Kolonozyten (von S. Schreidl)

Da in aktuellen Studien ein verminderter Bilirubinspiegel mit einer erhöhten Kolonkrebsinzidenz assoziiert wird [Keshavan et al., 2004a; Zucker et al., 2004a; Jiraskova et al., 2012], stehen diese Zellen im besonderen Interesse unserer Studie.

4.1.1. DNA Schädigung, UCB-Konzentrationen und Gewicht

Parameter ^a		Heterozygote		Homozygote		p-Wert
		Gunn Ratten (n=20)		Gunn Ratten (n=20)		
		unbestrahlt (n=10)	bestrahlt (n=10)	unbestrahlt (n=10)	bestrahlt (n=10)	
Gewicht (g)		206 (32)	209 (35)	186 (44)	200 (65)	0.699
UCB (µmol/L)		0.58 (0.20)	0.55 (0.19)	104 (28)	108 (26)	<0.001
Kolonozyten	SB	16.9 (6.60)	36.6 (5.22)	14.7 (5.95)	36.8 (9.57)	<0.001
	FPG	18.4 (8.16)	20.3 (6.14)	19.9 (6.68)	20.7 (4.73)	0.863
	ENDO III	10.2 (4.83)	9.4 (6.46)	7.5 (6.39)	11.5 (5.72)	0.508

^aEinheit DNA Schaden: % DNA in Tail

Tab. 5. Mittelwerte (Standardabweichung) in den Kolonozyten, Aufteilung nach unbestrahlte bzw. bestrahlte heterozygote und unbestrahlte bzw. bestrahlte homozygoten Gunn Ratten. Die statistische Auswertung der SB erfolgte nach Tamhane's T2 und Games Howel; ENDO III und FPG nach Bonferroni und Scheffé.

Aus Tab. 5. ist ersichtlich, dass in der Gruppe der homozygoten Gunn Ratten eine signifikant höhere UCB-Konzentration, als in der Vergleichsgruppe der heterozygoten Gunn Ratten, besteht.

Betrachtet man nun die Basis DNA Schäden beider Gruppen, so lässt sich jedoch kein signifikanter Unterschied erkennen. Auch nach der erfolgten Bestrahlung, hat die erhöhte UCB-Konzentration, keine Verringerung der DNA Strangbrüche gezeigt.

Zu dem gleichen Ergebnis gelangt man auch bei der Betrachtung der DNA Schäden nach der Behandlung der Restriktionsenzyme FPG und ENDO III.

Zwischen den vier untersuchten Gruppen ist keine signifikante Veränderung der DNA Schäden der Kolonozyten betreffend der Strangbrüche, sowie alkalisch-sensitive Brüche erkennbar.

Betrachtet man nun die Basis DNA Schädigung zu den Zeitpunkten vor und nach der Bestrahlung, so zeigt sich eine signifikante Veränderung in der homozygoten, als auch in der heterozygoten Gruppe (Abb. 9.). Eine Induzierung von DNA Schäden mittels γ -Strahlung und die Detektion dieser mittels Comet Assay ist somit nachweisbar. Bei den Kolonozyten, die mittels FPG und ENDO III behandelt wurden, ist dies jedoch nicht signifikant erkennbar.

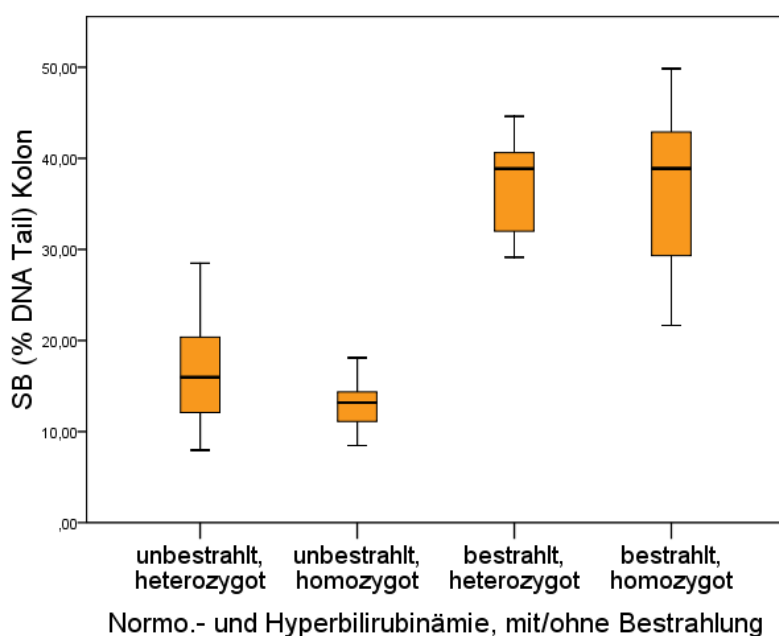


Abb. 9. Darstellung der Basis DNA Schädigung (SB) der Kolonozyten, in den bestrahlten und unbestrahlten heterozygoten bzw. bestrahlten und unbestrahlten homozygoten Gruppen. unbestrahlt < bestrahlt ($p < 0.05$)

Setzt man nun die mittleren Werte der alkalisch-sensitiven Strangbrüche, die mittels ENDO III und FPG erzielt wurden, in direkten Vergleich, ist eine kontinuierlich höhere Anzahl der oxidierten Purinbasen erkennbar (Abb. 10.). Zu diesem Resultat kommen auch aktuelle Studien der letzten Jahre [Ferreira et al., 2007; Kager et al., 2010; Azzam et al., 2011].

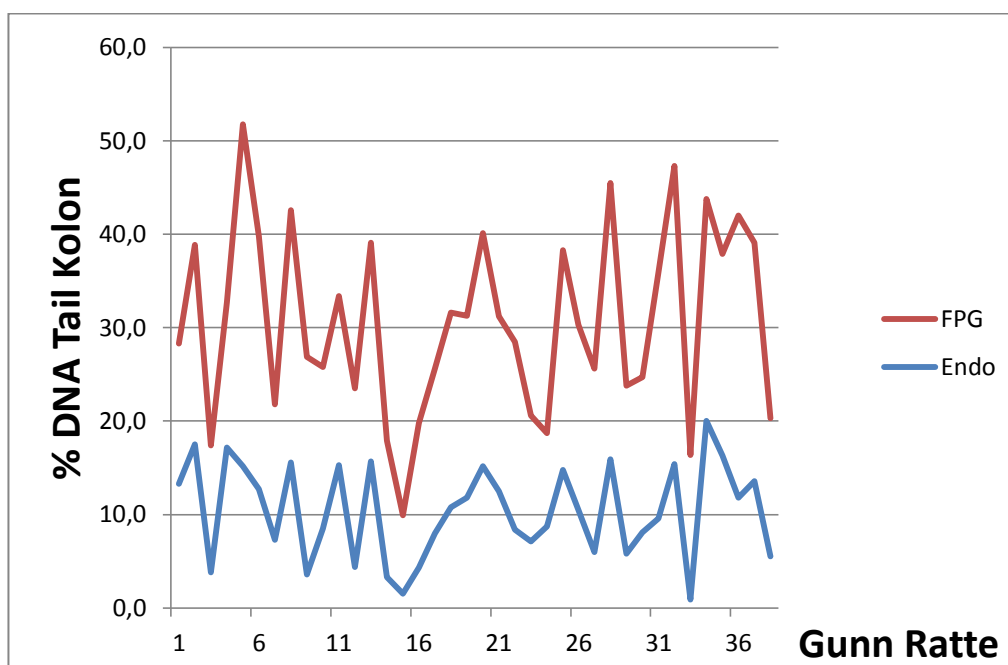


Abb. 10. Vergleich der Mittelwerte der DNA Schädigung in den Kolonozyten nach der Behandlung der Restriktionsenzyme ENDO III und FPG

Es könnte daher ein Hinweis bestehen, dass bei DNA Schädigung, die durch freie Radikale verursacht wird, die Oxidation der Pyrimidinbasen weniger betroffen ist, als die der Purinbasen.

