



universität  
wien

# MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Bilirubin und Altern: Ergebnisse aus der Vienna Active Ageing Study (VAAS)“

verfasst von / submitted by

Nico Fleck, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Master of Science (MSc)

Wien, 2017 / Vienna 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

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

## **Danksagung**

Ich möchte mich hiermit bei allen Personen, die mir während meiner theoretischen und praktischen Arbeit in Bezug auf meine Masterarbeit geholfen haben recht herzlich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt dabei Nazlisadat Seyed Khoei, MSc, die mich von Anfang an bis zum Ende großartig unterstützt hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein weiterer besonderer Dank gilt auch Univ. Prof. Mag. Dr. Karl-Heinz Wagner für die Betreuung meiner Masterarbeit sowie die tatkräftige Unterstützung währenddessen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei meiner Laborkollegin Veronika Bahringer für die produktive und kollegiale Zusammenarbeit bedanken.

Ein ganz spezieller Dank gilt meiner Familie, die mich während meines gesamten Studiums in allen Belangen unterstützt, motiviert, beraten und aufgebaut hat! Vielen Dank!

In diesem Zusammenhang möchte ich auch meiner Freundin Raphaela für ihre Unterstützung, Geduld und Nachsicht über das ganze Studium hinweg und auch in der finalen Phase meiner Masterarbeit danken!

## **Inhaltsverzeichnis**

1) Einleitung.....	1
2) Literaturübersicht.....	3
2.1 Chemische Eigenschaften von Bilirubin.....	4
2.2 Metabolismus von Bilirubin .....	5
2.3 Gilbert's Syndrome .....	10
2.4 Physiologische Relevanz von Bilirubin.....	12
2.4.1 Anti-oxidative Eigenschaften von Bilirubin.....	14
2.4.2 Anti-inflammatorische Eigenschaften von Bilirubin.....	18
2.4.3 Anti-karzinogene Eigenschaften von Bilirubin .....	21
2.4.4 Alterungsprozess.....	23
2.4.5 Zusammenhang Altern und Bilirubin .....	30
3) Material und Methoden.....	34
3.1 Studiendesign Active Ageing .....	34
3.2 Teilnahmekriterien .....	36
3.3 Trainingsintervention.....	37
3.4 Ernährungsintervention.....	38
3.5 Kognitive Kontrollgruppe.....	41
3.6 High performance liquid chromatography (HPLC) .....	42
3.6.1 Technische Details der HPLC .....	42
3.6.2 Chemikalien für die HPLC .....	43
3.6.3 Herstellung des Laufmittels / mobile Phase .....	43
3.6.4 Herstellung des Standards .....	46
3.6.5 Herstellung der Proben / Probenaufarbeitung .....	48
3.7 Konfiguration des HPLC Geräts.....	49
3.8 Interpretation der Bilirubin Peaks .....	51
3.9 Reproduzierbarkeit .....	52
3.10 Statistische Analyse.....	53
4) Ergebnisse und Diskussion .....	54
4.1 Alter .....	66

4.2	Body Mass Index .....	70
4.3	LDL-Cholesterin und oxidiertes LDL .....	76
4.4	8-oxo-Guanin und 8-oxo-2'-Desoxyguanosin.....	77
4.5	Superoxiddismutase und Katalase .....	79
5)	Schlussbetrachtung.....	84
6)	Zusammenfassung.....	86
7)	Summary .....	87
8)	Quellenangabe .....	88

## **Abkürzungsverzeichnis**

8oxodGua	8-oxo-2'-Desoxyguanosin
8oxoGua	8-oxo-Guanin
AcOH	Essigsäure
ACSM	American College of Sports Medicine
AUC	Area under the curve
BLVRA	Biliverdin Reduktase
BMI	Body Mass Index
BR	Bilirubin
BV	Biliverdin
CO	Kohlenstoffmonoxid
CRC	Kolonrektalkrebs
CRP	C-reaktives Protein
DAMP	Damage associated molecule pattern
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Fe	Eisenatom
GS	Gilbert's Syndrome
HMOX	Hämoxigenase
HPLC	High performance liquid chromatography
Hs-CRP	Hoch-sensitives C-reaktives Protein
IL	Interleukin
IQR	Interquartilsabstand
KAT	Katalase
LDL-C	Low-density-Lipoprotein Konzentration
MetS	Metabolisches Syndrom
MMST	Mini Mental State Examination

MRP-2	Multi resistant drug protein 2
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
MW	Mittelwert
OxLDL	Oxidiertes Low-density Lipoprotein
OR	Odds Ratio
ÖSG	Österreichische Sportwissenschaftliche Gesellschaft
PAMP	Pathogen associated molecule pattern
QC	Qualitätskontrolle
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
RPM	Umdrehungen pro Minute
RR	Relatives Risiko
Rt	Retention time
SAA	Serum Amyloid A
SOD	Superoxiddismutase
SPPB	Short physical performance battery
Stdabw	Standardabweichung
TA	Thymidine Adenosin
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
UCB	Unkonjugiertes Bilirubin
UDP	Uridin Diphosphat
UGT 1A1	Uridin Diphosphat Glukuronosyl Transferase 1A1
VAAS	Vienna Active Ageing Study
VK	Variationskoeffizient
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µmol	Mikromol

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturen von Bilirubin (1) und Biliverdin (2) nach Bulmer et al., 2008b .....	4
Abbildung 2: Molekülstruktur von Bilirubin in planarer (a) und echter (b) Konformation (Vitek und Ostrow, 2009) .....	5
Abbildung 3: Abbau von Häm zum Bilirubin und seinen isomeren Formen (Vitek und Ostrow, 2009) .....	7
Abbildung 4: Bildung von UCB-Konjugaten (Bulmer et al., 2008b) .....	8
Abbildung 5: Metabolismus der Gallenpigmente, modifiziert nach Wagner et al., 2015 .....	9
Abbildung 6: Vasoprotektive Effekte von Bilirubin, modifiziert nach Targher, 2014 .....	13
Abbildung 7: Zusammenhang des HMOX/BLRVA mit dem Alterungsprozess, modifiziert nach Kim und Park, 2012 .....	15
Abbildung 8: Anti-oxidative Eigenschaften von UCB, modifiziert nach Bergmann et al., 2015 .....	16
Abbildung 9: Schutz vor Lipidperoxidation durch UCB nach Stocker, 2004 .....	17
Abbildung 10: Protektive Faktoren von UCB, modifiziert nach Kundur et al., 2015 .....	21
Abbildung 11: Zusammenhang von freien Radikalen und dem Alterungsprozess; modifiziert nach Rahman, 2007 .....	26
Abbildung 12: Flowchart der VAAS .....	35
Abbildung 13: Zeitspanne der VAAS .....	37
Abbildung 14: Ablauf einer Trainingseinheit .....	38
Abbildung 15: Gebrauchsanweisung von Nutricia FortiFit (Nutricia FortiFit 2016 [2, 3, 4]) .....	39
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Herstellung der mobilen Phase .....	45
Abbildung 17: Schematische Darstellung des Pippetiervorganges .....	47
Abbildung 18: Pipettierschema für die Aufbereitung der Proben .....	49
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer HPLC .....	50
Abbildung 20: UCB-Peak einer Qualitätskontrolle sowie die dazugehörige Standardgerade .....	51
Abbildung 21: UCB-Konzentration nach Geschlechter zu ZP 1 .....	55
Abbildung 22: Gruppeneinteilung zu ZP 1 .....	56
Abbildung 23: UCB-Konzentrationen nach Gruppeneinteilung zu ZP 1 (Geschlechterunabhängig) .....	57
Abbildung 24: Darstellung der UCB-Konzentrationen über alle 5 Zeitpunkte (Geschlechts- und Interventionsunabhängig) .....	58
Abbildung 25: Verlauf der Parameter über den Interventionszeitraum (ZP1 - ZP3) hinweg (Mittelwerte) .....	66

Abbildung 26: Streudiagramm zwischen Alter und UCB-Konzentration zu ZP 1 .....	69
Abbildung 27: Darstellung der UCB-Konzentrationen nach Gruppen und BMI Kategorie (Geschlechterunabhängig) .....	70
Abbildung 28: Korrelation zwischen BMI und UCB zu ZP 1 (Personen > 10 $\mu\text{mol/L}$ ).....	72
Abbildung 29: Verlauf der Enzymaktivitäten im Gesamtstudienkollektiv (dargestellt sind Mittelwerte) .....	80
Abbildung 30: Änderungen der Enzymaktivitäten im Zuge der Intervention innerhalb der Gruppen (dargestellt sind Mittelwerte) .....	82
Abbildung 31: Korrelation zwischen SOD und KAT .....	83



## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Anti-oxidative Eigenschaften von UCB nach Wagner et al., 2015 ....	18
Tabelle 2: Physiologische Veränderungen im Alter nach Elmadfa und Leitzmann, 2004 .....	29
Tabelle 3: Inhaltsstoffe von Nutricia FortiFit (Nutricia FotiFit 2016 [2, 3, 4]) ....	40
Tabelle 4: Technische Details der HPLC .....	42
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien .....	43
Tabelle 6: Geräte für Proben- und Standardaufbereitung .....	43
Tabelle 7: Pipettierschema für die Herstellung der Standardverdünnungsreihe	46
Tabelle 8: UCB-Konzentrationen geteilt nach Geschlechter zu Beginn der STudie (ZP 1).....	54
Tabelle 9: Deskriptive Tabelle nach Gruppeneinteilung zu ZP 1 .....	56
Tabelle 10: Deskriptive Tabelle der UCB-Konzentrationen von ZP 1 bis 5 .....	57
Tabelle 11: Signifikanzwerte für UCB-Konzentrationen .....	59
Tabelle 12: Unterschiede der UCB-Konzentrationen zwischen den Gruppen zu den jeweiligen ZP.....	60
Tabelle 13: Unterschiede der UCB-Konzentrationen innerhalb der Gruppen ...	61
Tabelle 14: Unterschiede UCB-Konzentrationen innerhalb UCB-Kategorien....	63
Tabelle 15: Zusammenfassung aller Parameter über alle Zeitpunkte .....	65
Tabelle 16: UCB-Konzentrationen innerhalb Alterskategorie 1 .....	67
Tabelle 17: UCB-Konzentrationen innerhalb Alterskategorie 2 .....	68
Tabelle 18: UCB-Konzentrationen in BMI Kategorie über alle Zeitpunkte.....	71
Tabelle 19: BMI Veränderung innerhalb der Gruppen von ZP 1 - ZP 3 .....	73
Tabelle 20: Signifikanzwerte aller Parameter bezogen auf BMI-Kategorie .....	74
Tabelle 21: Veränderung der SOD- und KAT-Enzymaktivität innerhalb der Gruppen.....	81

## 1) Einleitung

In den letzten Jahren wurden Gallenpigmenten wie Bilirubin, Biliverdin und den strukturell ähnlichen Tetrapyrrolen immer mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Anfänglich sah man in diesen Molekülen aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften hauptsächlich toxische Abbauprodukte des Häm-Katabolismus. Heute weiß man jedoch dass sie vielfältige positive Eigenschaften hinsichtlich einer Gesundheitsförderung und der Prävention von Krankheiten aufweisen.

Zahlreiche *in vivo* als auch *in vitro* Studien untermauern positive Effekte und berichten von anti-oxidativen, anti-kanzerogenen, anti-inflammatorischen sowie vaso-protectiven Eigenschaften (Bulmer et al., 2008b). Diese Beobachtungen klingen vielversprechend, allerdings sind die grundlegenden Mechanismen dahinter noch nicht genauer erforscht und gelten als Gegenstand von einigen laufenden Arbeiten.

Ein weiterer interessanter, noch nicht ausreichend erforschter Aspekt stellt der Zusammenhang von Gallenpigmenten (hier vor allem des Bilirubins) mit dem Alterungsprozess dar.

Statistisch gesehen wird die europäische Bevölkerung zunehmend älter, bis zum Jahr 2050 werden etwa bis zu 30% der Bevölkerung älter als 65 Jahre sein (Köhler und Leonhäuser, 2008). In Österreich entsprach der Anteil der über 65-Jährigen im Jahr 2015 18,5 %, die Prognose für 2030 bzw. 2060 liegt bei 23 bzw. 29 % (Statistik Austria, Stand 2016 [1]). Diese zunehmende „Alterung“ der Gesellschaft führt zu einem erhöhten Auftreten von altersbedingten Erkrankungen, resultierend in erhöhten finanziellen Belastungen hinsichtlich Gesundheitsservices und erhöhten sozialen Kosten für einzelne Personen sowie der Gesellschaft (Rahman, 2007).

Aus diesem Grund ist das gesunde und aktive Altern das Hauptziel vieler nationaler und internationaler Programme, die sich mit Krankheitsprävention sowie Gesundheitsförderung im höheren Alter befassen. Grundsätzlich stellt

das Altern an sich einen Risikofaktor für chronische Erkrankungen sowie funktionelle Einschränkungen dar. Bis dato gibt es auch noch keine fundierten Biomarker, die dabei helfen, den Alterungsprozess in entsprechendem Ausmaß zu charakterisieren und individualisieren.

Das liegt weiterführend auch an der Komplexität dieses Prozesses. Geht man nun von den vielfältigen positiven Eigenschaften von Bilirubin aus, könnte man daraus schließen, dass eine erhöhte Konzentration von Bilirubin im Blut im fortgeschrittenen Alter im Zusammenhang mit verbesserten körperlichen Funktionen und mit einer Steigerung Lebensqualität steht.

2011 wurde die Forschungsplattform Active Ageing [6] ins Leben gerufen, die die Hypothese ableitete, dass regelmäßige, körperliche Aktivität in Kombination mit einer adäquaten Ernährung bei älteren Personen positive Auswirkung auf die Gesundheit, die körperliche Leistungsfähigkeit sowie das Wohlbefinden haben kann.

Im Zuge dieser Studie wurden die Auswirkungen von Training, mit und ohne einer spezifischen Ernährungsintervention, auf verschiedenste Parameter, wie z.B. die Bilirubinkonzentration im Blut, oxidativer Stressparameter, Parameter aus dem Fettstoffwechsel oder Enzymaktivitäten erfasst.

Die vorliegende Arbeit stellt ein Teilprojekt der „Active Ageing“ Studie dar und befasst sich, anders als die übrigen, bereits existierenden Arbeiten, hauptsächlich mit dem Gallenfarbstoff Bilirubin und dessen Verlauf während der gesamten Studienzeit. Hierbei wird das Hauptaugenmerk auf den Verlauf der Bilirubinkonzentration während der fünf Hauptzeitpunkte gelegt, die mit Hilfe von High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysiert wurde, um etwaige Zusammenhänge mit dem Alterungsprozess sowie mit anderen physiologischen Parametern zu interpretieren und diskutieren.

## 2) Literaturübersicht

Dem Hauptfarbstoff der Galle, dem Bilirubin, wurde lange Zeit nur eine untergeordnete Rolle hinsichtlich der physiologischen Funktion zugeschrieben, da es primär als Abbauprodukt des Häm - Katabolismus betrachtet wurde und bei Akkumulation im Körper toxische Wirkung haben kann (Bulmer et al., 2008a; Jiraskova et al., 2012).

Der Metabolit Bilirubin wurde ursprünglich als toxisch angesehen, da er hauptsächlich mit Neugeborenenengelbsucht oder mit Leberschäden in Verbindung gebracht wurde. Die Akkumulation von Bilirubin führt in weiterer Folge zu schwerwiegenden, irreversiblen Gehirnschäden, sowie neurologischen Dysfunktionen (Asad et al., 2001; Tomaro und Batlle, 2002, Watchko und Tiribelli, 2013).

Schon früh wurde im Zuge von *in vitro* Studien dem Blutabbaustoff Bilirubin anti-oxidative Eigenschaften nachgesagt, darüber hinaus auch die Verminderung von oxidativen Vorgängen im Plasma (Stocker et al., 1987; Neuzil und Stocker, 1994; Frei et al., 1988). Vor allem in den letzten 20 Jahren nahm die Zahl an Forschungsarbeiten, die die physiologische Relevanz der Gallenpigmente untersuchen, stark zu (Bulmer et al., 2008b).

Sowohl Biliverdin und das daraus gebildete Bilirubin sind Produkte von Redoxreaktionen der Biliverdin Reduktase und der Hämoxygenase im Körper und gelten infolgedessen als potentielle Antioxidantien (Stocker et al., 1987).

Stocker berichtete 2004 von einem verbesserten Schutz von Zellen als auch von Geweben bei Personen mit einer erhöhten Hämoxygenase Aktivität (Stocker, 2004).

Auch Bulmer et al. (2008a) weisen auf die positiven, anti-oxidativen Effekte von Bilirubin hinsichtlich des Auftretens von kardiovaskulären Erkrankungen bei Personen mit Gilbert's Syndrome (GS) hin. Bei einer von Bulmer et al. durchgeführten Studie von 2008 kamen sie zu den Ergebnissen, dass Personen

mit Gilbert's Syndromen sowohl einen erhöhten zirkulierenden Anteil an anti-oxidativen Bestandteilen im Blut als auch eine verbesserte Abwehrfunktion gegenüber oxidativen Stresseinwirkungen im Serum aufweisen.

Nach mehreren experimentellen als auch klinischen Studien in den letzten Jahren verdichteten sich zunehmend die Hinweise, dass Bilirubin sowohl anti-oxidative als auch anti-inflammatorische und anti-kanzerogene Effekte aufweist und somit positive Wirkung auf die Gesundheit hat (Bulmer et al., 2008a; Jiraskova et al., 2012).

## 2.1 Chemische Eigenschaften von Bilirubin

Sowohl das orange Bilirubin als auch das grüne Biliverdin sind endogen gebildete Verbindungen, zählen zu den Gallenpigmenten und sind tetrapyrrolische, dicarboxylierte Säuren (siehe Abbildung 1) (Wagner et al., 2015). Sie zählen zu der Familie der Porphyrine, besitzen also Porphyrin-Struktur und zeichnen sich durch eine einzigartige, voneinander abweichende, dreidimensionale räumliche Anordnung, wie sie in Abbildung 2 zu sehen ist, aus (Bulmer et al., 2008b).

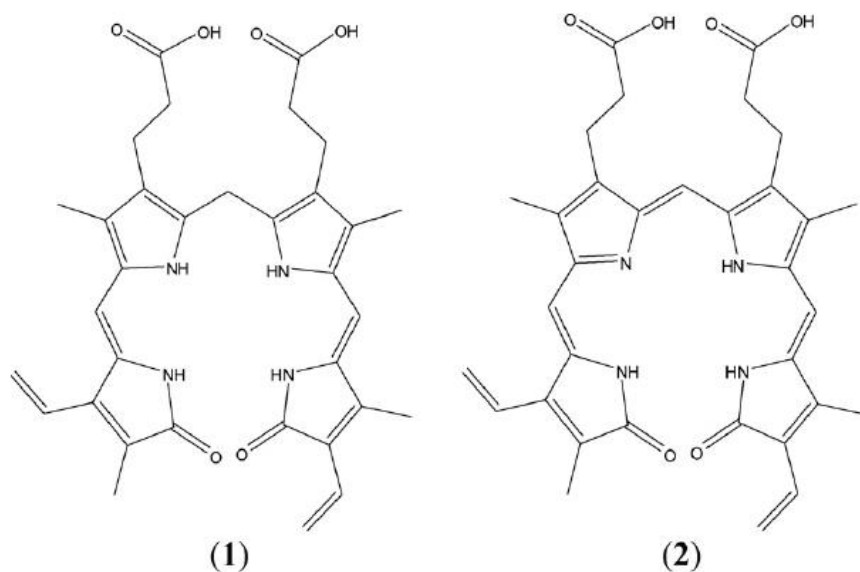


Abbildung 1: Strukturen von Bilirubin (1) und Biliverdin (2) nach Bulmer et al., 2008b

Charakteristisch für freies Bilirubin sind seine sechs internen Wasserstoffbindungen (siehe Abbildung 2), die sowohl für die einzigartige Struktur sowie die physiologischen Effekte verantwortlich sind. Weiterführend ist Bilirubin ein apolares, fettlösliches Molekül, darüber hinaus instabil, da die Doppelbindungen in den Vinyl- und Methen-Gruppen fotosensitiv sind und leicht oxidiert werden. Diese Tatsache macht es schwierig, mit Bilirubin zu arbeiten, da es sowohl bei hohem als auch niedrigem pH-Wert, sowie gegenüber Sauerstoff und Licht empfindlich reagiert (Wang et al., 2006; Vitek & Ostrow, 2009).