Weiters spricht dieses kontinuierliche Ergebnis bei allen Tieren für die höhere Aktivität des Enzyms FPG, als auch für die reliable Durchführung dieser Methode.

4.1.2. Unterschiede zwischen den Geschlechtern

Parameter ^a		Männliche		Weibliche	
		Gunn Ratten		Gunn Ratten	
		(n=18)		(n=22)	
Kolonozyten	SB	unbestrahlt (n=8)	bestrahlt (n=10)	unbestrahlt (n=10)	bestrahlt (n=12)
	FPG	17.2 (6.23)**	35.7 (8.44)**	13.6 (4.57)**	37.5 (6.93)**
	ENDO	18.2 (8.16)	18.5 (5.83)	19.9 (6.84)	22.2 (4.47)
	III	8.7 (4.66)	8.5 (7.00)	8.9 (6.63)	12.0 (4.87)

^aEinheit DNA Schaden: % DNA in Tail

Tab. 6. Mittelwerte (Standardabweichung) in den Kolonozyten, Aufteilung nach unbestrahlte bzw. bestrahlte männliche und weibliche Gunn Ratten. Die statistische Auswertung erfolgte T- Test für unabhängige Stichproben. **unbestrahlt < bestrahlt (p<0.01)

Die männlichen Gunn Ratten (n = 18) besitzen ein durchschnittliches Körpergewicht von 240 g ± 35.1 g und zeigen hinsichtlich ihrer Bestrahlung einen signifikanten Unterschied (p < 0.001) ihrer Basis DNA Schädigung. Unbestrahlte männliche Tiere weisen eine durchschnittliche Schädigung der Strangbrüche von 17.2 ± 6.23 (% DNA Tail), die bestrahlten Tiere eine Schädigung von 35.7 ± 8.44 (% DNA Tail) auf.

Auch zwischen den 22 weiblichen Gunn Ratten (durchschnittliches Körpergewicht 169 g ± 21.4 g) kommt es zwischen den 12 bestrahlten Tieren mit einer Schädigung ihrer Strangbrüche von 37.5 ± 6.93 (% DNA Tail) und den 10 unbestrahlten Tieren (Schädigung der Strangbrüche 13.6 ± 4.57 % DNA Tail) zu einem signifikanten Unterschied (p < 0.001).

4.2. Lymphozyten

4.2.1. DNA Schädigung, UCB Konzentrationen und Gewicht

(von S. Schreidl und K. Najafi)

Parameter ^a		Heterozygote Gunn Ratten (n=20)		Homozygote Gunn Ratten (n=20)		p-Wert
		unbestrahlt	bestrahlt	unbestrahlt	bestrahlt	
		(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	
Gewicht (g)		206 (32)	209 (35)	186 (44)	200 (65)	0.699
UCB (µmol/L)		0.58 (0.20)	0.55 (0.19)	104 (28)	108 (26)	<0.001
PBMC	SB	6.9 (1.16)	20.5 (6.95)	9.2 (2.22)	19.8 (6.88)	<0.001
	FPG	15.7 (3.08)	27.5 (8.73)	20.3 (6.39)	28.3 (8.19)	0.001
	ENDOIII	6.1 (2.94)	12.5 (5.25)	4.6 (3.42)	14.7 (6.69)	< 0.001

^aEinheit DNA Schaden: % DNA in Tail

Tab. 7. Mittelwerte (Standardabweichung) in den Lymphozyten, Aufteilung nach unbestrahlte bzw. bestrahlte heterozygote und unbestrahlte bzw. bestrahlte homozygoten Gruppen. Statistische Auswertung der SB, ENDO und FPG erfolgte nach Games Howel

Ein Überblick über die erzielten DNA Schädigungen in den Lymphozyten, zeigt keinen signifikanten Einfluss der UCB-Konzentrationen, in den homozygoten und den heterozygoten Versuchsgruppen (Tab. 7.).

Es besteht ein signifikanter Einfluss der Bestrahlung auf die Strangbrüche und den alkalisch-sensitiven Brüchen der DNA (Abb. 11., Abb. 12., Abb. 13.). Die Signifikanz ($p < 0.05$) zeigt sich einerseits zwischen den bestrahlten und

unbestrahlten Tieren in der homozygoten Gruppe, als auch in der Kontrollgruppe (heterozygote Gunn Ratten).

Auch zwischen der unbestrahlte heterozygoten und bestrahlt homozygoten Tiere, betreffend ihrer SBs und ihrer oxidierten Pyrimidinbasen, ist die Bestrahlung statistisch nachweisbar.

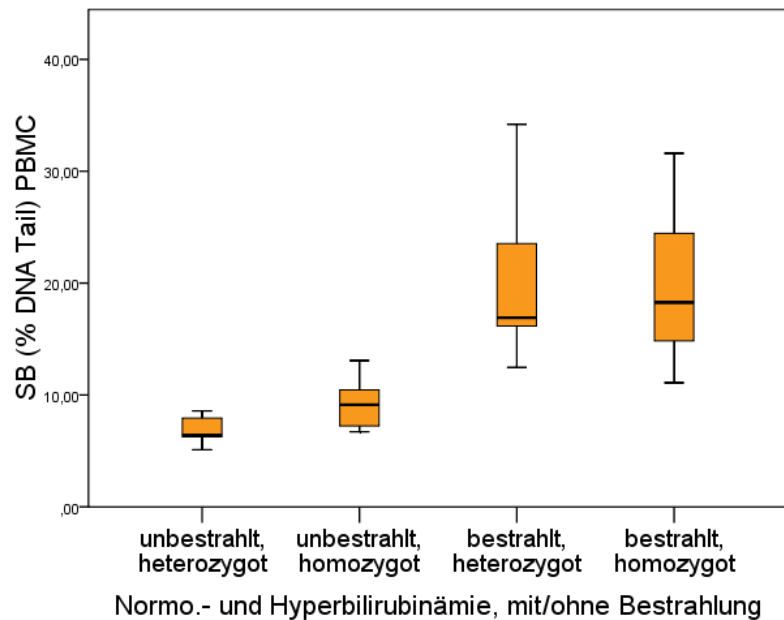


Abb. 11. Darstellung der Basis DNA Schädigung (SB) der Lymphozyten, in den bestrahlten und unbestrahlten heterozygoten bzw. bestrahlten und unbestrahlten homozygoten Gruppen. Unbestrahlte < bestrahlt ($p < 0.05$)

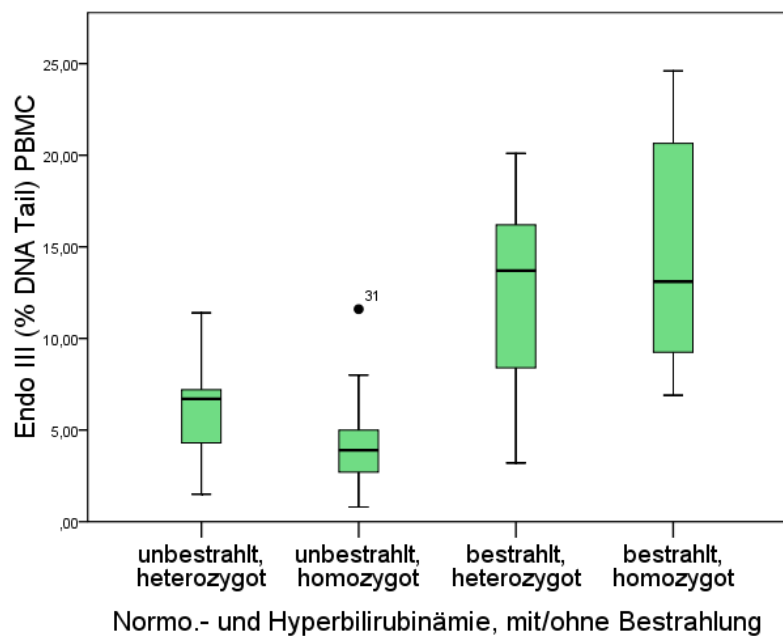


Abb. 12. Darstellung der DNA Schädigung der Lymphozyten, nach Behandlung des Restriktionsenzym END O III, in den bestrahlten und unbestrahlten heterozygoten bzw. bestrahlten und unbestrahlten homozygoten Gruppen. Unbestrahlt < bestrahlt ($p < 0.05$)