Die im Menschen hauptsächlich vorkommende, natürliche Form des Bilirubins ist das IX $\alpha$  Isomer in 4Z, 15Z Form. Weiters kommt Bilirubin noch in den beiden Isoformen III $\alpha$  und XIII $\alpha$  vor, diese sind jedoch im Menschen nicht nachweisbar (Zelenka et al., 2008; Vitek & Ostrow, 2009).

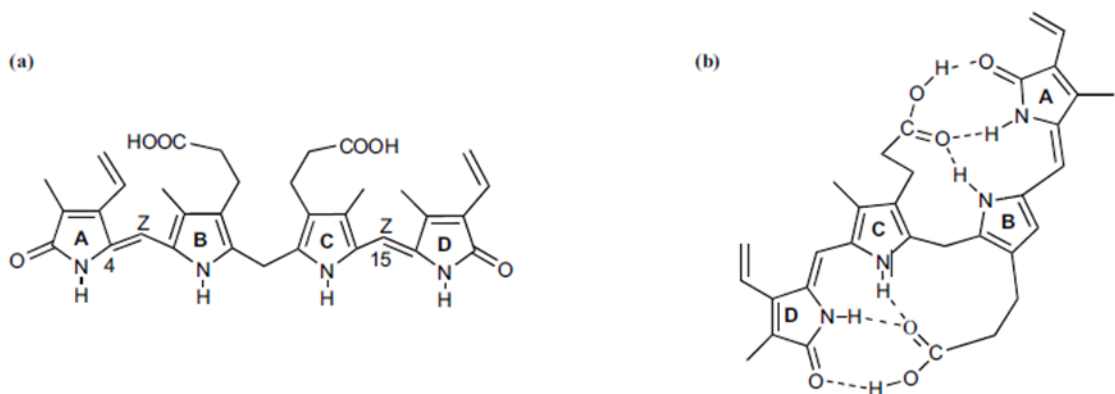


Abbildung 2: Molekülstruktur von Bilirubin in planarer (a) und echter (b) Konformation (Vitek und Ostrow, 2009)

## 2.2 Metabolismus von Bilirubin

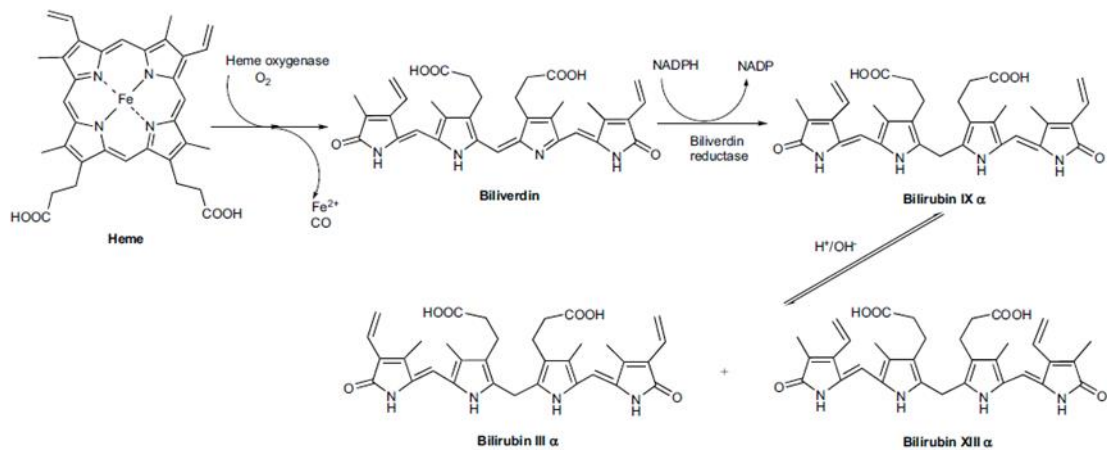
Der Abbau von Häm, bzw. die Bildung von Bilirubin ist ein kontinuierlicher, mehrstufiger Prozess, der dazu führt, dass täglich etwa 300 mg Bilirubin bei Erwachsenen generiert und ausgeschieden wird (Bulmer et al., 2008b; Bulmer et al., 2013, Wagner et al., 2015).

Eine zentrale Rolle bei diesen biochemischen Vorgängen spielt das Enzym Hämoxygenase, von dem es zwei Isoformen gibt: HMOX1 und HMOX2. Diese Enzyme werden im endoplasmatischen Retikulum, in den Mitochondrien, in den Plasmamembranen und im Zellkern ausgeschüttet (Jiraskova et al., 2012; Bulmer et al., 2013). Die Expression von HMOX 1 wird vorwiegend von Häm und oxidativen Stimulanzien, wie Schwermetalle oder ROS induziert. HMOX 2 ist ein nicht induzierbares Enzym, welches hauptsächlich im Gehirn und in den Hoden exprimiert wird (Vitek und Ostrow, 2009; Wang et al., 2006).

Die zentrale Quelle des Häms für die Biosynthese des Bilirubins stellt das Hämoglobin dar. Dieses wird im Zuge der Degradation von alternden, roten Blutkörperchen in der Leber, Milz sowie im Knochenmark (retikuloendotheliales System) freigesetzt. Nicht-erythroide Hämproteine aus der Leber, der Abbau von unreifen bzw. defekten roten Blutzellen in der Milz sowie exzessive Häm Produktion im Knochenmark stellen ebenfalls eine Quelle für die Synthese von Bilirubin dar, allerdings in einem geringeren Ausmaß (20 - 25%) (Bulmer et al., 2008b, Wang et al., 2006, Vitek und Ostrow, 2009).

Das zentrale Eisenatom des Häms wird durch das mikrosomale Enzym Hämoxygenase (HMOX 1/2), genauer gesagt durch die Aufspaltung der alpha-Methen Brücke, freigesetzt. Dieser Schritt stellt den limitierenden Faktor dar und resultiert in der Bildung von Protoporphyrin, welches anschließend durch Oxidation und Ringöffnung durch NADPH zur Bildung von Biliverdin führt (Vitek und Ostrow, 2009, Wang et al., 2006).

Biliverdin wird im nächsten Schritt durch die Biliverdin Reduktase (BLVRA) in einer NADP/NADPH abhängigen Reaktion im Zytosol zu dem gelb-färbigen, unkonjugiertem (freien) Bilirubin reduziert. Diese Reaktion ist durch die Reduktion der zentralen Methen-Brücke von Biliverdin charakterisiert und ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Abbau von Häm zum Bilirubin und seinen isomeren Formen (Vitek und Ostrow, 2009)**

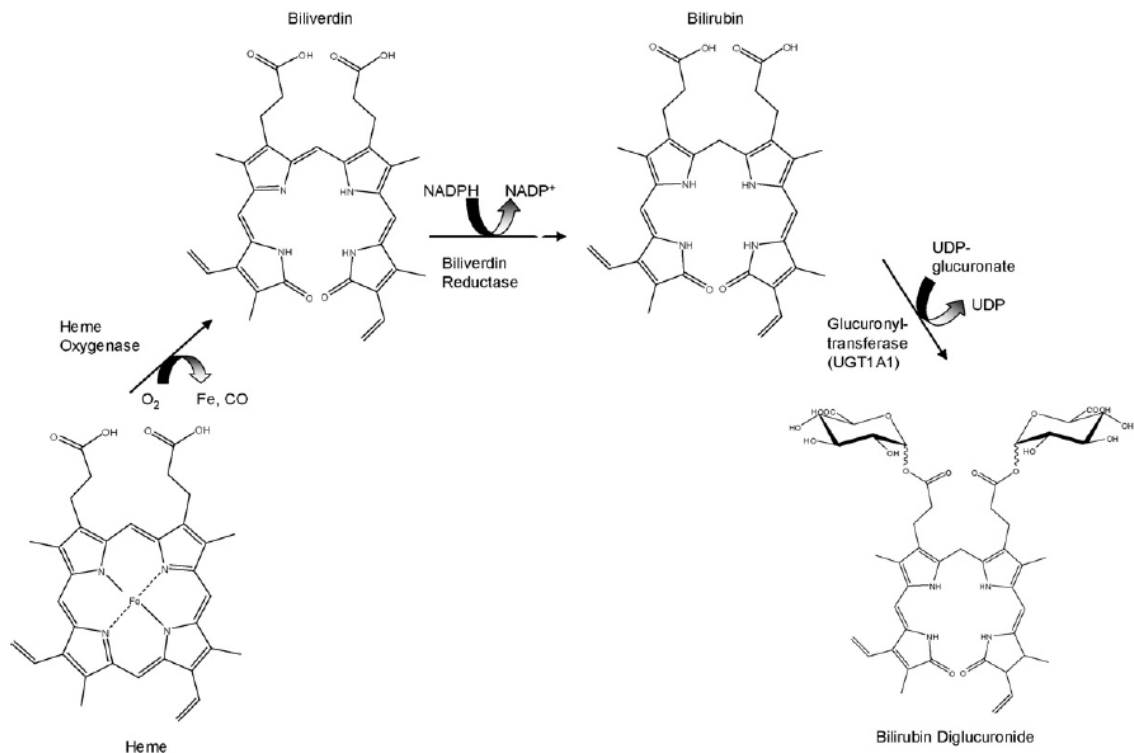
BLVRA ist vorwiegend in Geweben lokalisiert, die eine erhöhte HMOX Aktivität aufweisen. Bevor sie ihre Reduktase-Aktivität aufzeigen kann, muss sie jedoch phosphoryliert werden. Durch eine Autophosphorylation kommt es in weiterer Folge zu einer erhöhten Umsetzung des wasserlöslichen BV zum hydrophoben, anti-oxidativ wirkenden BR (Vitek und Ostrow, 2009).

Freies Bilirubin (UCB) ist lipophil und durch diese Eigenschaft im Körper nur schwer löslich. Es diffundiert in weiterer Folge ins Blut, wo es an Plasmaalbumin gebunden wird. Albumin weist eine erhöhte Bindungsaffinität gegenüber UCB auf, was wiederum zum Schutz der Zellen gegenüber den zytotoxischen Eigenschaften von freiem Bilirubin beiträgt. Unter normalen Bedingungen ist der Anteil von freiem Bilirubin jedoch kleiner als 0,1 % (Bulmer et al., 2008b; Vitek und Ostrow, 2009).

Der Plasmaalbumin-Bilirubin-Komplex wird zur Leber transportiert, wo er in weiterer Folge dissoziiert. In der Leber kommt es zur aktiven und passiven Aufnahme in die Hepatozyten. Dort wird das freie Bilirubin an die hepatische Glutathion-S-Transferase gebunden und zum endoplasmatischen Retikulum transportiert, wo es schließlich durch die UDP-Glukuronosyltransferase (UGT1A1) an Glukuronsäure gebunden wird und wasserlösliche Glukuronsäurekonjugate entstehen (siehe Abbildung 4). Bei Erwachsenen handelt es sich hierbei hauptsächlich um die Bildung von Dikonjugaten



(Stocker, 2004; Bulmer et al., 2008b; Bulmer et al., 2013; Jiraskova et al., 2012; Wagner et al., 2015).



**Abbildung 4: Bildung von UCB-Konjugaten (Bulmer et al., 2008b)**

Die Ausscheidung von Bilirubin verläuft hauptsächlich über die Leber. Das Multi-resistant drug protein 2 (MRP2) exportiert die zuvor gebildeten Bilirubinglukuronide aus den Hepatozyten in den Leberkanal, wo es in weiterer Folge über den Gallengang mit der Gallenflüssigkeit ins Duodenum gelangt. Im Gastrointestinaltrakt werden die Konjugate von der  $\beta$ -Glucuronidase der Darmbakterien gespalten, wobei ein kleiner Teil des unkonjugierten Bilirubins und seiner Metabolite durch den enterohepatischen Kreislauf erneut absorbiert werden. (Bulmer et al., 2008b; Vitek und Ostrow, 2009; Wagner et al., 2015).

Das im Darm zurückbleibende, freie Bilirubin wird von der intestinalen Mikroflora (anaerobe Bakterien) zu farblosen Bilirubin-Metaboliten (Urobilinogene) reduziert (siehe Abbildung 5). Diese Verbindungen werden hauptsächlich im Stuhl in Form ihrer orange-gelben Oxidationsprodukte, besser bekannt als Urobiline und Stercobiline, ausgeschieden. Ein geringer Anteil

dieser Urobilinen wird über die Niere ausgeschieden (Wang et al., 2006; Bulmer et al., 2008b).

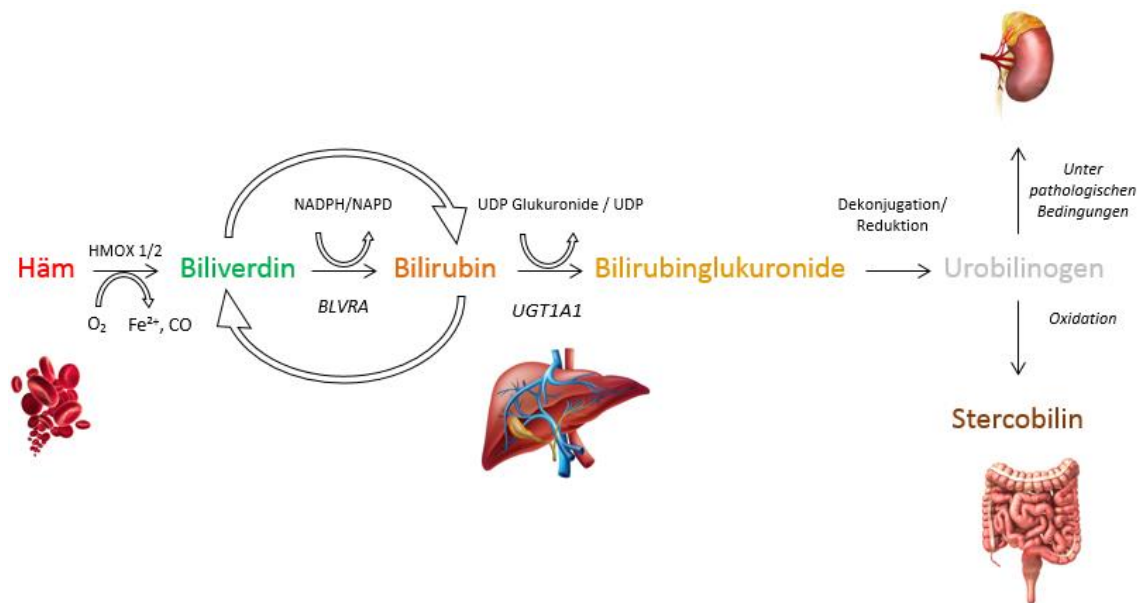


Abbildung 5: Metabolismus der Gallenpigmente, modifiziert nach Wagner et al., 2015

Die Wichtigkeit dieses Abbauprozesses über die Leber wird verdeutlicht, wenn man in Betracht zieht, dass eine Behinderung des Gallenabflusses Gelbsucht, resultierend aus einem erhöhten Bilirubinspiegel im Blut, hervorruft (Bulmer et al., 2013).

Ebenso wirkt eine erhöhte Konzentration von unkonjugiertem Bilirubin, die die Bindungskapazität von Plasmaalbumin übersteigt und somit die Ausscheidung über die Leber erschwert, neurotoxisch (Watchko und Tiribelli, 2013).

Darüber hinaus können auch andere krankheitsbedingte Zustände im Körper, wie z.B. Hepatitis, die Konjugation von Bilirubin sowie dessen Ausscheidung wesentlich beeinträchtigen und so zu einer erhöhten Konzentration von gebundenem und freiem Bilirubin im Blut führen (Bulmer et al., 2013).

Eine weitere Möglichkeit des Körpers Bilirubin effektiv auszuscheiden stellt ein Transportmechanismus über die Niere dar. Da freies Bilirubin, wie vorher beschrieben, an Plasmaalbumin gebunden ist, wird nur ein geringer Teil davon

an den Glomeruli filtriert. Dadurch gelangt das Bilirubin von den vaskulären Kompartimenten in die proximalen Tubuluszellen der Niere, wo es wiederum von UDP1A1 konjugiert wird und entweder zurück ins Blut gelangt oder mit dem Urin ausgeschieden wird. Gebundenes Bilirubin wird an den Glomeruli gefiltert. Die Niere ist für die Ausscheidung von freiem und gebundenem Bilirubin, als auch von oxidierten Bilirubinspezies wie Biopyrrine sehr wichtig (Bulmer et al., 2013).

Unter normalen Umständen steht die UCB-Synthese in direktem Zusammenhang mit dem Abbau von Häm. Dabei kommt es täglich zur Synthese von etwa 300 mg UCB. Die Plasmakonzentrationen von Bilirubin liegt normalerweise bei etwa 0,2 bis 1 mg/dL (3 - 17  $\mu\text{mol/L}$ ), kann aber durch gewisse Abnormitäten im Stoffwechsel oder andere Stoffwechselkrankheiten auch erhöht sein. (Wang et al., 2006; Bulmer et al., 2013; Wagner et al., 2015).

Leicht erhöhte Konzentrationen von UCB im Serum können auch harmlos verlaufen und bedürfen keiner weiteren, medizinischen Behandlung. Konzentrationen über 1,8 mg/dL (30  $\mu\text{mol/L}$ ) können unter Umständen zu gesundheitlichen Risiken, vorrangig zu neurologischen Schäden im Gehirn führen. Diese erhöhten Bilirubin Spiegel äußern sich als gelbliche Verfärbung der Skleren und der Haut und werden grundsätzlich als Gelbsucht (Ikterus) diagnostiziert (Silbernagl & Despopoulos, 2003, Wagner et al., 2015)

### **2.3 Gilbert's Syndrome**

Beim sogenannten Gilbert's Syndrome handelt es sich um einen autosomal-rezessiven Zustand, bei dem es primär zu einer erhöhten Bilirubinkonzentration im Blut in Folge einer Mutation des UGT1A1 Gens, welches für die UDP Glukuronosyltransferase kodiert, kommt. Dieses Enzym ist schlussendlich für die Bilirubin Glukuronidierung verantwortlich. GS ist ein relativ häufiger Zustand in der heutigen Gesellschaft, von dem etwa 3 - 17% der Bevölkerung betroffen sind. Männer scheinen dabei mit 12,4% häufiger betroffen zu sein als Frauen

(4,8%). Bei GS spricht man üblicherweise von einem harmlosen Zustand, der bei Erwachsenen zu einer UCB-Konzentration von über 17,1  $\mu\text{mol}$  führt (Bosma et al., 1995; Bulmer et al., 2008a; Yesioliva et al., 2008).

Bei Uridin-Diphosphat-Glukuronosyltransferasen (UGTs) handelt es sich um mikrosomale Enzyme, die die Fähigkeit besitzen, exogene sowie endogene Metabolite durch Glukuronidierung zu entgiften und in weiterer Folge ausscheidbar zu machen. Zu den erwähnten Metaboliten zählen unter anderem Drogen, Medikamente, Hormone, Mutagene aus der Umwelt, Nahrungsbestandteile, Gallensäuren, Bilirubin oder auch Fettsäuren (Mackenzie et al., 2010; Strassburg et al., 2008; Miners et al., 2002).

UGT1A1 ist das einzige Enzym welches in der Lage ist das wasserlösliche Bilirubin mit Glukuronsäure zu konjugieren, um somit eine Ausscheidung zu ermöglichen. Diese Fähigkeit bzw. dieser Stoffwechselweg kann von keinem anderen Enzym oder physiologischen System übernommen werden (Miners et al., 2002; Mackenzie et al., 2010).

Die Aktivität des Enzyms wird von vielen Faktoren beeinflusst, dazu zählen vor allem Medikamente, Hormone oder auch genetische Variationen. Veränderungen bezüglich der Expression von UGT1A1 beeinflussen in weiterer Folge auch den Abbau von Bilirubin und so führen Polymorphismen in diesem Gen zur Entwicklung einer Hyperbilirubinämie (Sugatani, 2013; Vitek und Ostrow, 2009; Strassburg et al., 2008)

Bei Personen mit GS kommt es in weiterer Folge zu einer genetischen Mutation im Genpromotor für die UGT1A1, die für die Synthese von hepatischer Uridin-Diphosphat-Glucuronosyltransferase verantwortlich ist. Der Polymorphismus im Genpromotor dieses Enzyms resultiert schließlich in einer verminderten Aktivität. In weiterer Folge kommt es durch die verminderte hepatische Bilirubin Exkretion zur Akkumulation von freiem Bilirubin im Blut (Bosma et al., 1995; Wagner et al., 2015).

Sich wiederholende Thymidin – Adenin (TA) Polymorphismen in der TATA Box des UGT1A1 Promotors beeinflussen die Genexpression wesentlich.

Normalerweise besitzen Individuen die ursprüngliche Form der TATA Box (A(TA)<sub>6</sub>TAA) oder die Variante A(TA)<sub>5</sub>TAA, die beide eine erhöhte UGT1A1 Transkription aufweist. Allerdings führt eine homozygote Einsetzung eines weiteren TA zu einer verminderten Genexpression (Mackenzie et al., 2010).

Die TATA-Box Variante UGT1A1\*28, die sich vor allem durch das Vorkommen von 7 TA's auszeichnet, wird bei Kaukasiern hauptverantwortlich für die Entstehung des Gilbert's Syndromes gemacht. Dieser Polymorphismus führt zu einer 70% Reduktion der UGT1A1 Expression und ist somit Ursache der erhöhten UCB-Konzentrationen (Strassburg et al., 2008).

Diese harmlose aber ungewöhnliche Variante wird in den letzten Jahren immer häufiger mit einem verminderten Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen bei Menschen mit GS in Verbindung gebracht. Der Schutz von Lipiden, Proteinen und anderen Makromolekülen vor Oxidation durch die erhöhten Konzentrationen von freiem Bilirubin gehören zu den am meisten akzeptierten und anerkannten Mechanismen in dieser Population (Bulmer et al., 2013).

## **2.4 Physiologische Relevanz von Bilirubin**

in den letzten Jahren verdichteten sich zunehmend die Hinweise, dass ein erhöhter Bilirubin Spiegel nicht nur vielfältige positive Wirkungen auf die Gesundheitsförderung, sondern auch hinsichtlich der Prävention von Krankheiten haben kann (Bulmer et al., 2013).

In einer großen, von Temme et al. durchgeführten Population Studie von 2001 wurde der Zusammenhang des Serumbilirubins mit Gesamtmortalität, sowie Mortalität durch kardiovaskuläre Ereignisse und Krebs über einen Zeitraum von 10 Jahren bei 5460 Männern und 4843 Frauen beschrieben. Dabei kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass Männer mit einem erhöhten Plasmabilirubin ( $\geq 0,6$  mg/dL;  $10,3$   $\mu$ mol/L) ein geringeres Risiko für Gesamt- als auch Krebsmortalität (RR=0,73 und RR=0,43) im Vergleich zur Gruppe mit niedrigem

Plasmabilirubin ( $\leq 0,2$  mg/dL;  $3,4$   $\mu\text{mol/L}$ ) aufwiesen. Das Risiko für die Krebsmortalität fiel linear mit einer ansteigenden Bilirubinkonzentrationen im Blut (Temme et al., 2001).

Diese Beziehung wurde auch von der U.S. National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) Studie bestätigt. Hierbei wurde auf ein repräsentatives Kollektiv von 4303 Teilnehmern über 60 Jahre zurückgegriffen, die bei der NHANES Studie teilgenommen hatten und über 4,5 Jahre betreut wurden. Obwohl die Konzentration von  $0,7$  mg/dL ( $12$   $\mu\text{mol/L}$ ) bei den Teilnehmern nicht überschritten wurde kam man zu dem Ergebnis, dass es eine negative Korrelation zwischen Gesamtmortalität und einem leicht erhöhtem Plasmabilirubin gibt (Ong et al., 2014).

Wagner et al. zählen Bilirubin zu einem aufkommenden Biomarker in Zusammenhang mit Krankheitsresistenzen, dessen Hintergrund in der biologischen Vielfalt dieses Tetrapyrrols liegt. Gegensätzlich zu früheren, gesundheitsschädlichen Ansätzen, spricht man heutzutage von einer Änderung des Images von Bilirubin und prognostiziert eine gesundheitsfördernde Wirkung bei Erwachsenen in vielerlei Hinsicht (Wagner et al., 2015).

Am weitesten verbreitet ist dabei die Annahme, dass Bilirubin ein potentes Antioxidans darstellt, welches oxidative Einflüsse sowie reaktive Sauerstoffspezies und freie Radikale im Körper abfängt. Darüber hinaus werden noch anti-mutagene, anti-inflammatorische, anti-kanzerogene und vaso-protective Eigenschaften diskutiert (siehe Abbildung 6).

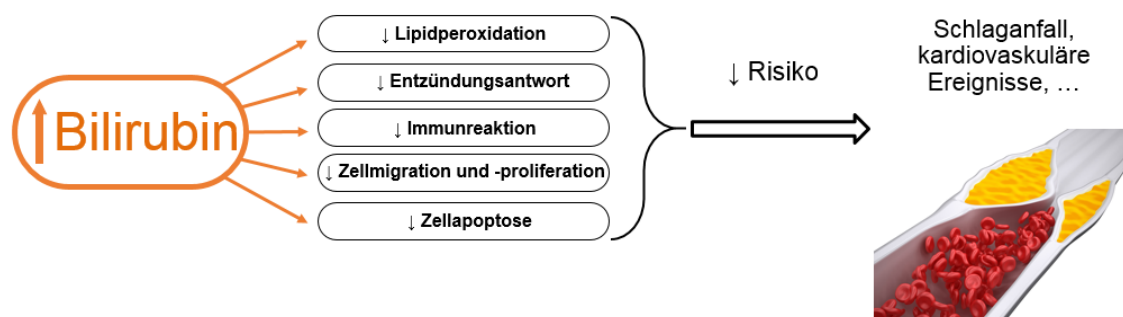


Abbildung 6: Vasoprotektive Effekte von Bilirubin, modifiziert nach Targher, 2014

Die umfangreiche Datenlage der letzten Jahre lässt darauf schließen, dass die Gesamtheit der positiven Aspekte von leicht erhöhten Serumbilirubinkonzentrationen auf physiologischer Ebene zu einem verminderten Auftreten von chronischen Erkrankungen, kardiovaskulären Ereignissen, sowie der Beeinflussung der Entstehung von Krebs, Typ 2 Diabetes und der Gesamtmortalität führt (Bulmer et al., 2008a; Horsefall et al., 2013; Vitek, 2012).

Insofern stellt das Abbauprodukt Bilirubin einen wichtigen Biomarker dar, welcher aus medizinischer Sichtweise für die Risikobewertung der Entstehung und dem Auftreten von chronischen Erkrankungen, auch im Alter, herangezogen werden könnte, obwohl aus aktuellem Standpunkt die genauen Mechanismen dahinter noch nicht geklärt sind (Wagner et al., 2015).

#### **2.4.1 Anti-oxidative Eigenschaften von Bilirubin**

Freie Radikale sind Moleküle, die in ihren äußeren Orbital ein einzelnes, ungepaartes Elektron aufweisen. Als Beispiele für Radikale gelten unter anderem Wasserstoff ( $H^*$ ), Stickstoffmonoxid ( $NO^*$ ) oder das Hydroxylanion ( $*OH$ ). Diese Radikale besitzen unterschiedliche Reaktivität und verursachen aufgrund ihrer Instabilität eine nicht-enzymatische Oxidation von anderen Biomolekülen, wie zum Beispiel Proteinen, Kohlenhydraten, Lipide und Nukleinsäuren (Cannizzo et al., 2011).

Oxidativer Stress ist das Resultat einer unausgeglichene Balance zwischen der Bildung und dem Abbau (Scavenging) von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Dabei kommt es bei älteren Zellen zu einem erhöhten Anteil von ROS im Vergleich zu jüngeren Zellen (Kim und Park, 2012).





Replikation der DNA, der Zellproliferation, der Signalübertragung und auch anti-mikrobiellen Reaktionen des Immunsystems. Dieselben Verbindungen können in unserem Körper zur Veränderung von DNA, Proteinen und Lipiden beitragen und so die Entstehung von Krebs, Tumoren, chronischen Entzündungen und auch den Alterungsprozess begünstigen (Stocker, 2004).

Der Abbau von Häm sowie die daraus resultierende Bilirubinsynthese stellen wichtige Elemente in Bezug auf die anti-oxidativen Abwehrfunktionen der Zellen dar, wie in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt ist (Bergman et al., 2015).

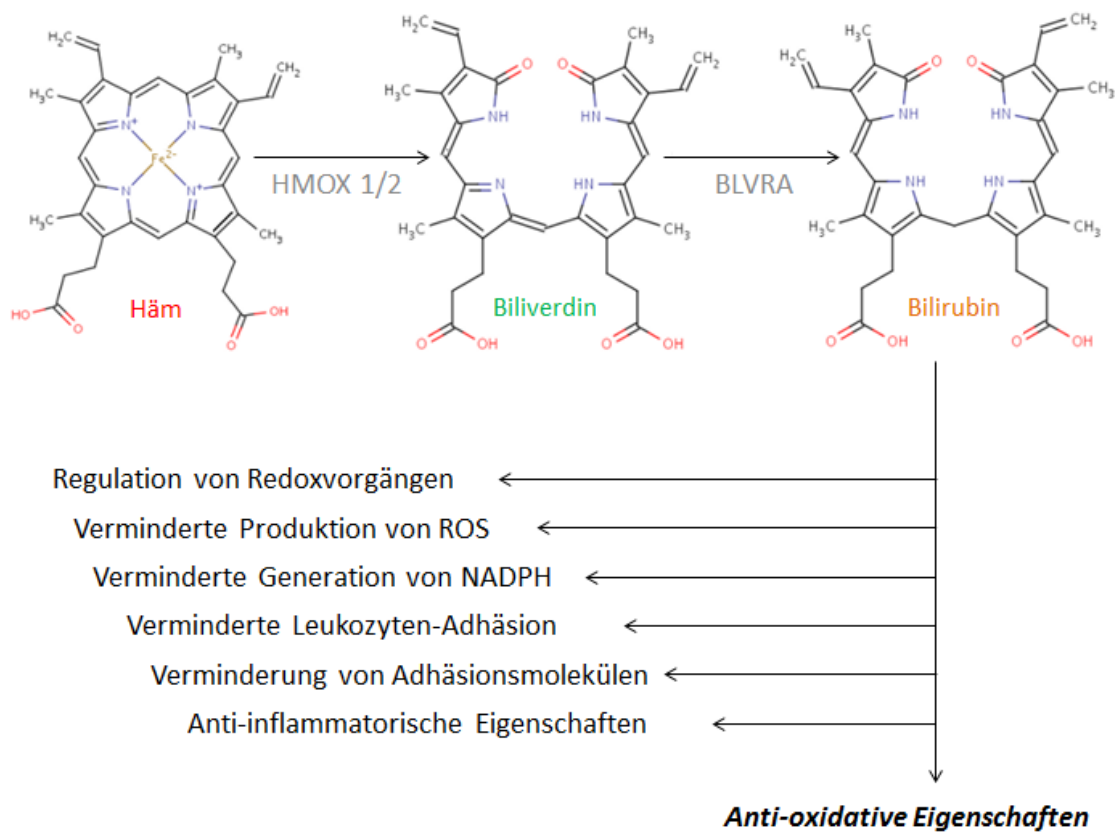
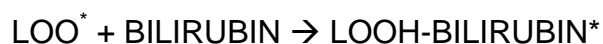


Abbildung 8: Anti-oxidative Eigenschaften von UCB, modifiziert nach Bergmann et al., 2015

Stocker führt dabei weiter die anti-oxidative Wirkung von Bilirubin auf das ausgedehnte, konjugierte Doppelbindungssystem und der reaktiven Wasserstoffatome zurück, die durch Abspaltung und Anlagerung an ein entsprechendes Radikal ihre anti-oxidative Aktivität abrufen (Stocker, 2004).



Durch exakt diesen radikalabfangenden Mechanismus wird in weiterer Folge auch der anti-atherogene Effekt von Bilirubin beschrieben. Die Moleküleigenschaften von Bilirubin veranlassen es, dass die oxidative Modifikation von Lipoproteinen nicht voranschreiten kann und verhindern somit effektiv die Lipidperoxidation (siehe Abbildung 9) und unter anderem die Oxidation von LDL-Cholesterin und damit die Entstehung von Arteriosklerose (Vitek und Schwertner, 2007).

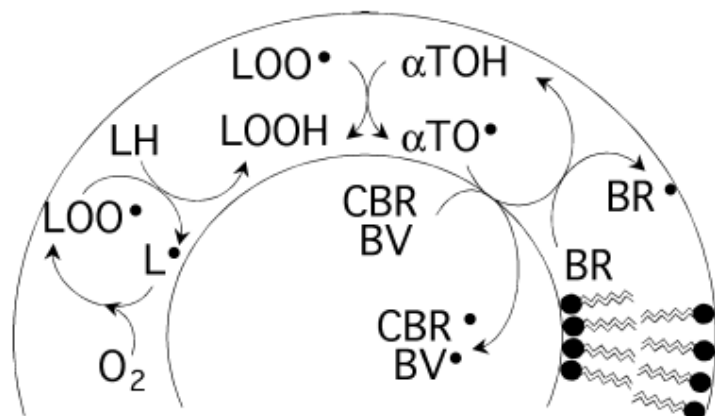


Abbildung 9: Schutz vor Lipidperoxidation durch UCB nach Stocker, 2004

Ein weiterer wichtiger Aspekt von Bilirubin ist die ähnliche anti-oxidative Aktivität wie Ascorbat. Obwohl die meisten Antioxidantien (wie z.B.  $\alpha$ -Tocopherol) nur wirksam gegenüber 1e-Oxidantien sind, gelten sowohl Bilirubin als auch Ascorbat als sehr effektive 2e-Oxidantien Radikalfänger. Dazu zählen in weiterer Folge Singulett Sauerstoff ( $O_1$ ), Hypochlorsäure, Quinone und Peroxynitrite (Stocker, 2004).

Sedlak et al. erweiterten 2009 die Ansichten gegenüber Bilirubin und deklarierten es als stark wirksames Antioxidans, wobei eine UCB-Konzentration von 10 nM (entspricht  $0,01\mu\text{mol/l}$ ) die Zellen vor einer 10 bis 100fach höheren Konzentration von  $H_2O_2$  schützen kann (Sedlak et al., 2009).

Diese enorme anti-oxidative Fähigkeit und Effektivität des Bilirubins steht im Verdacht durch die zyklische Konversion von Bilirubin und Biliverdin gesteigert

zu werden, und zwar durch die Reduktion von BV zu BR durch die BVDRT und die Oxidation von BR zu BV durch lipophile ROS (Sedlak und Snyder, 2004).

Dieses Phänomen wurde bei Personen mit Gilbert's Syndrome verstärkt beobachtet. Bulmer et al. fanden heraus, dass oxidative Stressmarker bei Personen mit Gilbert's Syndrome vermindert sind. Die Autoren schließen dabei auf einen, durch dieses Syndrom hervorgerufenen, erhöhten Bilirubin Spiegel, weiter resultierend in einer erhöhten anti-oxidativen Kapazität (Bulmer et al., 2008a).

Bilirubin gilt weiterführend auch als potentieller Inhibitor der Superoxid-Produktion aus den Mitochondrien mittels Unterdrückung der mitochondrialen NADPH-Oxidaseaktivität. Diese Eigenschaft wird vermehrt mit der Verbesserung der oxidativen Stresssituation in Verbindung gebracht und betrifft darüber hinaus viele intrazelluläre Stoffwechselmechanismen, die durch ROS reguliert werden (Datla et al., 2007).

Tabelle 1 zeigt in diesem Zusammenhang weitere mögliche anti-oxidative Eigenschaften des Bilirubins auf.

Tabelle 1: Anti-oxidative Eigenschaften von UCB nach Wagner et al., 2015

<b>Bilirubin und oxidativer Stress</b>
→ ↑ Totalen anti-oxidativen Kapazität
→ ↓ LDL-C Oxidation
→ ↓ Produktion von advanced glycation end-products (AGE's)
→ ↓ Produktion von Superoxiden via NADPH Oxidase Hemmung

#### 2.4.2 Anti-inflammatorische Eigenschaften von Bilirubin

Entzündungsreaktionen werden immer häufiger als Schlüsselprozesse betrachtet, die eine Vielzahl von Risikofaktoren für die Entstehung

arteriosklerotischer Ereignisse mit der Veränderung der Arterien in Verbindung bringen (Libby et al., 2009).

Da Bilirubin entzündungsfördernde Prozesse auf mehreren Ebenen ihrer Entstehung beeinflusst, gibt es Hinweise, dass die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Bilirubin zu einem verringerten Auftreten und somit zum Schutz vor Arteriosklerose führen können (Wagner et al., 2015).

Es wurde in weiterer Folge nachgewiesen, dass Bilirubin die Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten moduliert, verantwortlich für die Erweiterung von T-regulatorischen Zellen ist und darüber hinaus die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin (IL) -1 $\beta$  oder IL-6, verhindert. Diese Zytokine sind für die Produktion des C-reaktiven Proteins (CRP) durch die Leber verantwortlich. Aus diesem Grund erscheint es plausibel, dass erhöhte Serum-Bilirubinkonzentrationen mit verminderten CRP-Konzentrationen, welche ein pathogener Faktor für Arteriosklerose darstellen, assoziiert werden (Haga et al., 1996; Rocuts et al., 2010; Wallner et al., 2013b).