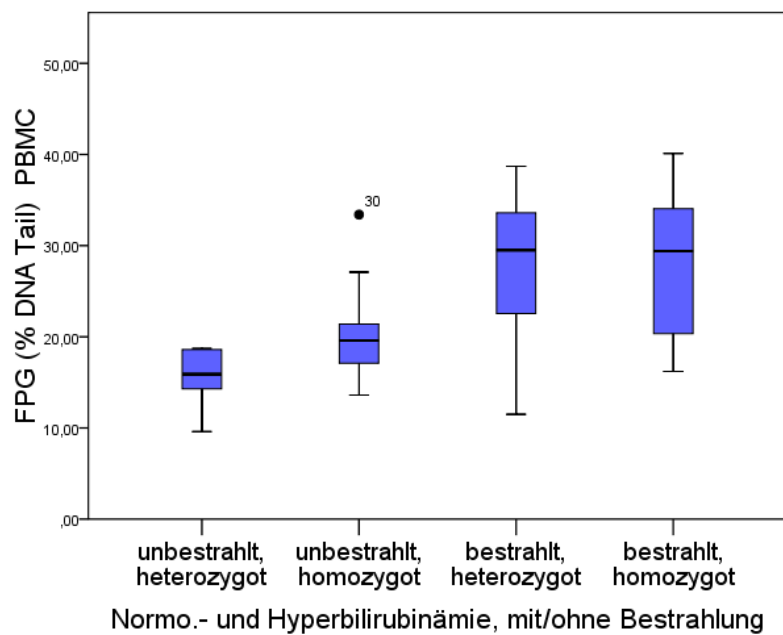


Abb. 13. Darstellung der DNA Schädigung der Lymphozyten, nach Behandlung des Restriktionsenzym FPG, in den bestrahlten und unbestrahlten heterozygoten bzw. bestrahlten und unbestrahlten homozygoten Gruppen. Unbestrahlt < bestrahlt ($p < 0.05$)

Abbildung 14 verdeutlicht, dass auch in den Lymphozyten der Schaden der oxidierten Purinbasen höher ist als jene der Pyrimidinbasen.

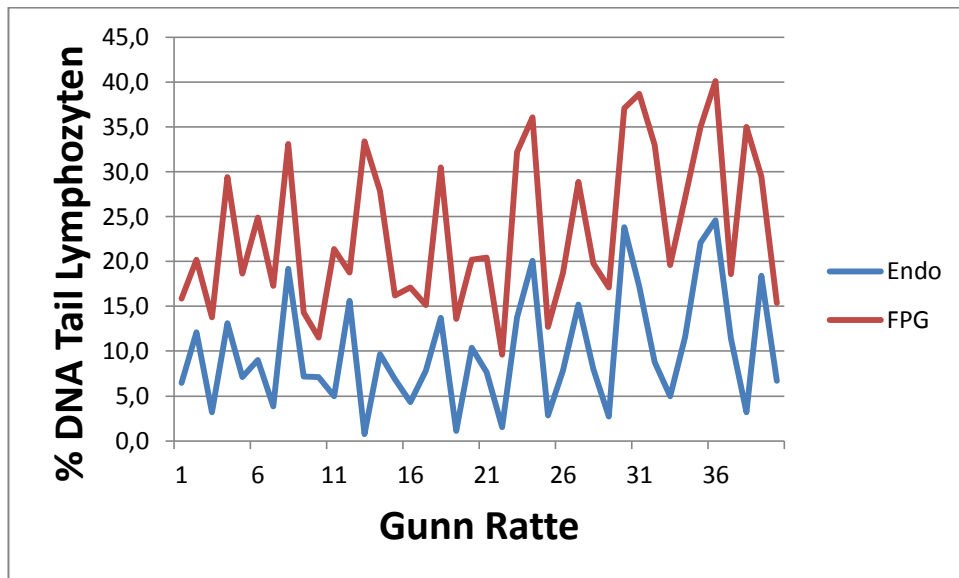


Abb. 14. Vergleich der Mittelwerte der DNA Schädigung in den Lymphozyten nach der Behandlung der Restriktionsenzyme ENDO III bzw. FPG

Die gleichmäßige höhere Schädigung, die mittels FPG erzielt wurde, in allen Tieren, ohne Rücksicht auf deren Gruppenzugehörigkeit, verdeutlicht sowohl die Genauigkeit der Methode, als auch dessen Durchführung. Dies kann einerseits an der höheren Aktivität des Enzyms FPG liegen, als auch an einer tatsächlich höheren Schädigung der Purinbasen durch Oxidation (siehe auch Kapitel 4.1.1.)

4.2.2. Unterschiede zwischen den Geschlechtern (von S. Schreidl)

Parameter ^a		Männliche		Weibliche	
		Gunn Ratten		Gunn Ratten	
		(n=18)		(n=22)	
PBMC	SB	unbestrahlt (n=8)	bestrahlt (n=10)	unbestrahlt (n=10)	bestrahlt (n=12)
	FPG	7.9 (2.56)**	19.4 (6.36)**	8.3 (1.79)**	20.8 (7.29)**
	ENDO	18.9 (6.35)**	28.2 (7.79)**	17.3 (4.80)**	27.7 (8.99)**
	III	4.6 (2.71)**	12.5 (5.23)**	6.00 (3.55)**	14.5 (6.62)**

^aEinheit DNA Schaden: % DNA in Tail;

Tab. 8. Mittelwerte (Standardabweichung) in den Lymphozyten, Aufteilung nach unbestrahlte bzw. bestrahlte männliche und weibliche Gunn Ratten. Die statistische Auswertung erfolgte T- Test für unabhängige Stichproben. **unbestrahlt < bestrahlt (p<0.01)

Eine Unterteilung nach den Geschlechtergruppen hinsichtlich der Schädigungen in den Lymphozyten zeigt, dass in allen Gruppen (SB, ENDO III, FPG) ein signifikanter Unterschied zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Gruppen besteht. Betreffend der Strangbrüche zeigt sich eine Signifikanz von $p < 0.001$ bei beiden Geschlechtern. Nach der Behandlung mit dem Restriktionsenzym ENDO III ist in beiden Gruppen eine Zunahme der Strangbrüche messbar (männliche Gunn Ratten ($p = 0.001$); weibliche Gunn Ratten ($p = 0.002$)). Die Behandlung mit dem Enzym FPG zeigte die gleiche Entwicklung ($p = 0.013$ bei männlichen Tieren; $p = 0.004$ bei weiblichen Tieren).

Daher zeigt sowohl eine Einteilung der Lymphozytenschädigung nach dem 4-Gruppen System, als auch eine Gruppierung nach Geschlecht einen

signifikanten Unterschied zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Gruppen. Dieses Ergebnis spiegelt daher die erfolgreich durchgeführte Bestrahlung der Tiere mit den prognostizierten Strangbrüchen wider.

4.3 Korrelation zwischen UCB-Konzentration, Körpergewicht und Geschlecht (von S. Schreidl und K.Najafi)

Einige aktuelle Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen der UCB-Konzentration und dem Geschlecht als auch der Krebsinzidenz. Bei Männern wurde eine niedrigere Nicht-Lungenkrebsinzidenz bei höherem Bilirubinspiegel festgestellt. Die UCB-Konzentration war hierbei in der weiblichen Untersuchungsgruppe eine geringere [Temme et al., 2001; Zucker et al., 2004b]. Daher steht auch der Gender-Aspekt im Interesse unserer Auswertung.

		Geschlecht	UCB $\mu\text{mol/l}$	mass (g)
Geschlecht	Korrelation nach Pearson	1	,065	-,787**
	Signifikanz (2-seitig)		,692	,000
	N	40	40	40

Tab. 9. Korrelation zwischen Geschlecht und den mittleren UCB – Konzentrationen bzw. dem durchschnittlichen Körpergewicht der Tiere . Korrelationstest nach Pearson, ** Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant.