Deetman et al. untersuchten die anti-oxidativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften von Bilirubin bei Personen mit und ohne metabolischem Syndrom und versuchten einen Zusammenhang zwischen Serum Amyloid A (SAA) sowie dem hoch-sensitiven C-reaktivem Peptid (hs-CRP) zu beschreiben. In ihrer Forschungsarbeit von 2013 fanden sie heraus, dass die UCB-Konzentrationen bei Personen mit metabolischem Syndrom im Vergleich zu den Kontrollpersonen erniedrigt waren (MetS UCB= 9  $\mu$ mol/L vs nonMetS UCB= 11  $\mu$ mol/L; p= 0,013). Darüber hinaus wiesen die Probanden mit Metabolischem Syndrom erhöhte Werte von hs-CRP (MetS 1,97 mg/mL vs nonMetS 1,03 mg/mL; p= 0,001) sowie SAA (MetS 1,76 mg/L vs nonMetS 1,25 mg/L; p= 0,002) auf. Darüber hinaus gab es eine negative Korrelation zwischen UCB und hs-CRP ( $r = -0,203$ , p= 0,008), unabhängig vom Vorhandensein des metabolischen Syndroms oder Typ 2 Diabetes. Somit kamen die Autoren zu dem Schluss, dass eine niedrige UCB-Konzentration mit dem vermehrten

Auftreten von leichtgradigen Entzündungsreaktionen einhergeht (Deetman et al., 2013)

Wallner et al. kamen 2013 im Zuge ihrer Forschungsarbeiten mit Probanden mit GS zu den Ergebnisse, dass sie im Vergleich zur angepassten Kontrollgruppe hinsichtlich der Entzündungsparameter signifikante Unterschiede aufwiesen: IL-6 Konzentrationen unterschieden sich signifikant zwischen den Gruppen (GS: 0,75 pg/ml vs Kontrolle: 1,19 pg/mL;  $p < 0,05$ ) und auch hinsichtlich des SAA konnte ein Trend beobachtet werden (GS: 3,51 mg/L vs Kontrolle: 4,08 mg/L) (Wallner et al., 2013b).

Bilirubin agiert ebenso als Immunmodulator, der die Entzündungsreaktion in Anwesenheit von Entzündungsmediatoren erhöht. So kamen Bisht et al. in ihrer Studie von 2014 zu dem Schluss, dass Bilirubin mit einer erhöhten Entzündungsreaktion gegenüber Lipopolysaccherriden (LPS), die für die Produktion von entzündungsfördernde Zytokine verantwortlich sind, in Zusammenhang steht. Bilirubin ist dabei positiv mit dem Auftreten des IL-1 Rezeptor Antagonist und der Interferon  $\gamma$  Gene Expression der Leukozyten assoziiert (Bisht et al., 2014).

Abbildung 10 zeigt in weiterer Folge, wie eine erhöhte Konzentration von UCB durch vielfältige Wirkungsweisen zu einem verminderten Auftreten von Thrombosen und kardiovaskulären Ereignissen, unter anderem durch die Verminderung von pro-inflammatorischen Einflüssen, beiträgt (Kundur et al., 2015)

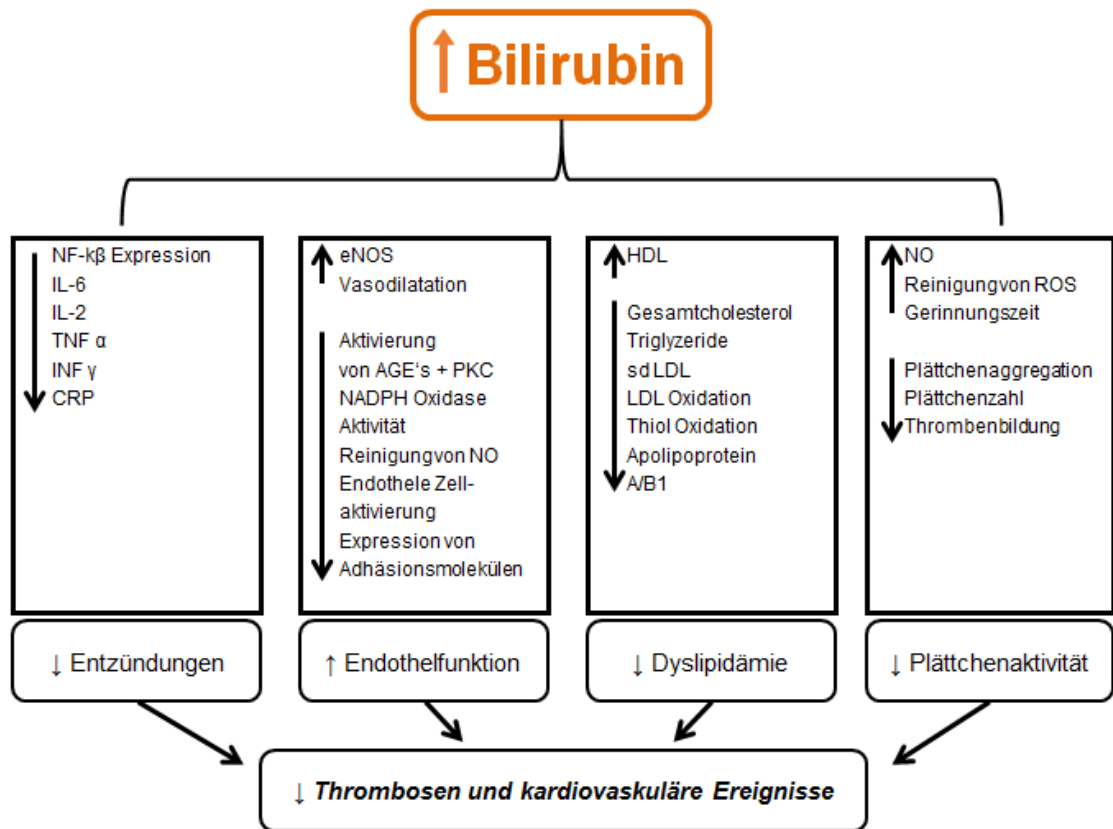


Abbildung 10: Protektive Faktoren von UCB, modifiziert nach Kundur et al., 2015

### 2.4.3 Anti-karzerogene Eigenschaften von Bilirubin

Der Zusammenhang zwischen Bilirubin und dem Auftreten von Krebs ist ein verhältnismäßig weitaus unerforschteres Gebiet als die in dieser Arbeit bisher behandelten Themen. Nichtsdestotrotz wurden in letzter Zeit immer wieder Erkenntnisse hinsichtlich der positiven Eigenschaften von Bilirubin in Bezug auf das verminderte Auftreten von kanzerogenen Ereignissen gewonnen (Wagner et al., 2015).

Eines dieser Erkenntnisse ist der von Temme et al. 2001 erläuterte Zusammenhang zwischen erhöhten Plasma Bilirubinkonzentrationen und der erniedrigten Krebssterblichkeitsrate, in der von ihnen getesteten belgischen Studienpopulation, die zu Beginn dieser Arbeit schon erwähnt wurde (Temme et al., 2001).

Zucker, Horn und Sherman führten 2004 im Zuge der dritten NHANES Studie die Erkenntnisse über Bilirubin innerhalb der amerikanischen Bevölkerung weiter fort und kamen zu den Ergebnissen, dass Bilirubin negativ mit dem Auftreten von Kolonrektalkrebs (CRC) assoziiert wird. Die Autoren vermerkten dabei, dass jede Erhöhung der Serum UCB-Konzentration um 1 mg/dL das Risiko an KRK zu erkranken signifikant verminderte (OR = 0,257) (Zucker et al., 2004).

Jiraskova et al. untersuchten in weiterer Folge den Effekt der Promotor-Variationen der HMOX1 sowie der UGT1A1 Gene und der UCB-Konzentration hinsichtlich des Risikos für Kolonrektalkrebs. Dabei kamen sie zu den Resultaten, dass bei Personen mit CRC eine erniedrigte UCB-Konzentration im Serum im Vergleich zu den Kontrollpersonen vorlag. Die Autoren fassten den Schluss, dass jede Verminderung der UCB-Konzentration um 1 µmol/L bei beiden Geschlechtern mit einem um 7% erhöhten Risiko an KRK zu erkranken einhergeht (Jiraskova et al., 2012).

Zhang et al. erforschten 2013 den Zusammenhang zwischen Rauchen und UCB-Konzentrationen. Im Zuge ihrer Auswertungen kamen die Autoren zu dem Schluss, dass die UCB-Werte als das stärkste Anzeichen für das Auftreten von Lungenkrebs und die daraus resultierende Sterblichkeit fungieren (Zhang et al., 2013).

O'Mally et al. haben in diesem Zusammenhang eine Studie mit Rauchern und abstinenten Rauchern über einen Zeitraum von 6 Wochen in Hinblick auf die UCB-Konzentration durchgeführt. Sie kamen zu dem Schluss, dass Personen, die über diesen 6-wöchigen Zeitraum kontinuierlich abstinent waren, eine signifikante Erhöhung der UCB- als auch Gesamtbilirubinkonzentration im Vergleich zu ihren rauchenden Pendants aufwiesen (Raucher: 0,02 mg/dL vs. Nicht-Raucher: 0,06 mg/dL;  $p= 0,015$ ). Somit beschrieben die Autoren einen Zusammenhang zwischen einer Lebensstilmodifikation im Sinne einer Rauchabstinenz und einer Erhöhung der UCB-Werte und somit auch mit einer verminderten Krebsinzidenz bzw. Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse (O'Mally et al., 2014).

Weiterführend kamen Wen et al. 2015 im Zuge ihrer prospektiven Kohorten-Studie zu dem Schluss, dass eine verminderte Serum UCB-Konzentration mit einem höheren Risiko für das Auftreten von Lungenkrebs und dadurch verursachte Sterblichkeit bei männlichen Rauchern assoziiert ist. Sie führten ihre Ergebnisse dahingehend aus, dass Raucher mit einem erniedrigten Bilirubinspiegel ( $< 0,75$  mg/dL) ein bis zu 66% höheres Risiko für Lungenkrebs und damit verbundene Sterblichkeit aufwiesen als Raucher mit einem erhöhten UCB-Spiegel ( $> 1$  mg/dL). Die Autoren kolportierten für die Verminderung der UCB-Konzentration um  $0,1$  mg/dL ein um 5 - 6% erhöhtes Risiko für das Auftreten von Lungenkrebs (Wen et al., 2015).

Die genauen Mechanismen, die in weiterer Folge für die anti-karzinogenen Effekte verantwortlich sind, sind bis dato noch nicht genauer geklärt und bedürfen noch weiteren Handlungsbedarf. Allerdings könnte das erhöhte anti-oxidative sowie anti-inflammatorische Potential von leicht erhöhten Bilirubinkonzentrationen im direkten Zusammenhang mit den anti-karzinogenen Effekten und somit der erniedrigten Krebsinzidenz stehen.

#### **2.4.4 Alterungsprozess**

Unter dem Begriff „Altern“ findet man in der Literatur viele und vor allem unterschiedliche Definitionen. Vom soziologischen Standpunkt aus sieht man „Altern“ als den Übergang vom Berufsleben in den Ruhestand, wobei aus medizinischer Sicht verschiedene Alterserscheinungen definiert werden. Grundsätzlich gehört an dieser Stelle erwähnt, dass die Gruppe der älteren Bevölkerung aufgrund diverser Unterschiede bezüglich Lebens- und Gesundheitssituation, aber auch durch physische und psychische Leistungsfähigkeit sehr heterogen sind (BMGF, 2013; [7]).

Darüber hinaus ist der Alterungsprozess individuell sehr unterschiedlich, hängt von unterschiedlichen Lebensphasen ab und findet auf verschiedenen Ebenen,



wie zum Beispiel auf physiologischer, kognitiver oder sozialer Ebene statt (Schwager, 2012).

Slijepcevic definiert den Umstand „Altern“ ebenso als mehrfaktoriellen Prozess, der die komplexen Wechselwirkungen von biologischen und molekularen Mechanismen miteinschließt (Slijepcevic, 2008).

Nigam et al. beschreiben das Altern als einen unausweichlichen und sehr komplexen, multikausalen Vorgang, der durch den zunehmenden Abbau von Organen und Geweben charakterisiert wird. Der Prozess ist größtenteils durch die Genetik determiniert und wird durch eine Vielzahl von Umweltfaktoren, wie zum Beispiel Ernährung, körperliche Betätigung, dem Aussetzen gegenüber Mikroorganismen, Verunreinigungen aller Art oder Strahlung beeinflusst (Nigam et al., 2012)

Weiterführend gibt es auch geschlechterspezifische Unterschiede, so nimmt mit zunehmendem Lebensalter der Frauenanteil in der Bevölkerung zu. Das hat jedoch auch zur Folge, dass das Auftreten von Erkrankungen, Gebrechen und Behinderungen durch das fortgeschrittene Alter erhöht ist. Männer sterben im Allgemeinen zwar früher, erkranken jedoch nicht so häufig wie Frauen (Perrig-Chiello, 2007). Dieses Phänomen führen 2008 auch Knight und Nigam weiter aus und berichten, dass Frauen in Entwicklungsländern Männer 7 bis 10 Jahre überleben (Knight und Nigam, 2008).

Der Alterungsprozess an sich stellt ein natürliches und von vielen Faktoren abhängiges Phänomen dar, der durch Veränderungen und Schäden innerhalb molekularer Mechanismen charakterisiert wird. Diese Schäden und Veränderungen beeinträchtigen in weiterer Folge die Zell- und Gewebefunktionen (Bratic und Larsson, 2013; Kirkwood, 2005).

Der voranschreitende Alterungsprozess äußert sich aus der immunologischen Sichtweise in einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit erhöhter Morbidität und Mortalität. Diese Infektionen gelten bei Personen mit fortgeschrittenem Alter als Resultate von gestörten Stoffwechselforgängen, wie der verminderten phagozytären Kapazität, der verminderten Synthese von

reaktiven Sauerstoffintermediaten sowie einer beeinträchtigten intrazellulären Abbaueffizienz der Neutrophilen (Oliveria et al., 2010).

Es gibt eine Vielzahl an Theorien die den Alterungsprozess zu charakterisieren und zu beschreiben versucht. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist die „Aufdeckung“ dieses Prozesses noch niemanden vollständig gelungen. Betrachtet man in weiterer Folge den Bereich der molekularen Genetik, so werden veränderte Proteine, somatische Mutationen oder verkürzte Telomere in Zusammenhang mit dem Altern gebracht. Im Bereich der Biochemie gibt es die Theorie der freien Radikale und der metabolischen Raten (Oliveria et al., 2010).

Da der Alterungsprozess ein sehr umfangreiches und komplexes Thema darstellt, wird im Laufe der vorliegenden Arbeit das Phänomen Altern nur in seinen Grundelementen behandelt bzw. nur sofern aufgearbeitet, dass der Zusammenhang mit Bilirubin und dessen positiven Eigenschaften im Zuge des Alterungsprozess besser verstanden werden können.

Zu den aktuellsten und umfangreichsten Theorien, die gegenwärtig behandelt werden, zählt unter anderem die der freien Radikale. Diese deutet darauf hin, dass sich mit zunehmendem Alter auch die Zahl der oxidativen Biomoleküle, die sich mit freien Radikalen verbinden, zunimmt und somit vermehrt ROS bilden. Die in diesem Prozess gebildeten Moleküle akkumulieren über die gesamte Lebensdauer und führen im hohen Alter zu einem chronischen Zustand von erhöhtem oxidativen Stress (Harman, 2001, Oliveira et al., 2010).

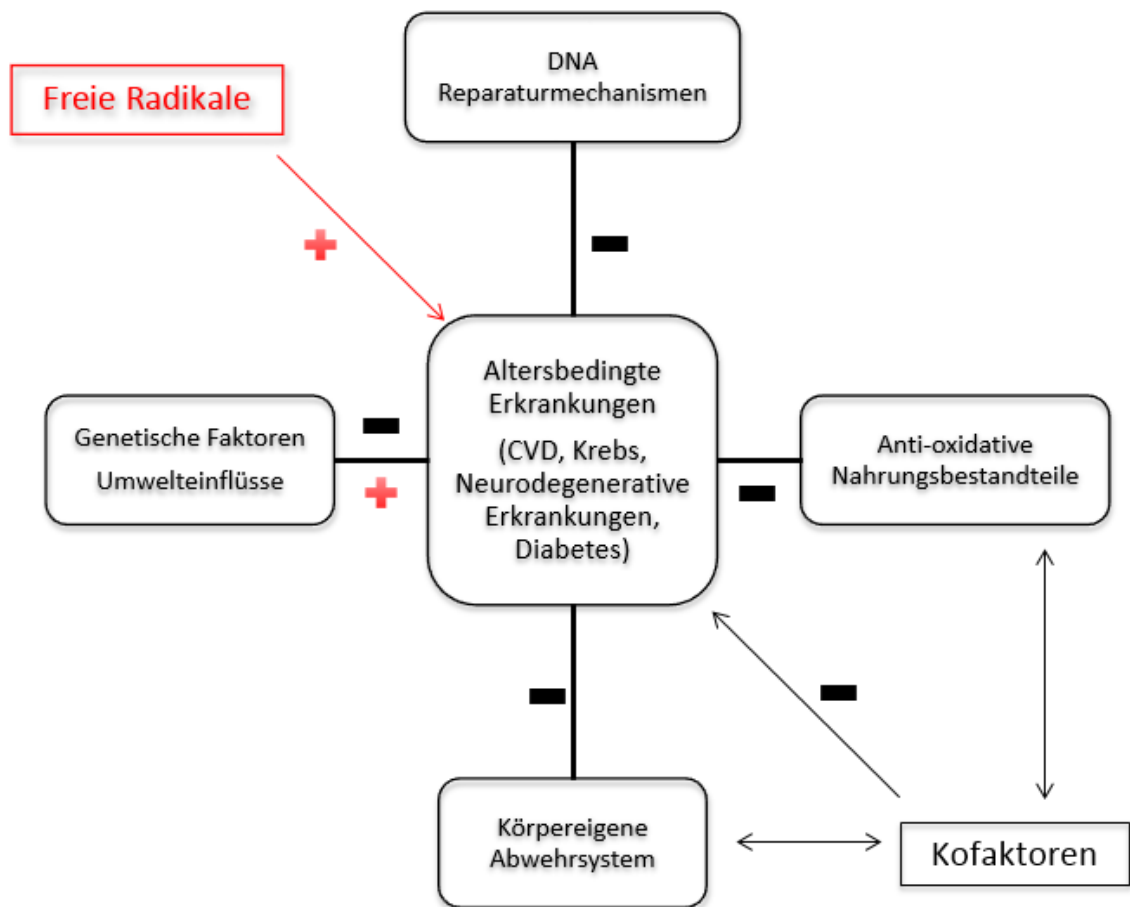


Abbildung 11: Zusammenhang von freien Radikalen und dem Alterungsprozess; modifiziert nach Rahman, 2007

Rahman erwähnt in diesem Zusammenhang die Wichtigkeit bezüglich des Zusammenspiels von freien Radikalen, Antioxidantien und auch deren Kofaktoren, um Gesundheit im fortgeschrittenen Alter aufrechtzuerhalten (Abbildung 11). Kommt es zur einer Belastung von freien Radikalen, die die protektiven Effekte der anti-oxidativ wirksamen System im Körper übersteigt, kann das zu oxidativen Schäden führen, die über den Lebenszyklus akkumulieren und so den Alterungsprozess und altersbedingte Erkrankungen vorantreiben (Rahman, 2007).

Während des Alterungsprozesses kommt es zu biochemischen Dysbalancen zwischen der Bildung und der Abwehr von freien Radikalen, besser bekannt als oxidativer Stress. Dieser erhöhte Anteil von hochreaktiven und instabilen

Verbindungen führt in weiterer Folge zu oxidativen Proteinveränderungen, die sich über längeren Zeitraum hinweg vergrößern und bis zum zytotoxischen Zelltod führen können (Cannizzo et al., 2011).

Freie Radikale spielen aber nicht nur bei der Schädigung von Zellen eine wichtige Rolle, sondern nehmen auch eine zentrale Funktion bei intrazellulären Signal- und Regulationsvorgängen ein (Oliveira et al., 2010).