		Geschlecht	UCB $\mu\text{mol/l}$	mass (g)
UCB $\mu\text{mol/l}$	Korrelationskoeffizient	,044	1,000	-,337*
	Sig. (2-seitig)	,790		,033
	N	40	40	40

Tab. 10. Korrelation zwischen den mittleren UCB – Konzentrationen und dem durchschnittlichen Körpergewicht der Tiere. Korrelationstest nach Spearman, ** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

Die Versuchsgruppe der männlichen Tiere weist ein durchschnittliches Gewicht von 239.5 g und einer durchschnittlichen UCB-Konzentration von 49.2 $\mu\text{mol/L}$ auf. Die weiblichen Tiere hingegen sind durch ein geringeres durchschnittliches Körpergewicht von 168.1 g charakterisiert und einer höheren UCB-

Konzentration von 56.5 g. Aus Tab. 9. ist ersichtlich, dass in den geschlechterspezifischen Gruppen zwar keine erhöhte Korrelation oder ein signifikanter Zusammenhang mit der UCB-Konzentration besteht, sehr wohl jedoch eine schwache Korrelation mit ihrem Körpergewicht (Tab. 10.). Dies wird auch in Abb. 15. verdeutlicht.

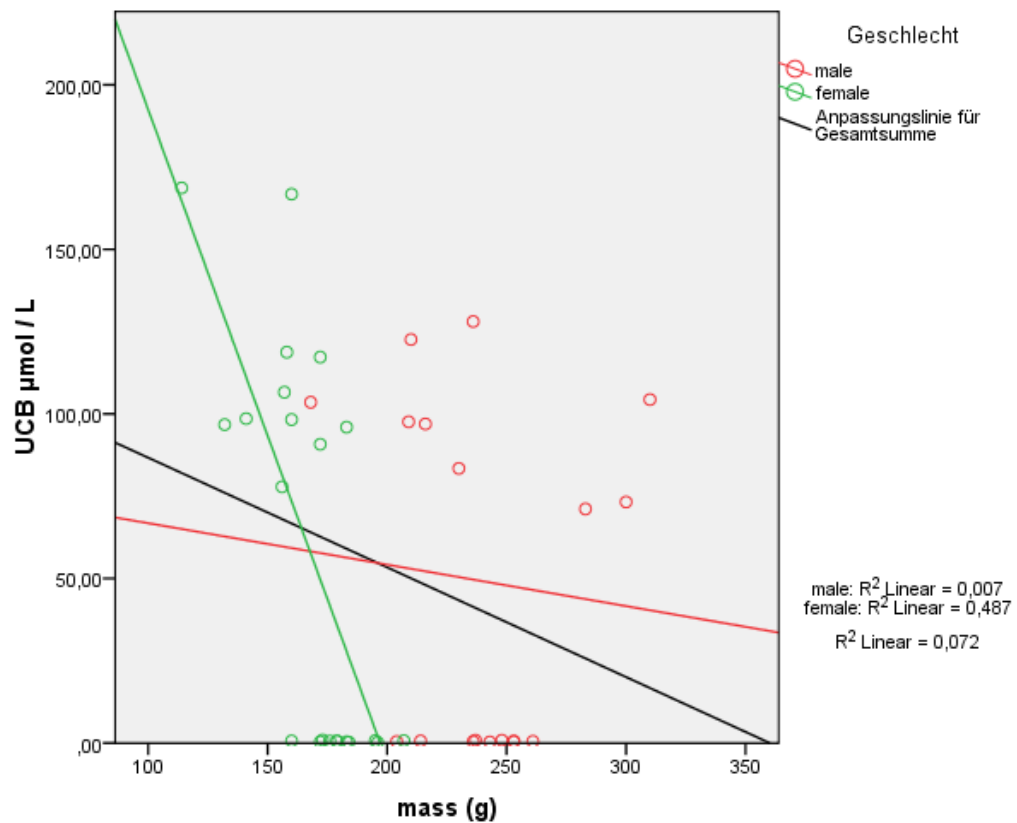


Abb. 15. UCB-Konzentration in Relation zum Körpergewicht

4.4. Mittelwertsvergleiche von Körpergewicht und UCB – Konzentration der homozygoten und heterozygoten Tiere (von S. Schreidl)

Gewicht (g)	N	Mittelwert	Standardabweichung
homozygot	20	193.35	55.19
heterozygot	20	207.65	32.78

Tab. 11. Mittelwertsvergleich des Körpergewichts zwischen homozygoten und heterozygoten Tiere

UCB-Konzentration (µmol / L)	N	Mittelwert	Standardabweichung
homozygot	20	105.87	26.12
heterozygot	20	0.57	0.19

Tab. 12. Vergleich der mittleren UCB -Konzentrationen und dem durchschnittlichen Körpergewicht der Tiere

Das Körpergewicht der Gunn Ratten unterscheidet sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant ($p = 0.325$) voneinander. Während die homozygoten Tiere ein durchschnittliches Körpergewicht von 193.4 g aufweisen, beträgt das Gewicht der heterozygoten Tiere 207.7 g (Tab. 11.).

Ein erwarteter signifikanter Unterschied der UCB-Konzentrationen zwischen den homozygoten und heterozygoten Gunn Ratten kann bestätigt werden ($p < 0.001$). Der große Unterschied zwischen den durchschnittlichen Konzentrationen (105.9 µmol/L und 0.6 µmol/L) ist in Tab. 12. ersichtlich. Diese relativ breite Streuung der Werte in beiden Gruppen, könnte einen möglichen signifikanten Nachweis für die protektive Wirkung von Bilirubin, verhindern.

5. Conclusio (von S. Schreidl)

Die Studie, welche das Antioxidative und DNA-schützende von Bilirubin in den verschiedensten Organen von Gunn Ratten untersucht und mittels Comet Assay ausgewertet, ist nur begrenzt mit anderen Untersuchungen vergleichbar, da es zu dieser spezifischen Fragestellung keine anderen publizierten Studien gibt.

Die Behandlung mit Gammastrahlung ist bei den Basis DNA Schäden der Kolonozyten (Unterteilung nach dem 4-Gruppen-System) signifikant nachweisbar. Widererwarten, unterschieden sich die homozygoten Gunn Ratten nicht signifikant von der heterozygoten Gruppe. Hierbei hatte auch die Bestrahlung keinen Einfluss.

Auch nach erfolgter Aufteilung der Tiere nach ihrem Geschlecht, zeigt sich nur in der Gruppe der Basis DNA Schädigung ein signifikanter Unterschied zwischen der bestrahlten und unbestrahlten Gruppe. In den enzymbehandelten Kolonozyten, ist dies nicht zu erkennen.

Einen eventuellen Einfluss auf dieses Ergebnis, könnte die unterschiedliche Aktivität der beiden Enzyme auf die sich sehr schnell teilenden Zellen haben. Die Epithelzellen des Kolons befinden sich in sehr unterschiedlichen Stadien und eine zusätzliche Behandlung mit Restriktionsenzymen macht die DNA Schädigung dieser Zellen nur bedingt miteinander vergleichbar.

Ein Schutzeffekt des Bilirubins auf die Kolonozyten, konnte bei der vorliegenden Studie nicht nachgewiesen werden. In Folge dessen besteht auch kein protektiver Effekt gegenüber Kolonrektalkrebs. Zu diesem Endergebnis kam auch eine Studie aus dem Jahr 2006. Auch hier konnten protektive Effekte des BR nicht bestätigt werden [Ioannou et al., 2006].

Die Bestrahlung zeigt in den Lymphozyten eine signifikante Schädigung der DNA durch Strangbrüche und alkalisch-sensitiven Brüche. Allerdings war es nicht möglich in den Lymphozyten der homozygoten Gunn Ratten eine präventive Wirkung durch die erhöhten Blutbilirubinspiegel festzustellen.