Ein weiterer wichtiger Aspekt in Zusammenhang mit dem Alterungsprozess stellt das „Inflammaging“ (Entzündungsaltern) dar. Bei diesem Phänomen kommt es zu einem altersbedingten Anstieg von entzündungsfördernden Peptidbiomarkern (Interleukin-6, Interleukin 1 $\alpha$ , Tumor necrosis factor  $\alpha$ ) sowie dem CRP (Francesci et al., 2000).

Eine Konzentrationserhöhung der soeben angeführten pro-inflammatorischen Zytokinen im Plasma wird mit einer verminderten Handgriffstärke sowie einer verminderten Ganggeschwindigkeit bei älteren Personen assoziiert und demonstriert den Zusammenhang zwischen Immun- und Funktionsstatus (Visser et al., 2002).

Zur gegenwärtigen Lage steht allerdings noch nicht fest ob der erhöhte Entzündungsstatus, der im Zuge des Alterns beobachtet wird, für die Entwicklung von chronisch-degenerativen Erkrankungen verantwortlich ist oder die chronische Erkrankung den Entzündungsstatus im Alter determiniert (Cannizzo et al., 2011).

Wichtig erscheint in diesem Zusammenhang jedoch, dass oxidativer Stress per se eine wichtige Rolle hinsichtlich Determinierung und Aufrechterhaltung der geringfügig erhöhten Entzündungswerte, die innerhalb des Alterungsprozesses und altersbedingten Erkrankungen beobachtet werden können, spielt (De la Fuente und Miquel, 2009).

Grundsätzlich gibt es zwei Wege, wie durch Radikale verursachter oxidativer Schaden zu entzündlichen Reaktionen im Körper führen kann: einerseits über

Toll-like-Rezeptoren (TLRs), andererseits über die Nalp-3 Inflammasome (Cannizzo et al., 2011)

TLRs sind eine Familie von allgegenwärtig exprimierten Rezeptoren, die für die Immunantwort gegenüber Pathogenen von zentraler Bedeutung sind. Bindet sich ein TLR an ein *pathogen associated molecular pattern* Molekül (PAMP's) aktiviert dies eine abgestimmte, angeborene Immunantwort, um dieses Pathogen zu inaktivieren. Allerdings können diese Rezeptoren auch durch eigene, in Folge einer Verletzung vom Körper produzierte Moleküle aktiviert werden. Nach Gewebenekrosen bzw. einer erhöhten ROS Produktion können die resultierenden Moleküle, in diesem Fall das Heat-Shock Protein bzw. oxidierte Lipoproteine, in weiterer Folge den TLR-8 oder TLR-2 Rezeptor aktivieren. Dieser Aktivierung führt zur Initiierung einer Entzündungsreaktion, deren Schlüsselmediatoren IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  darstellen (Gill et al., 2010).

Bei älteren Personen wird häufig eine erhöhte Konzentration dieser pro-inflammatorischen Zytokine, einerseits in der gesamten Blutlaufbahn, andererseits in Makrophagen im Gewebe beobachtet. Diese nehmen exponentiell bei übergewichtigen Personen zu, da diese vorwiegend in den Fettgewebismakrophagen vorkommen und als Reservoir dienen (Bruunsgaard et al, 2001).

Der zweite Mechanismus, um eine Entzündungsreaktion herbeizuführen, stellt die Aktivierung von Inflammasomen dar. Diese stellen einen Multiproteinkomplex im Zytosol dar, der die Fähigkeit besitzt, pro-IL6 und pro-IL18 in aktive Zytokine enzymatisch umzuwandeln. Zu diesen Inflammasomen gehört das Nalp3 Inflammasom, welches durch die Anwesenheit von ausreichenden Mengen von ROS aktiviert wird. Sowohl die TLR-Rezeptoren als auch das Nalp3 Inflammasom gehören zu den *Damage associated molecular pattern (DAMP's)* Molekülen und verbinden auf diesem Weg oxidative Schäden mit chronischen Entzündungsreaktionen, wie sie häufiger bei älteren Personen beobachtet werden (Zhou et al., 2010).

Deswegen stellt Altern den größten Risikofaktor für alle nicht übertragbaren Erkrankungen, wie kardiovaskuläre Krankheiten, Krebs, Diabetes und neurologische Erkrankungen, dar. Zu den diskutierten Hauptursachen, die den Alterungsprozess schlussendlich auslösen bzw. vorantreiben, zählen die Schädigung der DNA, Veränderungen der Genexpression, Genotoxizität, oxidativer Stress und das Auftreten von verkürzten Telomeren (Wagner et al., 2016).

Darüber hinaus gehört an dieser Stelle erwähnt, dass es im Laufe des Alterungsprozesses sowohl zu Veränderungen im Stoffwechsel als auch im Hinblick auf die Körperzusammensetzung kommt. Zu den Hauptveränderungen, die während des Alterns auftreten, zählen unter anderem Stoffwechselprozesse und anatomische Bedingungen, die in Tabelle 2 aufgelistet sind:

Tabelle 2: Physiologische Veränderungen im Alter nach Elmadfa und Leitzmann, 2004

---

### **Veränderungen in Alter**

---

#### **Verminderte Energieverbrauch:**

- Rückgang des Grundumsatzes
- Verminderung der körperlichen Aktivität
- Abnahme der aktiven Körpermasse
- Zunahme des Körpergewichts

#### **Verlangsamte Verdauungstätigkeit:**

- Abnahme der Speichelbildung
- Rückgang der Magensekretion
- Verminderte Fett- und Ca-Resorption
- Reduzierte Kohlenhydrattoleranz

#### **Sinkende Adaptionfähigkeit:**

- Abnehmender Geruchs- und Geschmackssinn
  - Vermindertempfinden
  - Zunehmende Kauschwierigkeiten
  - Krankheiten (Diabetes, Gicht, Bluthochdruck)
-

Als Folgen dieser altersbedingten Veränderungen des Körpers können unter anderem Veränderungen des Körpergewichts (sowohl Zu- als auch Abnahme), Mangelernährung, Sarkopenie (Verlust von Muskelmasse und Muskelkraft), Kachexie und funktionelle Veränderungen wie Gebrechlichkeit auftreten (BMGF, 2013; [7]).

Die Gesundheit und Leistungsfähigkeit der älteren Gesellschaft wird vor allem durch Herz-Kreislaufkrankungen, Krebs, Krankheiten des Magen-Darmtrakts, Ernährungs- und Stoffwechselerkrankungen, Osteoporose, Depressionen, Krankheiten des Nervensystems und der Atemwege sowie Verletzungen beeinträchtigt (BZgA, 2011).

Aus diesem Grund wird seit einiger Zeit nach akkuraten Vorzeichen gesucht, um den Beginn einer gesundheitlichen Abweichung besser sichtbar zu machen. Im Gegenzug ist es aber von gleicher Bedeutung, eine Möglichkeit zu finden, die den Alter entsprechenden Gesundheitszustand charakterisiert und aufrechterhält. Die Herausforderung stellt dabei eindeutig die Identifikation der Unterscheidung zwischen normalen, biologischem Alterungsprozess und einem negativen, nicht dem normalen Alterungsvorgängen entsprechenden Zustand dar (Wagner et al., 2016).

#### **2.4.5 Zusammenhang Altern und Bilirubin**

In den letzten Jahren hat sich Bilirubin immer mehr in den Vordergrund diverser wissenschaftlicher Arbeiten mit Hinblick auf positive Assoziationen mit der Gesundheit gedrängt.

Mittlerweile zählt es zu den neu aufkommenden Biomarkern in Bezug auf die Überprüfung der Widerstandsfähigkeit gegenüber chronischen, nicht übertragbarer Krankheiten. In diesem Zusammenhang werden leicht erhöhte Konzentrationen von Bilirubin im Blutserum stark mit einem erniedrigten Auftreten von Mortalität durch kardiovaskuläre Ereignisse und deren Risikofaktoren assoziiert. Jüngste Daten bringen Bilirubin sogar in Verbindung

mit der Gesamtmortalität und chronischen Erkrankungen, wie Krebs und Typ-2 Diabetes (Bulmer et al., 2013; Wagner et al., 2015).

Im österreichischen Ernährungsbericht von 2012 wird bei der Bewertung des anti-oxidativen Status von SeniorInnen neben Harnsäure und Albumin auch das Bilirubin angeführt. Die Konzentrationen und Kapazitäten dieser endogenen Schutzfaktoren werden bei der Bewertung von älteren Personen als Biomarker verwendet und liegen bei der österreichischen Bevölkerung innerhalb der Referenzbereiche. Senioren im Alter von 65 bis 80 Jahren wiesen dabei eine Plasma-Bilirubinkonzentration von 13,0  $\mu\text{mol/L}$ , Seniorinnen von 12,0  $\mu\text{mol/L}$  auf (Elmadfa et al., 2012).

Allerdings gibt es eine Vielzahl an Faktoren die die Konzentration von UCB im Körper beeinflussen können. Neben den oben erwähnten, genetisch bedingten Veränderungen im Genpromotor, die zu erhöhten UCB-Konzentrationen führen können, gehören auch das Rauchverhalten, das Geschlecht, Nahrungskarenz, Medikamente, das Alter, die Ethnizität und Übergewicht zu diskutierten Einflüssen bezugnehmend auf die UCB-Konzentration (Vitek und Schwertner, 2007).

Boland et al. haben 2014 im Zuge ihrer Forschungsarbeit einen Zusammenhang zwischen dem Altersprozess, der Entwicklung der UCB-Konzentration und der Mortalität dargestellt. Zu diesem Zwecke wurden 2364 Personen im durchschnittlichen Alter von 70 Jahren rekrutiert und absolvierten einen medizinischen Check, bei welchem es zur Abnahme und Auswertung von Blutproben kam. Acht Jahre später kam es zu einer weiteren medizinischen Analyse, an der ein Teil der ersten Studienpopulation (1703 Personen) teilnahm. Bei der Auswertung dieser prospektiven Kohorten Studie kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass die Serum UCB-Konzentrationen bei älteren Personen sukzessive mit fortschreitendem Alter ansteigen. Jedoch konnte die Arbeitsgruppe keinen signifikanten Zusammenhang zwischen UCB-Konzentration und einer verminderten Mortalität nachweisen. Vielmehr zog man aus den vorliegenden Resultaten den Schluss, dass die mit fortschreitendem Alter zunehmenden UCB-Konzentrationen sogar zu einer



erhöhten Gesamtmortalität führen könnten und im Alter eher negativ assoziiert sind. Die Autoren determinieren Bilirubin in weiterer Folge als Marker für voranschreitendes Alter (Boland et al., 2014).

Kim und Park führen den Alterungsprozess und die damit verbundenen pathologischen Veränderungen vor allem auf die Lipidperoxidation zurück und machen in diesem Zusammenhang auf das Scavenging-System für lipophile Substanzen aufmerksam. Der Umbau von Biliverdin zu Bilirubin stellt einen protektiven Mechanismus gegenüber lipophilen Oxidantien dar, deren Effektivität durch die Vernetzung dieses Redoxzyklus und dem interaktiven Kontrollzyklus zwischen Biliverdin und der HMOX verstärkt und so zu einem schützenden Faktor im Alter werden könnte (Kim und Park, 2012).

Wallner et al. behandelten in ihrer Studie von 2013 den Einfluss von erhöhten UCB-Konzentrationen (GS vs Kontrolle) auf den Schutz vor altersbedingten Veränderungen von Lipid- und Entzündungsbiomarker. Bei der Auswertung kamen die Autoren zu dem Schluss, dass bei genaueren Betrachtung der älteren Studienpopulation (> 30 Jahre) diese einen verminderten Lipidstatus im Vergleich zu den jüngeren Kontrollfällen auswiesen (Gesamtcholesterin, LDL-C, TAG, LDL Subfraktionen). Darüber hinaus wies die ältere Kontrollgruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen die höchsten SAA, CRP und IL-6 Konzentrationen auf. Die ältere GS Gruppe wies im direkten Vergleich signifikant erniedrigte Entzündungswerte auf (SAA und IL-6). Insofern weist diese Arbeit auf einen Trend hinsichtlich der Prävention des altersbedingten Anstiegs von Lipidbiomarkern und Entzündungsmediatoren bei Personen mit erhöhter UCB-Konzentration (Gilbert's Syndrome) hin (Wallner et al., 2013b).

Die Datenlage über Bilirubin ist umfassend, jedoch nicht unbedingt einheitlich. Darüber hinaus gibt es hinsichtlich des UCB-Verlaufs im Alter nur wenige Informationen. Es gibt vielfältige Ansichten, die einerseits die positiven Eigenschaften von Bilirubin im Alter widerspiegeln und eine geringere Mortalitätsrate (Temme et al., 2001; Ong et al., 2014) sowie vermindertes Auftreten von kardiovaskulären Ereignissen, entzündungsfördernden Mediatoren, Krebs, Arteriosklerose oder chronischen Erkrankungen beschreiben.

Auf der anderen Seite stellen Studien wie die von Boland et al. von 2014 den positiven Effekt von Bilirubin im Alter in Frage und bringen leicht erhöhte Konzentrationen von UCB mit einer erhöhten Mortalitätsrate in Verbindung.

Insofern benötigt man noch weitere und vor allem tiefere Einblicke in die vorliegenden Mechanismen, um die protektiven Effekte von UCB besser verstehen zu können. Darüber hinaus stellt der Zusammenhang von Bilirubin und dem Alterungsprozess, sowohl auf zellulärer als auch auf molekularer Ebene ein wichtiges Themengebiet dar, der noch weiter erforscht werden sollte.

## **3) Material und Methoden**

### **3.1 Studiendesign Active Ageing**

Die Grundlage dieser Masterarbeit bildet die Forschungsplattform „Active Ageing“, die 2011 gegründet wurde und deren Studie, in Zusammenarbeit mit dem Kuratorium der Wiener Pensionswohnhäuser, die Auswirkungen von Ernährung und Sport auf die Gesundheit und Mobilität von SeniorInnen untersuchte. Die Laufzeit dieser Studie betrug eineinhalb Jahre und umfasste fünf Wiener Wohnheime (Leopoldau, Atzgersdorf, Mühlengrund, Trazerberg und Hohe Warte) mit einer Probandenanzahl von 100 Personen im Alter von 65 bis 98 Jahren [6].

Mithilfe eines interdisziplinären Expertenteams aus den Bereichen der Ernährungswissenschaften, Sportwissenschaften und Pharmakognosie wurden unter anderem ernährungsphysiologische und sportmedizinische Untersuchungen durchgeführt. Um die Auswirkungen der Ernährungs- als auch Trainingsintervention auf die Gesundheit der ProbandInnen veranschaulichen zu können, wurden in weiterer Folge physiologische und biochemische Parameter mit Hilfe von molekularbiologischen und zellbiologischen Methoden analysiert.

Die Ernährungs- und Trainingsprogramme wurden speziell für die Zielgruppe angepasst und entwickelt, auch um zu testen, ob eine Verbesserung Einfluss auf die Lebensqualität und die körperlichen Parameter mit sich bringt.

Die Trainingsintervention setzte sich im Allgemeinen aus einer Mischung aus Kraft- und Ausdauertraining zusammen und wurde darüber hinaus individuell auf die ProbandInnen zugeschnitten. Grundsätzlich handelt es sich hierbei um Stabilisationsübungen, die 2-mal wöchentlich jeweils 50 Minuten mit dem eigenen Körpergewicht durchgeführt wurden. Zu Beginn der Untersuchungen wurden die ProbandInnen bei Ihrem Training von Fachkräften unterstützt. Mit Fortdauer der Studie war es unter anderem Sinn und Zweck das Bewegungsprogramm auch selbstständig zu absolvieren.

Bei der Ernährungsintervention handelte es sich um ein diätetisches Getränk, welches den SeniorInnen verabreicht wurde. Dieses enthielt vor allem Nährstoffe, welche in dieser Gesellschaftsgruppe eher als mangelhaft einzustufen sind, wie zum Beispiel essentielle Aminosäuren, Vitamin B12, Folsäure und Vitamin C. Die Wahl dieser Form der Supplementation resultiert aus dem einfachen Grund, dass eine Ernährungsumstellung in diesem Alter sehr schwierig zu realisieren ist und in dem gewählten Setting nicht durchführbar war.

Die Zuweisung der einzelnen Personen zu den 3 verschiedenen Gruppen dieser randomisierten, Beobachter-blinden und kontrollierten Interventionsstudie erfolgte zufällig und mit Zustimmung der SeniorInnen (siehe Abbildung 12):

- Krafttraining
- Krafttraining und Ernährung
- Kontrollgruppe

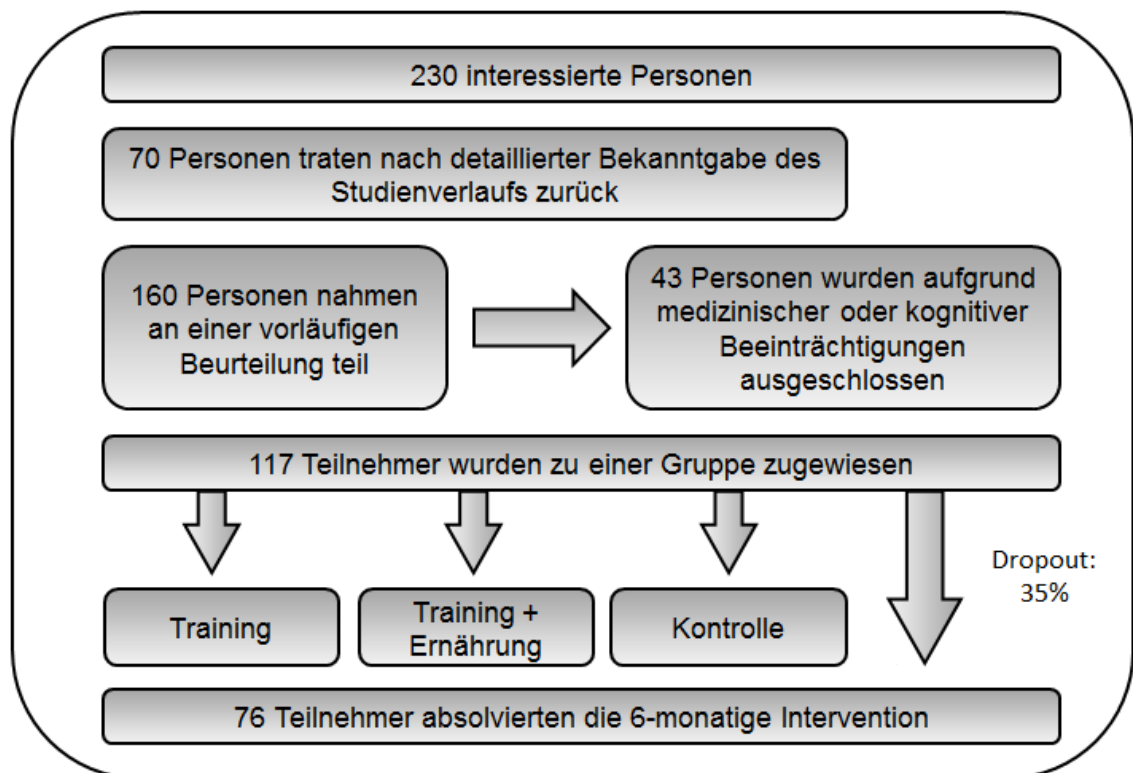


Abbildung 12: Flowchart der VAAS

Da sich oftmals ein positiver Effekt auf die Gesundheit und den physiologischen Zustand von SeniorInnen auf den Sozialisationseffekt zurückführen lässt, wurde die Kontrollgruppe als Gedächtnisgruppe geführt. Das erfolgte hauptsächlich aus dem Grund, um den sozialen Einfluss auf das Wohlbefinden in den Interventionsgruppen auszuschließen. Somit wurde der ursprüngliche Lebensstil der Kontrollgruppe beibehalten und ihre kognitiven Fähigkeiten trainiert.

### **3.2 Teilnahmekriterien**

Auswahlkriterien der Teilnehmer waren unter anderem ein Mindestalter von 65 Jahren und ein guter körperlicher und geistiger Zustand. Diese Kriterien wurden durch ein Ärzteteam bestätigt und somit wurden die Teilnehmer zur Studie zugelassen. Des Weiteren wurde ein *Mini-Mental State Test* (MMST) durchgeführt, um die kognitiven Fähigkeiten der Probanden zu messen und um sicherzugehen, dass den Anweisungen der Experten gefolgt werden kann. Ein weiteres Kriterium um die körperliche Voraussetzung zu testen, war das Gehen einer 10 Meter langen Strecke ohne Hilfsmittel. Zur weiteren Beurteilung der körperlichen Leistungsfähigkeit wurde ein *Short Physical Performance Battery* (SPPB) Test durchgeführt, bei dem die Probanden mehr als 4 Punkte erreichen mussten.

Zu den Ausschlussgründen möglicher Studienteilnehmer zählten unter anderem progrediente, chronische Erkrankungen wie kardiovaskuläre Krankheiten (z.B: unbehandelte Hypertonie, instabile Angina pectoris, Herzrhythmusstörungen, etc.), manifeste Osteoporose, die Einnahme von Antikoagulantien (z.B: Marcumar) und Glucocorticoide (wie Cortison), sowie ein bereits durchgeführtes Krafttraining (mehr als einmal pro Woche).

Des Weiteren wurden SeniorInnen, die bei mehr als 30% der Trainingseinheiten fehlten von der Studie ausgeschlossen.

Dem restlichen Studienkollektiv wurde im gesamten Untersuchungszeitraum von eineinhalb Jahren zu unterschiedlichen, vorher definierten Zeitpunkten fünf Mal Blut abgenommen:

Von den ursprünglichen 100 Probanden, die an der Studie teilnehmen sollten, haben 46 Personen bis Zeitpunkt 5 ihre Mitarbeit aus verschiedenen Ursachen beendet. Die Gründe für das Ausscheiden aus der Studie waren beispielsweise Erkrankungen wie Demenz, Krankenhausaufenthalte, Ableben oder das Beenden aus mangelnder Motivation bzw. Antriebslosigkeit.

In der nachfolgenden Abbildung sieht man die Zeitspanne der Studie sowie die unterschiedlichen Testparameter zu den verschiedenen Zeitpunkten:

Monate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Intervention	2x/Woche Training - betreut					1x betreut + 1x unabhängig						2x/Woche unabhängig							
Supplement	7x/Woche + nach dem Training						Optional												
Testzeitpunkte (ZP)	1		2				3						4						5
Anthropometrie	■		■				■						■						
Blut	■		■				■						■						■

Abbildung 13: Zeitspanne der VAAS

### 3.3 Trainingsintervention

Das bei dieser Studie angewandte Krafttraining wurde nach den Richtlinien des *American College of Sport Medicine* (ACSM) und der Österreichischen Sportwissenschaftlichen Gesellschaft (ÖSG) entwickelt und durchgeführt. Dabei handelte es sich um ein Übungsprogramm, welches in Gruppen zu je 15 Personen mit einer Dauer von 50 Minuten pro Einheit durchgeführt wurde (siehe Abbildung 14).

Die Einheiten starteten mit 10 minütigem Aufwärmen, bei dem hauptsächlich sensomotorisches Training, wie Gleichgewichts- und Balanceübungen absolviert wurde. Der anschließende Hauptteil setzte sich vermehrt mit

Stabilisationsübungen (6 - 8 verschiedene Übungen) mit eigenem Körpergewicht, Therabändern oder Stühlen zusammen, um in weiterer Folge gezielt 6 unterschiedliche Muskelgruppen zu beanspruchen. Das Training zielte speziell auf die Bein-, Rücken-, Brust-, Schulter-, Arm- und Bauchmuskulatur ab. Die vorgegebenen Übungen sollte in weiterer Folge 10- bis 15-mal wiederholt werden. Darüber hinaus sollte weiterführend auch je nach Möglichkeit die Intensität der Übungen gesteigert werden.

Der Hauptteil dauerte etwa 30 Minuten, gefolgt von einem 10 minütigen Schlussteil, der aus Entspannungsübungen bestand.

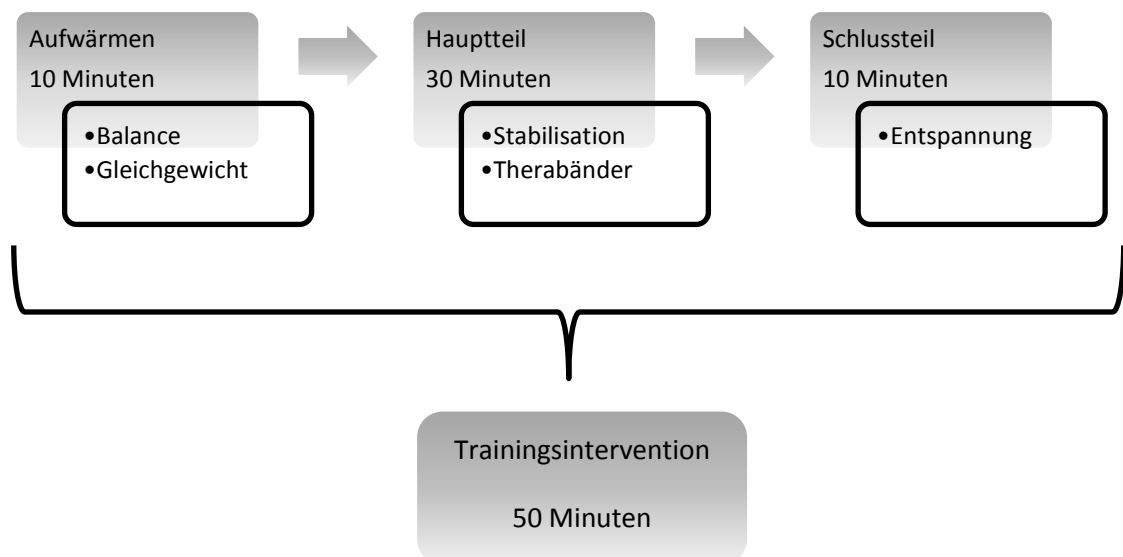


Abbildung 14: Ablauf einer Trainingseinheit

### 3.4 Ernährungsintervention

Da es bei älteren Menschen häufig zu einem beschleunigten Verlust von Muskelmasse, -kraft und -funktion kommt, ist es in weiterer Folge sinnvoll diesem sowohl mit körperlicher Betätigung als auch mit Hilfe einer gezielten Ernährungsintervention entgegenzuwirken (Cruz-Jentoft et al., 2010; Morley, 2011).

Im Zuge dieser Studie musste die Ernährungsinterventionsgruppe täglich, sowie direkt nach den durchgeführten Trainingseinheiten eine Trinknahrung der Firma Nutricia, das Supplement FortiFit, einnehmen.



Abbildung 15: Gebrauchsanweisung von Nutricia FortiFit (Nutricia FortiFit 2016 [2, 3, 4])

Bei diesem Getränk handelt es sich um ein diätetisches Lebensmittel, welches speziell für die Ernährungstherapie entwickelt wurde, um den Aufbau der Muskelmasse und altersbedingte Ernährungsbedürfnisse zu unterstützen. Es enthält vorwiegend eine mit Leucin (3 g pro Portion) angereicherte Mischung essentieller Aminosäuren, die vom Körper selbst nicht gebildet werden können und somit über die Nahrung zugeführt werden müssen. Die über FortiFit aufgenommen Mengen können in dieser Quantität über eine normale Ernährungsform nicht aufgenommen werden und sind durch FortiFit schneller und besser im Blut verfügbar. Zusätzlich enthält es 800 internationale Einheiten Vitamin D, welches unter anderem zum Aufbau von Muskelmasse und -kraft dient (Nutricia FortiFit, 2016 [2, 3, 4]).

FortiFit wurde nur unter medizinischer Beobachtung eingenommen. Die Zubereitung erfolgte durch Verrühren bzw. Mixen von 125 ml Wasser und 6 Messlöffel des Nutricia FortiFit Pulvers (siehe Abbildung 15). Dieses Getränk wurde den Probanden der Ernährungsinterventionsgruppe täglich zum Frühstück sowie an den Trainingstagen abends verabreicht.

In Tabelle 3 sind alle Inhaltsstoffe von Nutricia FortiFit angeführt:



Tabelle 3: Inhaltsstoffe von Nutricia FortiFit (Nutricia FotiFit 2016 [2, 3, 4])

Inhaltsstoffe	100 ml	150 ml
<b>Physiologischer Brennwert</b>	100 kcal	150 kcal
<b>Broteinheit</b>	0,5 BE	0,8 BE
<b>Eiweiß</b>	13,8 g	20,7 g
<b>Kohlenhydrate</b>	6,2 g	9,4 g
<b><i>davon:</i></b>		
<b>Zucker</b>	2,8 g	4,2 g
<b>*Glukose</b>	0,5 g	0,8 g
<b>*Lactose</b>	0,3 g	0,5 g
<b>*Saccharose</b>	1,6 g	2,4 g
<b>*Maltose</b>	0,4 g	0,6 g
<b>Polysaccharide</b>	3,4 g	5,1 g
<b>Fett</b>	2 g	3 g
<b>davon:</b>		
<b>*gesättigte FS</b>	0,5 g	0,8 g
<b>*einfach unges. FS</b>	1,1 g	1,7 g
<b>*mehrfach unges. FS</b>	0,4 g	0,6 g
<b>Ballaststoffe</b>	0,8 g	1,2 g
<b>Lösliche Ballaststoffe</b>	0,8 g	1,2 g
<b>Unlösliche Ballaststoffe</b>	-	-
<b><u>Mineralstoffe</u></b>		
<b>Natrium</b>	100 mg	150 mg
<b>Kalium</b>	186 mg	279 mg
<b>Chlorid</b>	46 mg	70 mg
<b>Calcium</b>	333 mg	500 mg
<b>Phosphor</b>	167 mg	250 mg
<b>Magnesium</b>	25 mg	37 mg
<b><u>Spurenelemente</u></b>		
<b>Eisen</b>	1,6 mg	2,4 mg
<b>Zink</b>	1,5 mg	2,2 mg
<b>Kupfer</b>	180 µg	270 µg
<b>Jod</b>	13 µg	20 µg
<b>Chrom</b>	4,9 µg	7,4 µg
<b>Fluorid</b>	0,1 mg	0,15 mg
<b>Mangan</b>	0,33 mg	0,50 mg
<b>Molybdän</b>	9,6 µg	14 µg
<b>Selen</b>	10 µg	15 µg
<b><u>Vitamine</u></b>		
<b>Vitamin A (RE)</b>	100 µg	150 µg
<b>Vitamin D3</b>	13 µg	20 µg
<b>Vitamin E (alpha-TE)</b>	5 mg	7,5 mg
<b>Vitamin K</b>	7,6 µg	11 µg
<b>Vitamin C</b>	21 mg	31,5 mg
<b>Thiamin</b>	0,15 mg	0,23 mg

<b>Riboflavin</b>	0,17 mg	0,25 mg
<b>Niacin (NE)</b>	1,8 mg	2,7 mg
<b>Vitamin B6</b>	0,5 mg	750 mg
<b>Folsäure</b>	133 µg	200 µg
<b>Panhotensäure</b>	0,53 mg	0,8 mg
<b>Vitamin B12</b>	2 µg	3 µg
<b>Biotin</b>	4 µg	6 µg
<b>Aminosäuren</b>	7,05 g	10,6 g
<b><u>Davon:</u></b>		
<b>L-Arginin</b>	247 mg	370,5 mg
<b>L-Leucin</b>	1,87 g	2,85 g
<b><u>Andere Stoffe</u></b>		
<b>Cholin</b>	37 mg	55,5 mg
<b>Inositol</b>	5,3 mg	8,0 mg
<b>Karotinoide</b>	0,2 mg	0,3 mg
<b><u>Nährstoffrelation</u></b>		
<b>Eiweiß</b>	55 Energieprozent	55 Energieprozent
<b>Fett</b>	18 Energieprozent	18 Energieprozent
<b>Kohlenhydrate</b>	25 Energieprozent	25 Energieprozent
<b>Ballaststoffe</b>	2 Energieprozent	2 Energieprozent

Das Produkt wurde von der Firma Nutricia ein halbes Jahr zur Verfügung gestellt und nach Beendigung der Studie wieder abgesetzt.

### 3.5 Kognitive Kontrollgruppe

Die Probanden dieser Gruppe galten als Kontrollgruppe und mussten kognitive Tests durchführen. Analog zu den anderen beiden Gruppen wurde auch diese Gruppe betreut. Zu den Hauptaufgaben dieser Studienteilnehmer zählte die Absolvierung diverser Spiele und kognitiver Aufgaben, hauptsächlich Gedächtnistraining und Training der Fingerfertigkeit, um sowohl Merkfähigkeit als auch die kognitive Leistungsfähigkeit entsprechend zu trainieren. In dieser Gruppe wurden weder körperliche Aufgaben absolviert, noch Ernährungssupplemente eingenommen.

### 3.6 High performance liquid chromatography (HPLC)

Die in dem Zeitraum der Studie gesammelten Blutproben wurden schon in vorhergehenden Arbeiten entsprechend aufgearbeitet und anhand verschiedenster molekularbiologischer Verfahren auf unterschiedliche Parameter, unter anderem auch Bilirubin, untersucht.

In der vorliegenden Arbeit wurden alle Serumproben der Active Ageing Studie, die bis Juni 2016 nicht analysiert worden sind, zusammengesammelt und in weiterer Folge mittels *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* auf ihre UCB-Konzentration analysiert. Dabei handelte es sich vorwiegend um Blutproben der Zeitpunkte 3 bis 5 (6 - 18 Monate).

Bei der HPLC handelt es sich um eine Umkehrphasen HPLC (Reversed Phase; RP). Hierbei kommt es zur Verwendung einer unpolaren, stationären Phase und einer polaren, mobilen Phase.

#### 3.6.1 Technische Details der HPLC

Die für die HPLC notwendigen Geräte sowie Chemikalien sind in den nachfolgenden Tabellen aufgelistet:

Tabelle 4: Technische Details der HPLC

<b>High-performance liquid chromatography</b>	
<b>Pumpe</b>	LaChrom Elite Hitachi L-2130
<b>Probennehmer</b>	LaChrom Elite, Hitachi L-2200, Auto-Sampler 5°C, Injektion Volumen: 2x 20 µL
<b>Ofen</b>	LaChrom Elite, Hitachi L-2300 Säulenofen, Temperatur 35°C
<b>Detektor</b>	SPD-M20A, Shimadzu, Photodiodenzeile
<b>Wellenlänge</b>	450 nm. Zelltemperatur: 35°C
<b>Säule</b>	Fortis F18-050703 HPLC Säule, 4,6 x 150 mm, 3µm
<b>Durchflussrate</b>	1,0 ml/min
<b>Druck</b>	140-160 bar
<b>Software</b>	EZ Chrome, Hitachi

### 3.6.2 Chemikalien für die HPLC

In den unten angeführten Tabellen sind alle für die HPLC benötigten Chemikalien und weiteren Gebrauchsgegenstände angeführt:

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller	Werknummer
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich	D 4540-1 L
Eisessig (Essigsäure, AcOH)	Sigma Aldrich	320099-2,5 L
HPLC Grade Methanol (99,9% Reinheit)	Merck	106007-2,5 L
HPLC Grade Water	Roth	A511.2-2,5L
Bilirubin (alpha) (≥ 98%; Pulver)	Sigma Aldrich	B 4126-1 G
N-dioctylamin (97%)	Sigma Aldrich	D 20 1146-100 G

Tabelle 6: Geräte für Proben- und Standardaufbereitung

Name	Hersteller
Zentrifuge	Eppendorf 5417 R
Reaktionsgefäße, 1,6 mL, amber	Biozym Biotech Trading GmbH
Ultraschallbad	Bandelin Sonorex RK 100

### 3.6.3 Herstellung des Laufmittels / mobile Phase

Für die mobile Phase wird zu Beginn 72 ml *HPLC Grade Water* in einem Messzylinder abgemessen und, mit Paraffin verschlossen, zur Seite gestellt.

Danach werden 300 ml *HPLC Grade Methanol* in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit 48,4 g *N-Dioctylamin* versetzt. Anschließend wird der Erlenmeyerkolben mit Paraffin verschlossen und 5 Minuten in einer Eisbox gekühlt, da es sich hierbei um eine exotherme Reaktion handelt.

Weiterführend wird der Lösung 12,02 g *Eisessig (Essigsäure; AcOH)* zugefügt, bevor man den Erlenmeyerkolben bis zur 900 ml Marke mit *HPLC Grade Methanol* auffüllt. In weiterer Folge wird die hergestellte Lösung in einen 1000 ml Messzylinder überführt und bis zur 930 ml Marke mit *HPLC Grade Methanol* aufgefüllt. Abschließend wird der Lösung noch das zu Beginn vorbereitete *HPLC Grade Water* beigefügt.

Die hergestellte Lösung sowie ein Liter des reinen *HPLC Grade Methanol* wird anschließend filtriert, um mögliche Verunreinigungen aus der Lösung zu entfernen und folglich in einem entsprechenden Vorratsgefäß kombiniert. Die hergestellte mobile Phase setzt sich aus 3,5% *HPLC Grade Water* in 96,5% *HPLC Grade Methanol* zusammen. In Abbildung 16 ist die schematische Darstellung der Herstellung der mobilen Phase abgebildet:

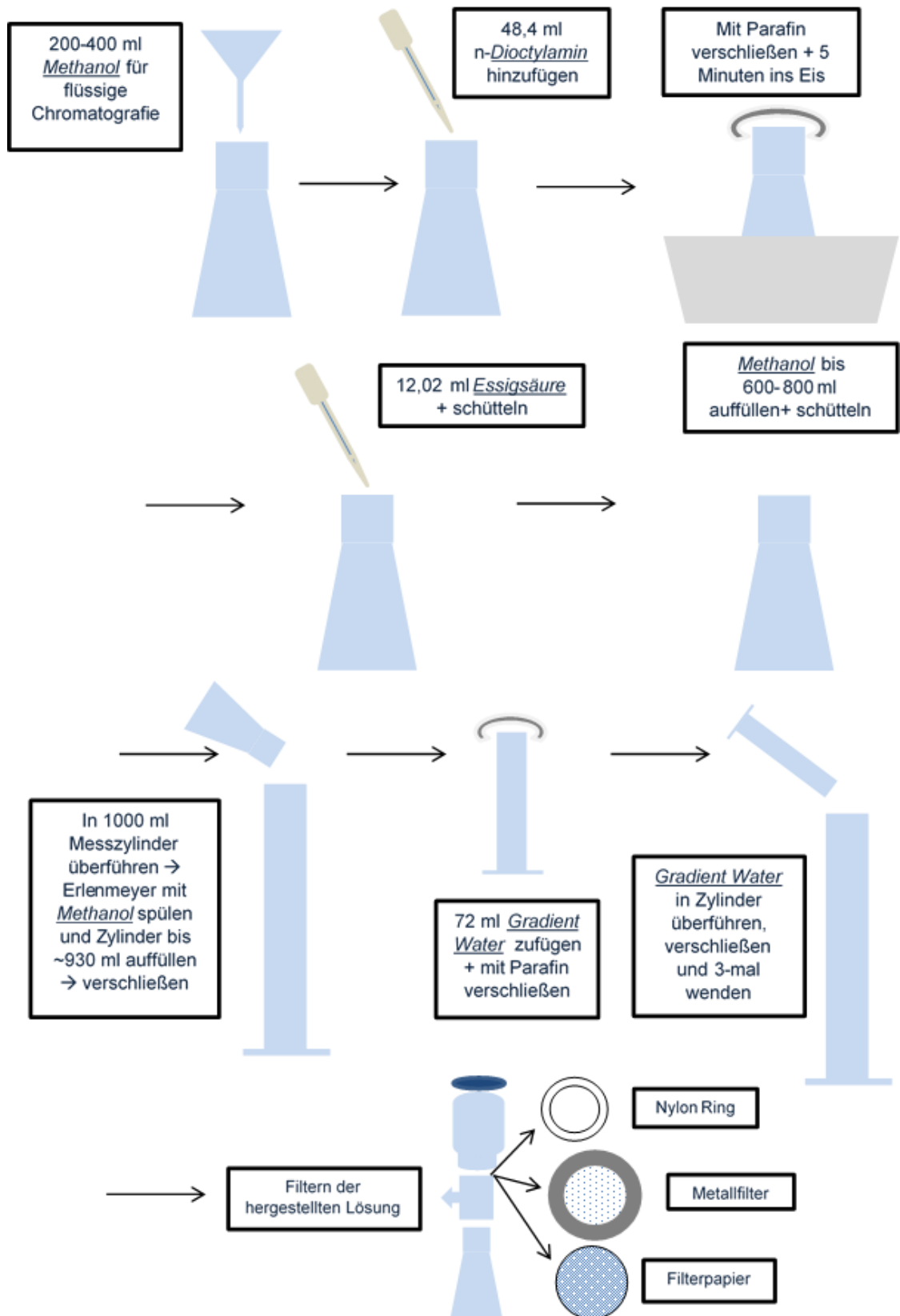


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Herstellung der mobilen Phase

### 3.6.4 Herstellung des Standards

Bilirubin ist empfindlich gegenüber Licht, Sauerstoff und Hitze. Um eine 10 milimolare Stocklösung herzustellen, werden 3 - 5 mg des Bilirubinpulvers (*Bilirubin alpha*) eingewogen. Um es anschließend zu lösen wird eine entsprechende Menge an DMSO benötigt (<http://graphpad.com/quickcalcs/molarityform.cfm>, [5]).