Die höhere DNA Schädigung, die mittels Restriktionsenzym FPG, in den Kolonozyten sowie den Lymphozyten der Tiere, im Gegensatz zu ENDO III, erzielt wurde, unterstützt die Vermutung, dass freie Radikale hauptsächlich eine Oxidation der Purinbasen und weniger der Pyrimidinbasen hervorrufen. Diese Hypothese ist jedoch noch durch weitere Studien zu belegen.

Da die Bilirubinkonzentration in den homozygoten, sowie in der heterozygoten Gruppe, stark variieren, sind die gemessenen DNA Schädigungen innerhalb einer Gruppe eventuell nur begrenzt miteinander vergleichbar. Eine stark erhöhte UCB-Konzentration wird auch häufig mit neurotoxischen Symptomen in Verbindung gebracht. Dadurch ist es möglich, dass sich der stark erhöhte BR Wert in manchen Ratten eher schädigend auf den Organismus auswirkte und somit das Gesamtergebn nicht unserer Hypothese entsprach. Eine mögliche protektive Wirkung des BR in manchen Tieren ist somit nicht nachweisbar.

Collins *et al.* weisen auch daraufhin, dass es bei DNA Reparaturen ein breites Spektrum an Möglichkeiten gibt, da verschiedene Einflussfaktoren mitspielen. Während bei einigen Humanstudien eine positive Wirkung eines antioxidativen Effekts erzielt wurde (bspw. durch Obst- und Gemüsegabe), konnte dies bei weiteren Studien wiederum nicht bestätigt werden.

Bei *in vitro* Reparatur Assays, zeigt sich sogar, dass Lymphozyten eine längere Zeit brauchen, um sich zu regenerieren [Collins et al., 2012]. Daher kann es auch möglich sein, dass durch die direkte Aufbereitung nach der Tötung der Tiere, eine vollständige Ausschöpfung des möglichen antioxidativen Potentials von Bilirubin verhindert wurde, da der Zeitraum zwischen Bestrahlung und Dekapitation nur wenige Minuten betrug.

Eine weiterführende Forschung in diesem Gebiet wäre daher empfehlenswert.

In den Vorversuchen wurde die optimale Bestrahlungsstärke zur Schädigung der Lymphozyten getestet und eingestellt, nicht jedoch die der Kolonozyten. Da keine optimale Einstellung der Bestrahlung hinsichtlich des Kolons der Gunn Ratten erfolgen konnte, könnte dies ein Grund für die relativ starken Schwankungen der unterschiedlichen Schädigungen der Zellen sein. Eine

Untersuchung an Labornagern zeigte beispielsweise, dass Kolonozyten weniger empfindlich auf Strahlung reagieren und eine starke Zunahme der Tail-Intensitäten erst bei höherer (letaler) Strahlendosis (30 Gy) zu finden ist [Kager et al., 2010].

Es ist außerdem möglich, dass eine erhöhte UCB-Konzentration nur über einen sehr langen Zeitraum (über Jahre) einen antioxidativen Effekt gegenüber bestimmten Krankheiten zeigt, die durch oxidativen Stress verursacht werden. Nicht jedoch bei einer einmaligen, starken Induzierung freier Radikale, wie es in der vorliegenden Studie der Fall war.

6. Zusammenfassung (von S. Schreidl)

Im Rahmen der Forschungsgruppe, Emerging Fields Oxidative Stress and DNA Stability, wurde an der Universität Wien, Department für Ernährungswissenschaften, das antioxidative Potential von Bilirubin in verschiedenen Gewebszellen untersucht. Während BR lange Zeit als Abfallprodukt des Hämstoffwechsels galt, zeigten Studien der letzten Jahre einen protektiven Effekt gegenüber freien Radikalen. Dies wiederum könnte vor Kardiovaskulären Erkrankungen bis hin zu Krebserkrankungen schützen. In den vergangenen Jahren fanden zu diesem Thema einige Humanstudien statt, in denen das Blut von Probanden mit dem autosomal vererbten Gilbert Syndrom untersucht wurden. Jedoch waren hierbei Untersuchungen von Zellverbänden verschiedenster Organe nicht möglich.

Daher fand im Juni 2011 ein Tierversuch zu dieser speziellen Thematik statt, bei dem zusätzlich Leber und Kolon untersucht werden konnten. Das geeignete Tiermodell hierfür repräsentiert die Gunn Ratte, die erstmals 1984 von C.H. Gunn gezüchtet wurde. Man unterscheidet hierbei zwischen heterozygoten und homozygoten Tieren. Wobei sich letztere durch die eingeschränkte Aktivität des Enzyms UGT1A1 und somit durch eine signifikant höhere UCB-Konzentration auszeichnet.

Im Hauptversuch wurden 20 homozygoten Gunn Ratten gegen eine Kontrollgruppe mit 20 heterozygoten Gunn Ratten getestet. Die Hälfte der Ratten wurde in einer Kobalt Strahlenquelle mit einer Stärke von 10.12 Gy bestrahlt und anschließend wurden alle Ratten dekapitiert.

Das Blut, die Leber und der Kolon wurden daraufhin entnommen und mittels Comet Assays (SCGE) untersucht. Die Zellen, welche nur mit Lyse behandelt wurden, stellen die Basis DNA Schäden dar, die Restriktionsenzyme FPG und ENDO III hingegen ermöglichen die Detektion von oxidierten Purin- und Pyrimidinbasen.

Die bestrahlten Tiere zeigen in den Kolonozyten, sowie in den Lymphozyten eine signifikant höhere Schädigung der DNA. Jedoch war keine geringere Schädigung in der Gruppe der homozygoten Gunn Ratten gegenüber ihrer Kontrollgruppe nachzuweisen.

Alle untersuchten Zellen zeigen eine deutlich größere DNA Schädigung ihrer Purinbasen.

Positiv zu verzeichnen sind die Reproduzierbarkeit der Bestrahlungsmethode und die genaue Durchführung des Comet Assays, da DNA Strangbrüche und alkalisch-sensitive Brüche sowohl induziert als auch detektiert werden konnten.

7. Summary (von S. Schreidl)

As part of the research group, Emerging Fields Oxidative Stress and DNA Stability, at the University of Vienna, Department of Nutritional Sciences, the antioxidant properties of Bilirubin in assorted tissue cells were examined. BR was considered a waste product of the haemoglobin metabolism for a long time, however contemporary studies have shown that it has a protective effect against free radicals. This contributes to its cardiovascular disease and cancer protective effect. In recent years human studies have been conducted where blood from subjects with the hereditary autosomal Gilbert Syndrome was examined. However, cells from different organs were not tested so far in this respect.

Therefore an animal study was conducted in June 2011, allowing the liver and colon cells to also be tested. The study used Gunn rats, which were first bred by C.H. Gunn in 1984. One can distinguish between heterozygous and homozygous animals, the latter of which are characterized by a decreased enzyme UGT1A1 activity accompanied by a higher UCB concentration.

In the main experiment 20 homozygous Gunn rats and a control group containing 20 heterozygous Gunn rats were investigated. Half of the rats were exposed to 10.12 Gy of Cobalt radiation and finally all rats were decapitated.

Cells extracted from blood, liver and colon were investigated using Comet Assay. The cells which underwent lysis show DNA strand breaks, those exposed to the restriction enzymes FPG and ENDO III enable detection of oxidised purines and pyrimidines.

Irradiated animals had significantly higher DNA damage in the colonocytes and lymphocytes. However there was no decrease in DNA damage of homozygous rats compared to the control group. In all cells significantly higher DNA damage of purine bases was observed

Very positive was the reliability of the irradiation procedure and the Comet Assay, since DNA strand breaks and alkali-sensitive sites could be induced and also detected.