Das gewünschte Volumen wird in ein Mikroröhrchen pipettiert und für 5 Minuten im Wasserbad (70°C) temperiert. Das Röhrchen wird anschließend in ein Ultraschallbad (1 Minute) überführt, gevortext und für 30 Sekunden zentrifugiert (14.000 rpm bei 4 °C), solange bis das Bilirubin Pulver vollständig in Lösung gegangen ist. Zuletzt wird die hergestellte Lösung zu je 2,5 µL in zuvor beschriftete Mikroröhrchen aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

Es werden fünf verschiedene UCB-Konzentrationen (50, 25, 12,5, 1,25, 0,75 µmol/L), entsprechend der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 7), hergestellt.

Tabelle 7: Pipettierschema für die Herstellung der Standardverdünnungsreihe

Standardverdünnung	Ausgangslösungen	Volumen DMSO (µl)	Konzentration (µmol/L)
S0	100 µL Bilirubin	-	10000
S1	2,5 µL S0	497,5	50
S2	250 µL S1	250	25
S3	250 µL S2	250	12,5
S4	60 µL S3	440	1,25
S5	250 µL S4	250	0,75

Die entsprechende Berechnung für die Herstellung der Standardreihe wird mittels der nachfolgenden Formel berechnet:

$$C1 * V1 = C2 * V2$$

S0 stellt in diesem Falle die Ausgangs- bzw. Stocklösung dar. Um aus der Stocklösung (10000 µmol/L) eine Verdünnung mit der Konzentration von 50 µmol/L bei einem erwünschten Volumen von 500 µL zu erhalten, ist folgender Rechenschritt notwendig:

$$50 \text{ µmol/L} * 500 \text{ µL} = 10000 \text{ µmol/L} * V_2$$

$$V_2 = (50 \text{ µmol/L} * 500 \text{ µL}) / (10000 \text{ µmol/L})$$

$$V_2 = 2,5 \text{ µL}$$

Um die gewünschte Lösung zu erstellen wird in weitere Folge 2,5 µL der Ausgangslösung und 497,5 µL des entsprechenden Lösungsmittel (DMSO) benötigt. Analog dazu gilt für die weiteren Schritte der oben angeführte Rechengang.

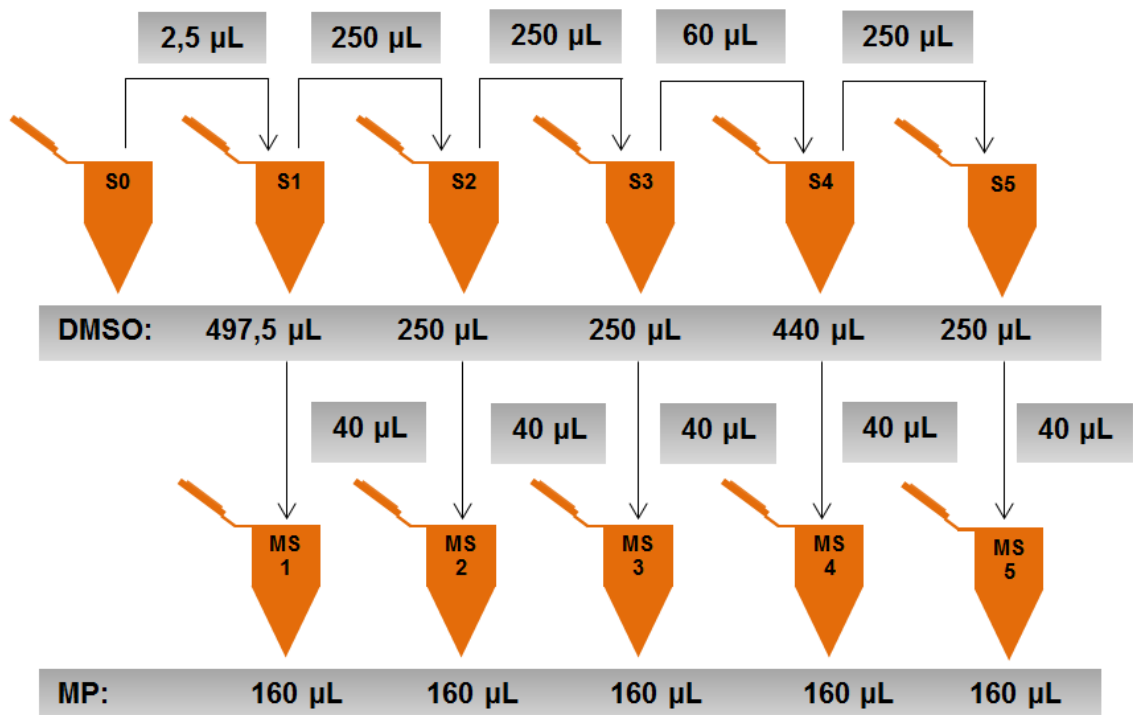


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Pipetiervorganges



Nachdem der Bilirubin Standard vollständig aufgetaut ist werden die verschiedenen Lösungen nach dem Pipettierschema aus Abbildung 17 hergestellt. Zwischen jedem Transferschritt wird die entsprechende Lösung einige Sekunden gevortext, um die Bilirubin Lösung ideal mit dem Lösungsmittel zu mischen.

Nach Fertigstellung der gewünschten Standards werden 120 µL derselben von den Mikroröhrchen in HPLC Gläser (Vials) überführt und diese in die HPLC Maschine eingebracht.

### **3.6.5 Herstellung der Proben / Probenaufarbeitung**

80 µL der Proben (bei -80°C eingefroren) werden zu 320 µL der mobilen Phase hinzugefügt. Das Lösungsverhältnis Laufmittel zu den zu analysierenden Proben sollte bei 4:1 liegen. Um konstante Resultate zu gewährleisten werden in weitere Folge Qualitätskontrollen aus Humanserum erstellt (QC). Diese werden nach exakt demselben Prinzip aufgearbeitet wie die Proben (80 µL der QC's wurden zu 320 µL der mobilen Phase hinzugefügt; siehe Abbildung 18). Die resultierende, milchig-trübe Lösung wird für 30 Sekunden gevortext.

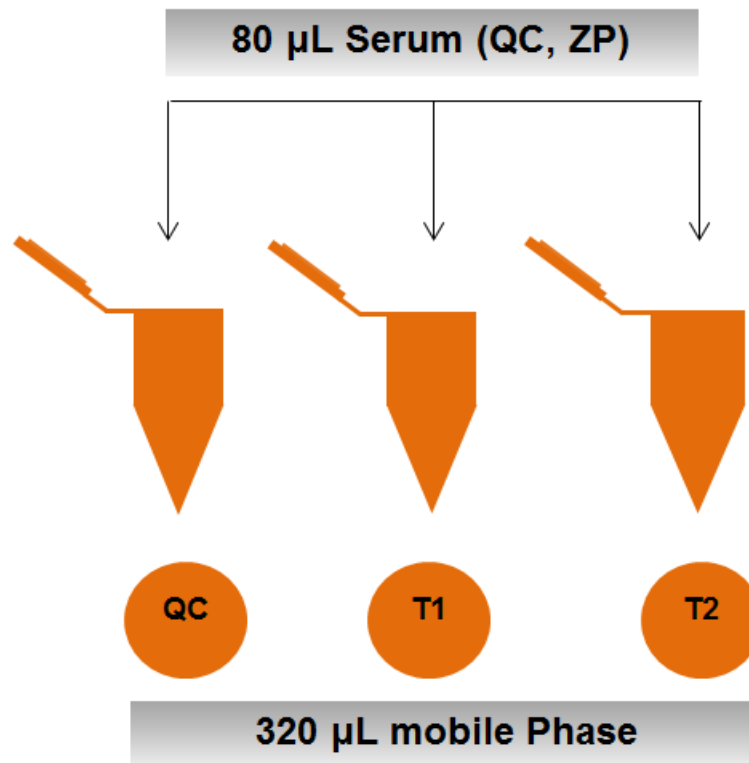


Abbildung 18: Pipettierschema für die Aufbereitung der Proben

Nach identischer Aufbereitung aller zu analysierenden Proben und Qualitätskontrollen werden diese in der Zentrifuge (bei 14.000 rpm; 4°C; 10 Minuten) zentrifugiert, um die darin befindlichen Proteine von der restlichen Lösung abzutrennen. Man erhält eine 2-Phasen-Lösung, bestehend aus einem weißen Niederschlag und einem farblosen Überstand. Von dem besagten Überstand werden 120 µL in zuvor vorbereitete HPLC Gläser (Vials) transferiert und im letzten Schritt wird ihre Konzentration mittels HPLC ermittelt (siehe Kapitel 3.7 und 3.8).

### 3.7 Konfiguration des HPLC Geräts

Bevor die aufbereiteten Proben weiter an der HPLC untersucht werden, wird die gesamte HPLC sowie die zugehörige Software auf ihre Funktionsfähigkeit überprüft und konfiguriert.

Zu Beginn wird das Laufmittel für etwa fünf Minuten mit Helium begast und weitere fünf Minuten in das Ultraschallbad gestellt. Anschließend werden sowohl die Haupt- als auch die Vorsäule optisch auf Mängel untersucht und die Konfigurationen der HPLC überprüft:

- Durchflussrate: 1 mL/min
- Druck: 140 - 160 bar
- Temperatur (Autosampler): 5°C
- Temperatur (Säule): 35°C
- Injektionsvolumen: 20 µL

Nachdem alles ordnungsgemäß überprüft und kontrolliert wurde, wird ein Vorlauf (*preview run*) für etwa 20 bis 30 Minuten gestartet. Nachdem sich die Grundlinie (*baseline*) stabilisiert hat, wird die Sequenz gestartet (siehe Abbildung 19)

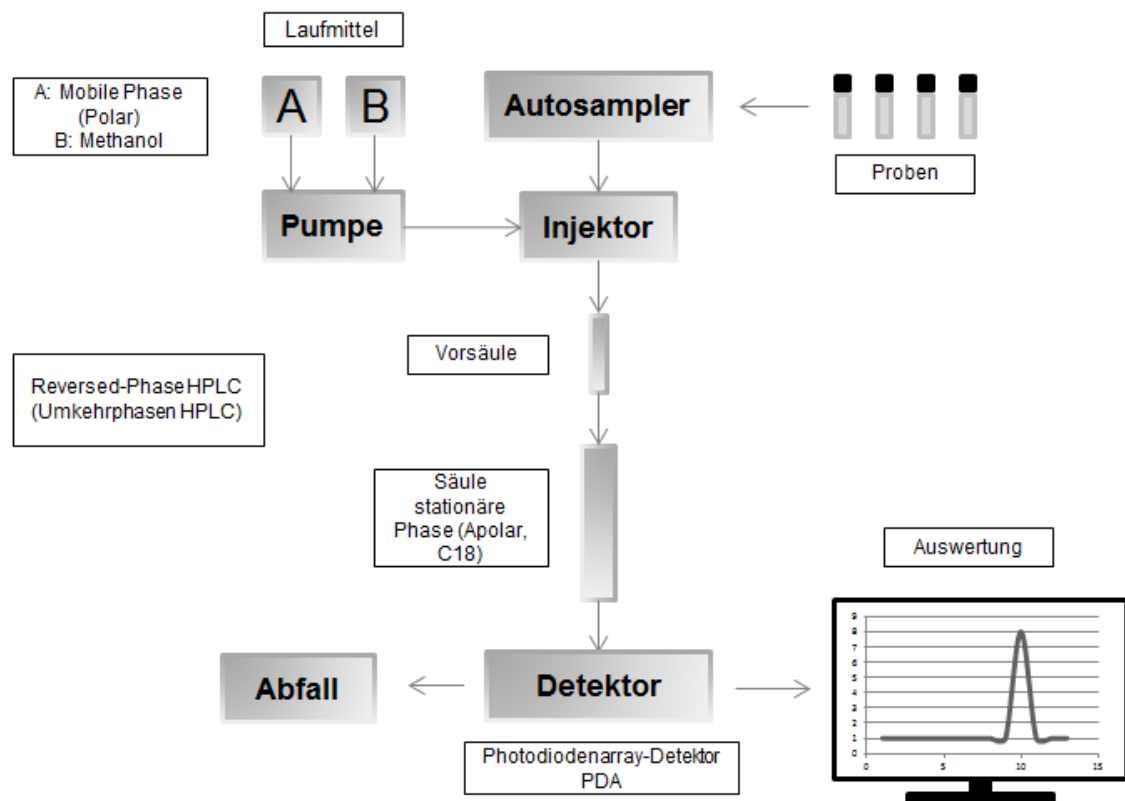


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Funktionsweise einer HPLC

### 3.8 Interpretation der Bilirubin Peaks

Die Konzentrationen der aufbereiteten Proben werden mittels Bilirubin Peaks analysiert (Abbildung 20). Dieser setzt sich aus der Retentionszeit sowie der Signalintensität zusammen. Die entsprechenden Chromatogramme werden integriert, nacheinander ausgewertet und die ermittelten AUC's (*area's under the curve*) tabellarisch zusammengefasst.

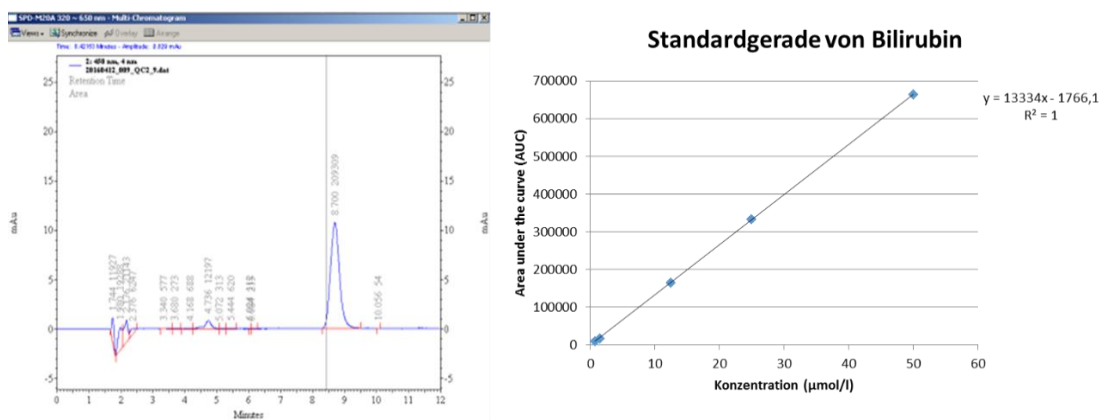


Abbildung 20: UCB-Peak einer Qualitätskontrolle sowie die dazugehörige Standardgerade

Die Chromatogramme der Standards setzen sich aus 3 Peaks (einem größeren und zwei kleineren) zusammen. Sie werden in der Literatur als die 3 Isomere III $\alpha$ , IX $\alpha$  und XIII $\alpha$  interpretiert. Im menschlichen Serum ist jedoch nur ein Peak, der IX $\alpha$  Isomer, nachweisbar, wie in Abbildung 20 gezeigt wird (Zelenka et al., 2008). Dieser erscheint bei einer Retentionszeit ( $t_r$ ) von ca. 8 bis 9 Minuten.

Dieser Peak wird anschließend mittels Software analysiert und die entsprechende AUC sowie die  $t_r$  in tabellarischer Form in Microsoft Excel übertragen.

Die UCB-Konzentrationen aller vorhandenen Proben wurden mithilfe der Software EZ Chrome von Hitachi und Microsoft Excel bestimmt. Mithilfe der Standardgeraden ( $y = kx + d$ ) wurden sowohl Standardgleichung als auch der

Regressionskoeffizient ermittelt. In weiterer Folge wurden alle gesammelten AUC's in die Gleichung eingetragen und die Konzentration berechnet:

$$x = \frac{y - d}{k}$$

$$\text{Konzentration } (\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{AUC IX}\alpha\text{Bilirubin} - \text{Achsenabschnitt}}{\text{Steigung}}$$

Da die Proben bereits seit einigen Jahren in den Gefrierschränken der Universität Wien verweilen, wurde ein Faktor berechnet, um den UCB-Abbau rechnerisch auszugleichen. Dafür wurden die damals ermittelten Werte sowie die aktuellen Werte herangezogen, um eine Abbaurate zu quantifizieren. Die ermittelten UCB-Konzentrationen wurden schließlich mit dem Faktor 1,22 multipliziert und die resultierenden Werte wurden zur weiteren statistischen Analyse herangezogen.

### 3.9 Reproduzierbarkeit

Um in weiterer Folge die Präzision bzw. die Reproduzierbarkeit zu veranschaulichen, geben ForscherInnen der Gesellschafts- und Verhaltenswissenschaften zwei Maße des Variationskoeffizienten (*VK*) in ihren Publikationen an: den *VK* innerhalb (*Intra*) und zwischen (*Inter*) den einzelnen Analyseergebnissen. Der *VK* ist eine dimensionslose Zahl, definiert als die Standardabweichung einiger Messungen einer Probenreihe geteilt durch den Mittelwert derselben Probenreihe.

Die *VK* innerhalb und zwischen den einzelnen Analyseergebnissen betragen 0,94% und 3,70%. Die Dauer der Analytik betrug 3 Wochen.