8. Literatur

R. J. Albertini, D. Anderson, G. R. Douglas, L. Hagmar, K. Hemminki, F. Merlo, A. T. Natarajan, H. Norppa, D. E. Shuker, R. Tice, M. D. Waters and A. Aitio. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. Mutation research, 463; 2000: 111-72

K. J. Angelis, M. McGuffie, M. Menke and I. Schubert. Adaptation to alkylation damage in DNA measured by the comet assay. Environmental and molecular mutagenesis, 36; 2000: 146-50

O. Aruoma. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. Journal of the American Oil Chemists' Society, 75; 1998: 199-212

E. I. Azzam, J.-P. Jay-Gerin and D. Pain. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Letters, 2011a:

E. I. Azzam, J. P. Jay-Gerin and D. Pain. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer letters, 2011b:

J. P. Banath, A. Kim and P. L. Olive. Overnight lysis improves the efficiency of detection of DNA damage in the alkaline comet assay. Radiation research, 155; 2001: 564-71

D. E. Barañano, M. Rao, C. D. Ferris and S. H. Snyder. Biliverdin reductase: A major physiologic cytoprotectant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99; 2002: 16093-98

S. Boiteux. Properties and biological functions of the NTH and FPG proteins of Escherichia coli: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology, 19; 1993: 87-96

A. Borowska, S. Sierakowski, J. Mackowiak and K. Wisniewski. A prostaglandin-like activity in small intestine and postirradiation gastrointestinal syndrome. Experientia, 35; 1979: 1368-70

P. J. Bosma, J. R. Chowdhury, C. Bakker, S. Gantla, A. de Boer, B. A. Oostra, D. Lindhout, G. N. J. Tytgat, P. L. M. Jansen, R. P. J. O. Elferink and N. R. Chowdhury. The Genetic Basis of the Reduced Expression of Bilirubin UDP-Glucuronosyltransferase 1 in Gilbert's Syndrome. New England Journal of Medicine, 333; 1995: 1171-75

R. Brodersen. Bilirubin. Solubility and interaction with albumin and phospholipid. Journal of Biological Chemistry, 254; 1979: 2364-69

A. W. Bull, N. D. Nigro, W. A. Golembieski, J. D. Crissman and L. J. Marnett. In Vivo Stimulation of DNA Synthesis and Induction of Ornithine Decarboxylase in Rat Colon by Fatty Acid Hydroperoxides, Autoxidation Products of Unsaturated Fatty Acids. *Cancer Research*, 44; 1984: 4924-28

A. W. Bull, N. D. Nigro and L. J. Marnett. Structural Requirements for Stimulation of Colonic Cell Proliferation by Oxidized Fatty Acids. *Cancer Research*, 48; 1988: 1771-76

A. C. Bulmer, J. T. Blanchfield, I. Toth, R. G. Fassett and J. S. Coombes. Improved resistance to serum oxidation in Gilbert's syndrome: A mechanism for cardiovascular protection. *Atherosclerosis*, 199; 2008a: 390-96

A. C. Bulmer, K. Ried, J. T. Blanchfield and K. H. Wagner. The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 658; 2008b: 28-41

A. C. Bulmer, K. Ried, J. T. Blanchfield and K. H. Wagner. The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutation research*, 658; 2008c: 28-41

E. Cadenas. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*, 58; 1989: 79-110

Y. S. Chang, J. H. Hwang, H. N. Kwon, C. W. Choi, S. Y. Ko, W. S. Park, S. M. Shin and M. Lee. In vitro and in vivo efficacy of new blue light emitting diode phototherapy compared to conventional halogen quartz phototherapy for neonatal jaundice. *Journal of Korean medical science*, 20; 2005: 61-4

A. Chaudhary, M. Nokubo, G. Reddy, S. Yeola, J. Morrow, I. Blair and L. Marnett. Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science*, 265; 1994: 1580-82

A. Collins, A. Azqueta and S. Langie. Effects of micronutrients on DNA repair. *European Journal of Nutrition*, 51; 2012: 261-79

A. R. Collins. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular biotechnology*, 26; 2004: 249-61

A. R. Collins. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation research*, 681; 2009a: 24-32

A. R. Collins. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681; 2009b: 24-32

A. R. Collins, A. A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivao, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C. C. Smith and R. Stetina. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23; 2008: 143-51

E. M. Conner and M. B. Grisham. Inflammation, free radicals and antioxidants. *Nutrition*, 12; 1996: 274-77

P. R. Cook, I. A. Brazell and E. Jost. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *Journal of cell science*, 22; 1976: 303-24

F. J. Cuperus, A. M. Hafkamp, R. Havinga, L. Vitek, J. Zelenka, C. Tiribelli, J. D. Ostrow and H. J. Verkade. Effective treatment of unconjugated hyperbilirubinemia with oral bile salts in Gunn rats. *Gastroenterology*, 136; 2009: 673-82 e1

A. Dhawan, M. Bajpayee and D. Parmar. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell biology and toxicology*, 25; 2009: 5-32

M. Dizdaroglu, P. Jaruga, M. Birincioglu and H. Rodriguez. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*, 32; 2002: 1102-15

P. W. Doetsch, W. D. Henner, R. P. Cunningham, J. H. Toney and D. E. Helland. A highly conserved endonuclease activity present in *Escherichia coli*, bovine, and human cells recognizes oxidative DNA damage at sites of pyrimidines. *Molecular and cellular biology*, 7; 1987: 26-32

S. Doré, M. Takahashi, C. D. Ferris, L. D. Hester, D. Guastella and S. H. Snyder. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96; 1999: 2445-50

W. Dröge. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiological Reviews*, 82; 2002: 47-95

S. J. Duthie, A. Ma, M. A. Ross and A. R. Collins. Antioxidant Supplementation Decreases Oxidative DNA Damage in Human Lymphocytes. *Cancer Research*, 56; 1996: 1291-95

H. Esterbauer, G. Wårg and H. Puhl. Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *British Medical Bulletin*, 49; 1993: 566-76

K. Y. Fertrin, M. S. Gonçalves, S. T. O. Saad and F. F. Costa. Frequencies of UDP-glucuronosyltransferase 1 (UGT1A1) gene promoter polymorphisms among distinct ethnic groups from Brazil. *American Journal of Medical Genetics*, 108; 2002: 117-19

J. Fevery, N. Blanckaert, K. P. Heirwegh, A. M. Preaux and P. Berthelot. Unconjugated bilirubin and an increased proportion of bilirubin monoconjugates in the bile of patients with Gilbert's syndrome and Crigler-Najjar disease. *The Journal of clinical investigation*, 60; 1977: 970-9

L. Forchhammer, E. V. Brauner, J. K. Folkmann, P. H. Danielsen, C. Nielsen, A. Jensen, S. Loft, G. Friis and P. Moller. Variation in assessment of oxidatively damaged DNA in mononuclear blood cells by the comet assay with visual scoring. *Mutagenesis*, 23; 2008: 223-31

L. Forchhammer, C. Ersson, S. Loft, L. Moller, R. W. Godschalk, F. J. van Schooten, G. D. Jones, J. A. Higgins, M. Cooke, V. Mistry, M. Karbaschi, A. R. Collins, A. Azqueta, D. H. Phillips, O. Sozeri, M. N. Routledge, K. Nelson-Smith, P. Riso, M. Porrini, G. Matullo, A. Allione, M. Steepnik, M. Komorowska, J. P. Teixeira, S. Costa, L. A. Corcuera, A. Lopez de Cerain, B. Laffon, V. Valdiglesias and P. Moller. Inter-laboratory variation in DNA damage using a standard comet assay protocol. *Mutagenesis*, 2012:

A. W. G. Schatz, M. Deicher. *Nukleare Festkörperphysik*. 4, Wiesbaden. 2010, ISBN 978-3-8351-0228-6

R. Gerschman, D. L. Gilbert, S. W. Nye, P. Dwyer and W. O. Fenn. Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119; 1954: 623-6

L. Gerward. Paul Villard and his Discovery of Gamma Rays. *Physics in Perspective (PIP)*, 1; 1999: 367-83

P. Goldin-Lang, E. D. Kreuser and H. J. Zunft. Basis and consequences of primary and secondary prevention of gastrointestinal tumors. Recent results in cancer research. *Fortschritte der Krebsforschung. Progres dans les recherches sur le cancer*, 142; 1996: 163-92

G. R. Gourley. Bilirubin metabolism and kernicterus. *Advances in pediatrics*, 44; 1997: 173-229

C. K. Gunn. Hereditary Acholuric Jaundice in the Rat. *Canadian Medical Association journal*, 50; 1944: 230-7

E. Hall. *Radiobiology for the Radiologist*. 6, Philadelphia (PA). 2006,

A. Hartmann, E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud and R. R. Tice. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis*, 18; 2003: 45-51

K. Hensley, K. A. Robinson, S. P. Gabbita, S. Salsman and R. A. Floyd. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 28; 2000: 1456-62

C. J. Hochanadel. Effects of Cobalt Gamma-Radiation on Water and Aqueous Solutions. *J Phys Chem-U.S.*, 56; 1952: 587-94

H. Hoffmann and J.-P. Krischewski. *Radiologie*. 2002, 3-13-112574-8

IAEA. *Gamma Irradiators For Radiation Processing*. IAEA Brochure; 2005

M. Inoue, F. Sato Eisuke, M. Nishikawa, A.-M. Park, Y. Kira, I. Imada and K. Utsumi. Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and its Role in Aerobic Life. *Current Medicinal Chemistry*, 10; 2003: 2495-505

G. N. Ioannou, I. W. Liou and N. S. Weiss. Serum bilirubin and colorectal cancer risk: a population-based cohort study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 23; 2006: 1637-42

T. Iyanagi. Molecular basis of multiple UDP-glucuronosyltransferase isoenzyme deficiencies in the hyperbilirubinemic rat (Gunn rat). *The Journal of biological chemistry*, 266; 1991: 24048-52

A. Jiraskova, J. Novotny, L. Novotny, P. Vodicka, B. Pardini, A. Naccarati, H. A. Schwertner, J. A. Hubacek, L. Puncocharova, Z. Smerhovsky and L. Vitek. Association of serum bilirubin and promoter variations in HMOX1 and UGT1A1 genes with sporadic colorectal cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 131; 2012: 1549-55

A. Kadakol, S. S. Ghosh, B. S. Sappal, G. Sharma, J. R. Chowdhury and N. R. Chowdhury. Genetic lesions of bilirubin uridine-diphosphoglucuronate glucuronosyltransferase (UGT1A1) causing Crigler-Najjar and Gilbert syndromes: Correlation of genotype to phenotype. *Human Mutation*, 16; 2000: 297-306

T. Kamisako, Y. Kobayashi, K. Takeuchi, T. Ishihara, K. Higuchi, Y. Tanaka, E. C. Gabazza and Y. Adachi. Recent advances in bilirubin metabolism research: The molecular mechanism of hepatocyte bilirubin transport and its clinical relevance. *Journal of Gastroenterology*, 35; 2000: 659-64

W. R. Keene, J. H. Jandl and N. M. Files. The Sites of Hemoglobin Catabolism. *Blood*, 26; 1965: 705-19

D. Keppler and J. König. Hepatic Secretion of Conjugated Drugs and Endogenous Substances. *Semin Liver Dis*, 20; 2000: 265-72

P. Keshavan, S. J. Schwemberger, D. L. Smith, G. F. Babcock and S. D. Zucker. Unconjugated bilirubin induces apoptosis in colon cancer cells by triggering mitochondrial depolarization. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 112; 2004a: 433-45

P. Keshavan, S. J. Schwemberger, D. L. H. Smith, G. F. Babcock and S. D. Zucker. Unconjugated bilirubin induces apoptosis in colon cancer cells by

triggering mitochondrial depolarization. *International Journal of Cancer*, 112; 2004b: 433-45

J. Laval. Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathologie-biologie*, 44; 1996: 14-24

E. Lee, E. Oh, J. Lee and D. Sul. Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 81; 2004: 121-32

M. J. Maisels and T. B. Newman. Jaundice in full-term and near-term babies who leave the hospital within 36 hours: The pediatrician's nemesis. *Clinics in Perinatology*, 25; 1998: 295-302

T. Maruhashi, J. Soga, N. Fujimura, N. Idei, S. Mikami, Y. Iwamoto, M. Kajikawa, T. Matsumoto, Y. Kihara, K. Chayama, K. Noma, A. Nakashima, H. Tomiyama, B. Takase, A. Yamashina and Y. Higashi. Hyperbilirubinemia, Augmentation of Endothelial Function, and Decrease in Oxidative Stress in Gilbert Syndrome / Clinical Perspective. *Circulation*, 126; 2012: 598-603

J. W. McDonald, S. M. Shapiro, F. S. Silverstein and M. V. Johnston. Role of glutamate receptor-mediated excitotoxicity in bilirubin-induced brain injury in the Gunn rat model. *Experimental neurology*, 150; 1998: 21-9

P. Moller. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 96 Suppl 1; 2005: 1-42

K. A. Nath, L. V. d'Uscio, J. P. Juncos, A. J. Croatt, M. C. Manriquez, S. T. Pittcock and Z. S. Katusic. An analysis of the DOCA-salt model of hypertension in HO-1^{-/-} mice and the Gunn rat. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 293; 2007: H333-42

J. Neuzil and R. Stocker. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS Letters*, 331; 1993a: 281-84

J. Neuzil and R. Stocker. Bilirubin attenuates radical-mediated damage to serum albumin. *FEBS letters*, 331; 1993b: 281-4

P. L. Olive and J. P. Banath. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature protocols*, 1; 2006: 23-9

P. L. Olive, J. P. Banath and R. E. Durand. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiation research*, 122; 1990: 86-94

O. Ostling and K. J. Johanson. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 123; 1984: 291-8

- J. D. Ostrow. Photocatabolism of labeled bilirubin in the congenitally jaundiced (Gunn) rat. *The Journal of clinical investigation*, 50; 1971: 707-18
- J. D. Ostrow, L. Pascolo, D. Brites and C. Tiribelli. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity. *Trends in molecular medicine*, 10; 2004a: 65-70
- J. D. Ostrow, L. Pascolo, D. Brites and C. Tiribelli. Molecular basis of bilirubin-induced neurotoxicity. *Trends in Molecular Medicine*, 10; 2004b: 65-70
- B. Pastina and J. A. LaVerne. Effect of molecular hydrogen on hydrogen peroxide in water radiolysis. *J Phys Chem A*, 105; 2001: 9316-22
- J. J. Perona, B. Editors-in-Chief: Sydney and H. M. Jeffrey. *DNA Structure. Book DNA Structure*. New York, 2001; 572-74
- A. Pflueger, A. J. Croatt, T. E. Peterson, L. A. Smith, L. V. d'Uscio, Z. S. Katusic and K. A. Nath. The hyperbilirubinemic Gunn rat is resistant to the pressor effects of angiotensin II. *American journal of physiology. Renal physiology*, 288; 2005: F552-8
- N. R. Pimstone, R. Tenhunen, P. T. Seitz, H. S. Marver and R. Schmid. The Enzymatic Degradation of Hemoglobin to Bile Pigments by Macrophages. *The Journal of Experimental Medicine*, 133; 1971: 1264-81
- S. M. Piperakis. Comet assay: a brief history. *Cell biology and toxicology*, 25; 2009: 1-3
- G. Poli, G. Leonarduzzi, F. Biasi and E. Chiarpotto. Oxidative stress and cell signalling. *Current Medicinal Chemistry*, 11; 2004: 1163-82
- B. L. Pool-Zobel, S. L. Abrahamse, A. R. Collins, W. Kark, R. Gugler, D. Oberreuther, E. G. Siegel, S. Treptow-van Lishaut and G. Rechkemmer. Analysis of DNA strand breaks, oxidized bases, and glutathione S-transferase P1 in human colon cells from biopsies. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 8; 1999a: 609-14
- B. L. Pool-Zobel, S. L. Abrahamse, A. R. Collins, W. Kark, R. Gugler, D. Oberreuther, E. G. n. Siegel, S. T.-v. Lishaut and G. Rechkemmer. Analysis of DNA Strand Breaks, Oxidized Bases, and Glutathione S-Transferase P1 in Human Colon Cells from Biopsies. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 8; 1999b: 609-14
- S. Preston-Martin, M. C. Pike, R. K. Ross, P. A. Jones and B. E. Henderson. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer research*, 50; 1990: 7415-21

P. A. Riley. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International journal of radiation biology*, 65; 1994: 27-33

S. H. Robinson. The Origins of Bilirubin. *New England Journal of Medicine*, 279; 1968: 143-49

Y. F. Sasaki, K. Sekihashi, F. Izumiyama, E. Nishidate, A. Saga, K. Ishida and S. Tsuda. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. *Critical reviews in toxicology*, 30; 2000: 629-799

R. Schmid and A. F. McDonagh. The Enzymatic Formation of Bilirubin*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 244; 1975: 533-52

F. Schmitt, M. Flageul, A. Dariel, V. Pichard, C. A. Pontes, S. Boni, G. Podevin, A. Myara, N. Ferry and T. H. Nguyen. Transient increase in intrahepatic pressure mediates successful treatment of the Gunn rat with reduced doses of lentiviral vector. *Human gene therapy*, 21; 2010a: 1349-56

F. Schmitt, S. Remy, A. Dariel, M. Flageul, V. Pichard, S. Boni, C. Usal, A. Myara, S. Laplanche, I. Anegon, P. Labrune, G. Podevin, N. Ferry and T. H. Nguyen. Lentiviral vectors that express UGT1A1 in liver and contain miR-142 target sequences normalize hyperbilirubinemia in Gunn rats. *Gastroenterology*, 139; 2010b: 999-1007, 07 e1-2

A. L. Sesink, D. S. Termont, J. H. Kleibeuker and R. Van der Meer. Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme. *Cancer research*, 59; 1999: 5704-9

N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research*, 175; 1988: 184-91

V. Skar and H. Saxerholt. High-Performance Liquid Chromatography of Bilirubin Conjugates in Bile: Effect of β -Glucuronidase on the Bile Pigments. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 24; 1989: 657-65

Z. Somosy, G. Horvath, A. Telbisz, G. Rez and Z. Palfia. Morphological aspects of ionizing radiation response of small intestine. *Micron*, 33; 2002: 167-78

G. Speit, P. Schutz, I. Bonzheim, K. Trenz and H. Hoffmann. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicology letters*, 146; 2004: 151-8

R. Stocker, A. N. Glazer and B. N. Ames. Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84; 1987: 5918-22

W. L. Stone and A. M. Papas. Tocopherols and the etiology of colon cancer. *J Natl Cancer Inst*, 89; 1997: 1006-14

E. Temme, J. Zhang, E. Schouten and H. Kesteloot. Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population. *Cancer Causes and Control*, 12; 2001: 887-94

V. J. Thannickal and B. L. Fanburg. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279; 2000: L1005-L28

G. Toietta, V. P. Mane, W. S. Norona, M. J. Finegold, P. Ng, A. F. McDonagh, A. L. Beaudet and B. Lee. Lifelong elimination of hyperbilirubinemia in the Gunn rat with a single injection of helper-dependent adenoviral vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102; 2005: 3930-5

M. Valko, M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes and J. Telser. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 266; 2004: 37-56

M. Valko, C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic and M. Mazur. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160; 2006: 1-40

M. Verheij and H. Bartelink. Radiation-induced apoptosis. *Cell and tissue research*, 301; 2000: 133-42

L. Vitek, L. Muchova, J. Zelenka, M. Zadinova and J. Malina. The effect of zinc salts on serum bilirubin levels in hyperbilirubinemic rats. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 40; 2005: 135-40

L. Vitek and J. D. Ostrow. Bilirubin Chemistry and Metabolism; Harmful and Protective Aspects. *Current Pharmaceutical Design*, 15; 2009: 2869-83

L. Vitek and H. A. Schwertner. The Heme Catabolic Pathway and its Protective Effects on Oxidative Stress-Mediated Diseases. 2007

M. Volkmer. Radioaktivität und Strahlenschutz. 2007, 3-926956-45-3

C. J. Watson, J. W. Hall III and M. Weimer. The in vitro conversion of bile pigments to the urobilinoids by a rat *Clostridia* species as compared with the human fecal flora. I. Bilirubin and bilirubin glucuronide. *Biochemical medicine*, 2; 1969: 461-83

T.-W. Wu, K. P. Fung, J. Wu, C.-C. Yang and R. D. Weisel. Antioxidation of human low density lipoprotein by unconjugated and conjugated bilirubins. *Biochemical Pharmacology*, 51; 1996: 859-62

J. Zelenka, M. Lenicek, L. Muchova, M. Jirsa, M. Kudla, P. Balazc, M. Zadinova, J. D. Ostrow, R. J. Wong and L. Vitek. Highly sensitive method for quantitative determination of bilirubin in biological fluids and tissues. *Journal of Chromatography B*, 867; 2008: 37-42

S. D. Zucker, P. S. Horn and K. E. Sherman. Serum bilirubin levels in the U.S. population: gender effect and inverse correlation with colorectal cancer. *Hepatology*, 40; 2004a: 827-35

S. D. Zucker, P. S. Horn and K. E. Sherman. Serum bilirubin levels in the U.S. Population: Gender effect and inverse correlation with colorectal cancer. *Hepatology*, 40; 2004b: 827-35

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name.	Stephanie Schreidl
Geburtsdatum:	20.09.1984
Staatsbürgerschaft:	Österreich
eMail:	stephanie.schreidl@gmx.at

Ausbildung

Seit 10/2004	Diplomstudium Ernährungswissenschaften Institut für Ernährungswissenschaften Universität Wien
1995-2004	Bundesrealgymnasium Franklinstrasse 26 Reifeprüfung

Facheinschlägige Praktika

05/201-06/2011	Institut für Ernährungswissenschaften Universität Wien Spezialisierung: Comet Assay Leitung: K.H. Wagner
10/2010-12/2010	Institut für Ernährungswissenschaften Universität Wien Erfassung von Food Labeling am aktuellen österreichischen Lebensmittelmarkt Datenverarbeitung der Nährwertkennzeichnungen Leitung: J. König

Sprachen

Deutsch	(Muttersprache)
Englisch	(fließend in Wort und Schrift)
Französisch	(Maturaniveau)

EDV Kenntnisse

Erfahren:	SPSS, Endnote, USDA National Nutrient Database for Standard Reference, NUT.S Nutrition Software, MS Office bis 2010
Basics:	Adobe Photoshop

Analytische Fähigkeiten

Comet Assay, Blutaufbereitung, Photometrie, Lebensmittelanalysen, Bedienen einer Strahlenquelle

Erklärung zur gemeinsamen Bearbeitung eines Themas

Gemäß dem Universitätsgesetz §81(Abs. 3 UG) wurden die Diplomarbeiten mit dem Titel

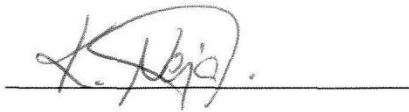
„Ermittlung von DNA Schäden in Gunn Ratten mittels Comet Assay“

und dem zweiten Titel

„Einfluss von erhöhtem Bilirubin auf die DNA-Stabilität von Lymphozyten und Hepatozyten“

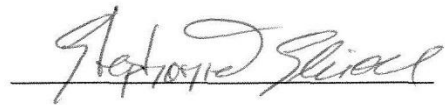
von Khatereh Najafi und Stephanie Schreidl im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie am Institut für Ernährungswissenschaften unter der Betreuung von Herrn Ao. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner und Frau Mag. Marlies Wallner an der Universität Wien gemeinsam verfasst.

Im Inhaltsverzeichnis dieser Arbeit sind die Teile der jeweiligen Verfasserin genau zugeordnet.



Unterschrift

Khatereh Najafi (15.07.1984)



Unterschrift

Stephanie Schreidl (20.09.1984)

Wien, November 2012