### 3.10 Statistische Analyse

Alle ermittelten Werte wurden mit Hilfe des Statistik Programms SPSS analysiert und ausgewertet. Vor der Durchführung aller statistischen Tests wurden die Werte mittels Kolmogorow-Smirnov auf ihre Verteilung getestet. Sofern nicht anders angegeben, wurde für nicht normalverteilte Werte wird in Hinblick auf die deskriptive Statistik der Median, bei normalverteilten Werten wird der Mittelwert sowie die Standardabweichung angegeben,

Sofern keine Normalverteilung gegeben war, wurde der *Mann-Whitney-U*-, *Kruskal Wallis*-, *Wilcoxon*- sowie der *Friedman-Test* durchgeführt, bei Normalverteilung der *t-Test*. Für alle ermittelten Ergebnisse wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  gewählt. Signifikanzwerte die unter diesem Niveau ausfallen werden mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Ausreißer wurden in die Kalkulationen miteinbezogen, da es sich gerade bei diesen Werten um physiologisch wertvolle Konzentrationen handelt, die protektive Eigenschaften aufweisen sollen.

## 4) Ergebnisse und Diskussion

Die zur statistischen Auswertung herangezogenen Werte wurden zum Teil aus vorausgegangenen Arbeiten und Analysen herangezogen. Für diese Arbeit wurden insgesamt 189 Serumproben von verschiedenen Zeitpunkten hinsichtlich ihrer UCB-Konzentration mittels HPLC analysiert.

Zum Studienstart standen exakt 100 Testpersonen zur Verfügung. Diese teilten sich weiterführend in 87 weibliche und 13 männliche Teilnehmer auf. Die Geschlechteraufteilung zeigt eindeutig den zunehmende Frauenanteil mit fortschreitendem Alter, der zu Beginn dieser Arbeit schon erwähnt wurde (Perrig-Chiello, 2007, Knight und Nigam, 2008).

Das Durchschnittsalter lag bei  $83 \pm 6$  Jahren, wobei die jüngste Teilnehmerin 65 und der älteste Teilnehmer 98 Jahre alt war. Diese Altersverteilung zeigt eine sehr breite Streuung und wird in der weiteren Auswertung näher behandelt. In Tabelle 8 sind die deskriptiven Kennwerte des ersten Studienzeitpunktes zusammengefasst.

**Tabelle 8: UCB-Konzentrationen geteilt nach Geschlechter zu Beginn der Studie (ZP 1)**

	<b>Anzahl (n)</b>	<b>UCB Median (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>UCB Min-Max (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>IQR</b>	<b>25. Perzentile</b>	<b>75. Perzentile</b>
<b>Gesamt</b>	100	5,68	2,77 – 24,56	3,29	4,59	7,88
<b>Männlich</b>	13	7,13	3,97 – 24,56	5,92	5,54	11,46
<b>Weiblich</b>	87	5,52	2,77 – 22,01	2,99	4,56	7,55

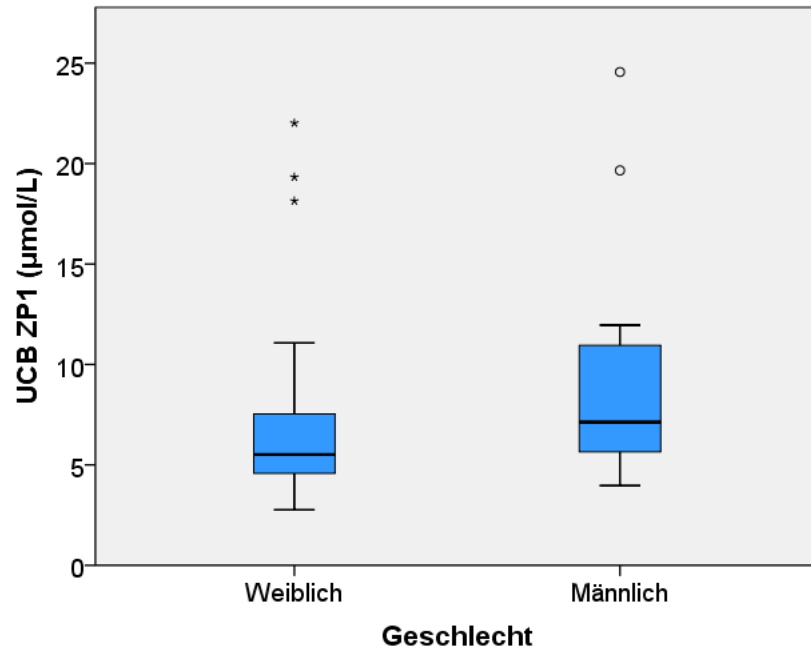


Abbildung 21: UCB-Konzentration nach Geschlechter zu ZP 1

In Abbildung 21 sind die UCB-Konzentrationen der Gesamtstudienpopulation getrennt nach Geschlechter angegeben. Es ist trotz ungleicher Geschlechterzahlen erkennbar, dass Männer eine höhere Bilirubinkonzentration als Frauen aufweisen (Männer: 7,13 µmol/L vs Frauen: 5,52 µmol/L). Die Konzentrationen zwischen den Geschlechtern unterscheiden sich in der vorliegenden Studienpopulation zum ersten Zeitpunkt signifikant voneinander ( $p=0,03$ ).

Der Aspekt der unterschiedlichen UCB-Konzentrationen zwischen Männern und Frauen wurde schon bei Vitek und Schwertner erwähnt. Obwohl über die genauen Mechanismen dahinter Uneinigkeit besteht, vermuten die Autoren dabei eine mögliche Östrogeninduktion der UDP-Glukuronosyltransferase bei Frauen, die sich in einer erniedrigten UCB-Konzentration äußert (Vitek und Schwertner, 2007).

Aufgrund der geringen Anzahl an männlichen Teilnehmern wird in allen weiteren statistischen Auswertungen geschlechtsspezifische Unterschiede nicht behandelt.



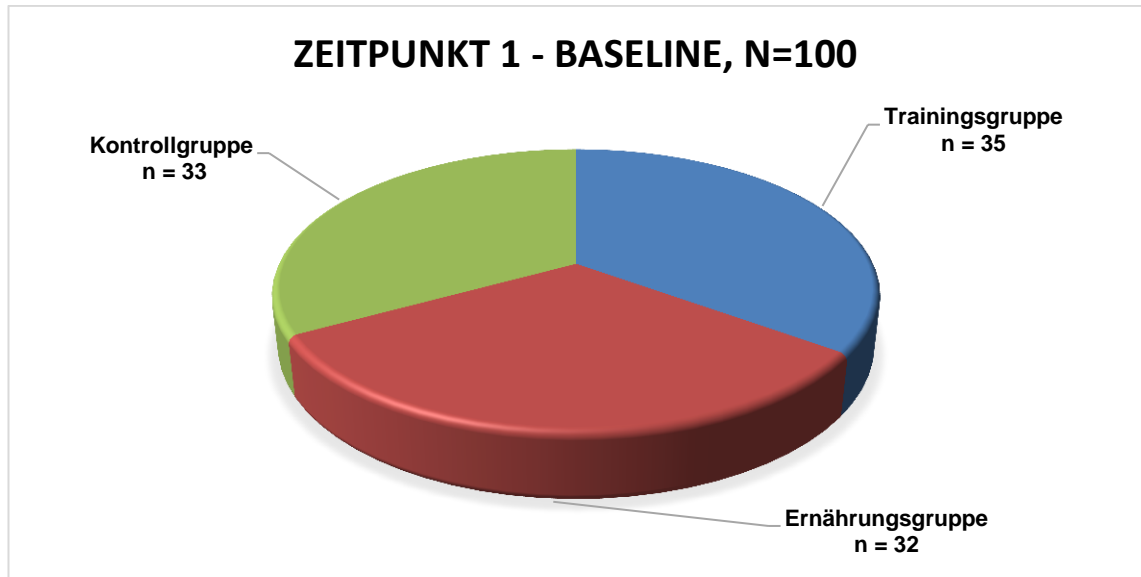


Abbildung 22: Gruppeneinteilung zu ZP 1

In Abbildung 22 sieht man die Gruppenszusammensetzungen zum ersten Studienzeitpunkt. Die UCB-Konzentrationen setzen sich zu Beginn der Studie in den Trainings-, Ernährungs- sowie Kontrollgruppe wie in der nachfolgenden Tabelle 9 angegeben zusammen:

Tabelle 9: Deskriptive Tabelle nach Gruppeneinteilung zu ZP 1

Gruppe	Anzahl (n)	UCB Median ( $\mu\text{mol/L}$ )	UCB Min-Max ( $\mu\text{mol/L}$ )	IQR	25. Perzentile	75. Perzentile
<b>Training</b>	35	6,53	3,71 – 24,56	5,11	4,96	10,07
<b>Ernährung</b>	32	5,38	3,11 – 18,14	2,79	4,44	7,23
<b>Kontrolle</b>	33	5,72	2,77 – 10,20	3,36	4,14	7,50

In der Abbildung 23, die die unterschiedlichen Gruppen und deren Serum UCB-Konzentrationen veranschaulicht, ist zu beobachten, dass zum ersten Studienzeitpunkt 5 Personen eine erhöhte ( $> 17,1 \mu\text{mol/L}$ ) UCB-Konzentration

aufweisen. Die Gruppen unterscheiden sich jedoch nicht hinsichtlich der UCB-Konzentrationen.

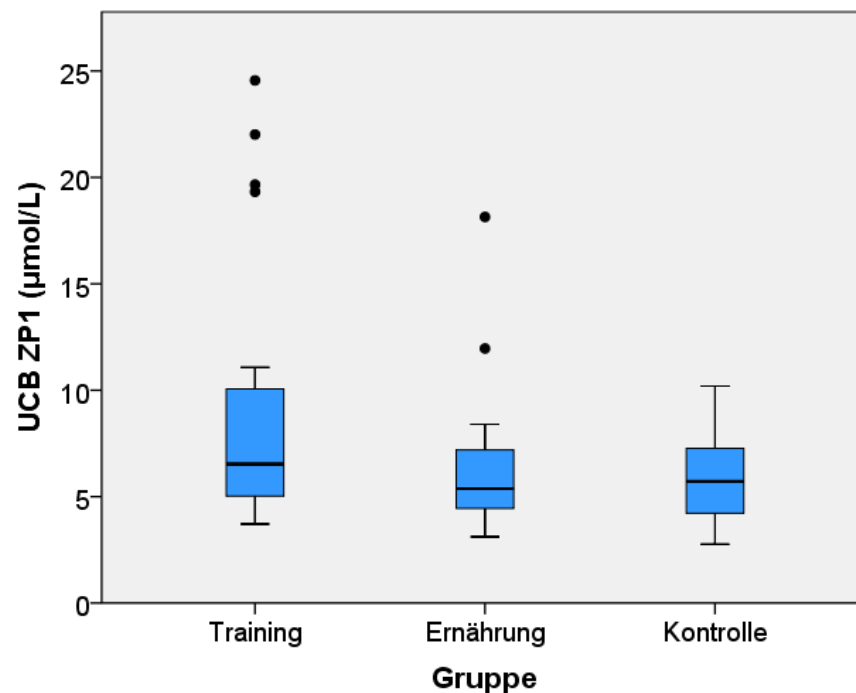


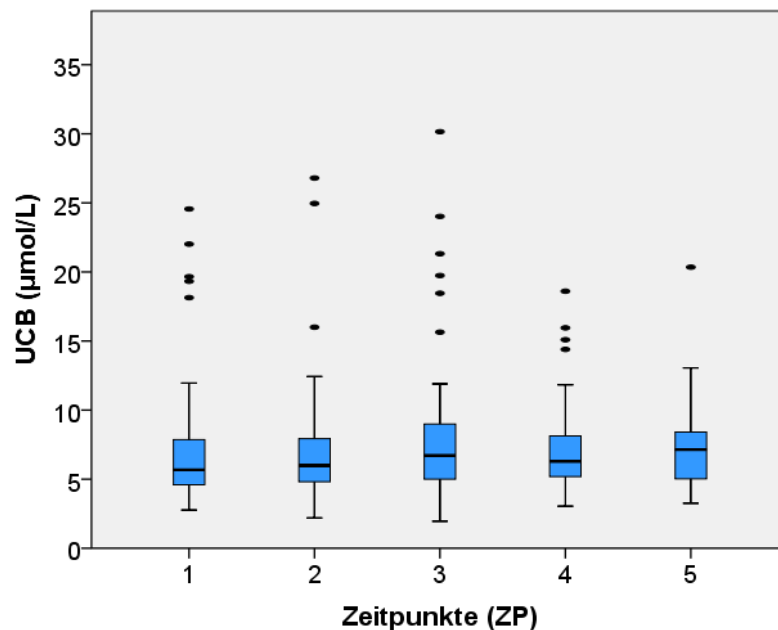
Abbildung 23: UCB-Konzentrationen nach Gruppeneinteilung zu ZP 1 (Geschlechterunabhängig)

Im Laufe der Studie wurden zu fünf definierten Zeitpunkten Blutproben von den Studienteilnehmer abgenommen und auf verschiedenste Parameter analysiert. In der folgenden Tabelle sind die deskriptiven Kennwerte für die einzelnen Zeitpunkte der UCB-Konzentrationen angeführt.

Tabelle 10: Deskriptive Tabelle der UCB-Konzentrationen von ZP 1 bis 5

ZP	Anzahl (n)	UCB Median (µmol/L)	UCB Min-Max (µmol/L)	IQR	25. Perzentile	75. Perzentile
1	100	5,68	2,77–24,56	3,29	4,59	7,88
2	86	5,99	2,20–26,80	3,18	4,81	7,99
3	81	6,71	1,95–30,15	4,05	5,00	9,05
4	65	6,29	3,05–18,60	3,00	5,17	8,17
5	54	7,14	3,25–20,35	3,41	5,00	8,41

Betrachtet man Tabelle 10 genauer, so erkennt man, dass vom ersten bis zum letzten Studienzeitpunkt 46 Personen aus der Studie ausgeschieden sind und somit auch die einzelnen Interventionsgruppen zunehmend kleiner werden. Auf der anderen Seite ist ein leichter Trend bezüglich des Verlaufs der UCB-Konzentration erkennbar: über den gesamten Studienzeitraum hinweg steigt die UCB-Konzentration in der Gesamtstudienpopulation leicht an. Der Verlauf der UCB-Konzentrationen über alle fünf Zeitpunkte wird in der Abbildung 24 verdeutlicht.



**Abbildung 24: Darstellung der UCB-Konzentrationen über alle 5 Zeitpunkte (Geschlechts- und Interventionsunabhängig)**

Weiterführend wurde ermittelt, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen dem ersten und allen anderen Zeitpunkten hinsichtlich der UCB-Konzentrationen innererhalb der gesamten Studienpopulation gab (Tabelle 11).

Tabelle 11: Signifikanzwerte für UCB-Konzentrationen

ZP	Anzahl (n)	UCB-Median ( $\mu\text{mol/L}$ )	25. Perzentile	75. Perzentile	p-Wert (ZP1–ZPx)
1	100	5,68	4,59	7,88	
2	86	5,99	4,81	7,99	0,493
3	81	6,71	5,00	9,05	0,167
4	65	6,29	5,17	8,17	0,758
5	54	7,14	5,00	8,41	0,753

ZPx steht für den entsprechenden Zeitpunkt

Es wurde im weiteren Verlauf der statistischen Auswertung der beiden Tests kein signifikanter Unterschied bezüglich der UCB-Konzentrationen im Serum der gesamten Studienpopulation im Hinblick auf die Zeitpunkte 3, 4 und 5 verglichen mit der Konzentration zum Ausgangszeitpunkt beobachtet. Das könnte allerdings daran liegen, dass im Laufe der Studienzeit 46 Personen aus verschiedenen Gründen ihre Teilnahme beendeten.

Es wurden auch die anderen Zeitpunkte miteinander verglichen und ausgewertet, allerdings ergaben diese Tests keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der UCB-Konzentration.

In weiterer Folge wurden alle Teilnehmer bezüglich ihrer Gruppenzugehörigkeit analysiert und auf weitere mögliche Unterschiede getestet. Tabelle 12 zeigt die Resultate der UCB-Konzentrationen zwischen den Gruppen zu jedem Zeitpunkt der Studie.

Tabelle 12: Unterschiede der UCB-Konzentrationen zwischen den Gruppen zu den jeweiligen ZP

ZP	Teilnehmer (n)	Gruppe	UCB-Median ( $\mu\text{mol/L}$ )	IQR	Anzahl (n)	p-Wert
1	100	Training	6,53	5,11	35	*0,044
		Ernährung	5,38	2,79	32	
		Kontrolle	5,72	3,36	33	
2	86	Training	6,79	3,16	31	0,113
		Ernährung	5,26	3,09	26	
		Kontrolle	6,13	3,39	29	
3	81	Training	7,26	5,47	31	0,369
		Ernährung	6,17	4,66	24	
		Kontrolle	6,96	3,23	26	
4	65	Training	6,03	4,06	23	0,961
		Ernährung	6,46	3,15	21	
		Kontrolle	6,50	2,65	21	
5	54	Training	7,28	2,68	23	0,530
		Ernährung	5,88	4,48	18	
		Kontrolle	7,38	3,82	13	

\*  $p < 0,05$

Tabelle 12 stellt eine deskriptive Übersicht der fünf gegebenen Zeitpunkte und der Gruppenzuteilung zu jedem Zeitpunkt dar. Auffallend scheint, dass bis auf den ersten Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen gegeben ist. Das würde in weiterer Folge bedeuten, dass weder die Trainings-, noch die Ernährungsintervention einen signifikanten Einfluss auf die UCB-Konzentration hatte.

Jedoch muss als limitierender Faktor wieder die sinkende Teilnehmerzahl erwähnt werden. Die einzelnen Interventionsgruppen wurden auch separat analysiert, jedoch kam es in keiner der Gruppen zu signifikanten Veränderungen bezüglich der UCB-Konzentration über alle fünf definierten Zeitpunkte hinweg.

Im Endeffekt ergab die Lebensstilintervention keine Veränderung der UCB-Werte im gesamten Studienkollektiv. Auch in der Literatur wurden keine Erfahrungsberichte gefunden, in denen es durch eine Trainings- bzw. Ernährungsintervention zu einer Veränderung der UCB-Werte kam. Die eben erwähnten Ergebnisse sind in Tabelle 13 angeführt.

Tabelle 13: Unterschiede der UCB-Konzentrationen innerhalb der Gruppen

Gruppe	ZP	Anzahl (n)	UCB Median ( $\mu\text{mol/L}$ )	IQR	p-Wert			
					1-2	1-3	1-4	1-5
<b>Training</b>	1	35	6,53	5,11				
	2	31	6,79	3,16	0,721			
	3	31	7,26	5,47		0,905		
	4	23	6,03	4,06			0,122	
	5	23	7,28	2,68				0,615
<b>Ernährung</b>	1	32	5,38	2,79				
	2	26	5,26	3,09	0,620			
	3	24	6,17	4,66		0,391		
	4	21	6,46	3,15			0,099	
	5	18	5,88	4,48				0,327
<b>Kontrolle</b>	1	33	5,72	3,36				
	2	29	6,13	3,39	0,305			
	3	26	6,96	3,23		0,151		
	4	21	6,50	2,65			0,794	
	5	13	7,38	3,82				0,701

Um eine genauere Ansicht des Verlaufs der UCB-Konzentration innerhalb der einzelnen Gruppen geben zu können wurden die Gruppen separat analysiert. Im Zuge dieser Auswertung kam man zu dem Schluss, dass in keiner der Interventionsgruppen ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der UCB-Konzentration zwischen den Zeitpunkten beobachtet werden konnte.

Betrachtet man die oben angeführten Ergebnisse, kommt man einmal mehr zu dem Schluss, dass die Anzahl der Studienpopulation im Laufe der Studie abnimmt. Aufgrund dessen ist es schwierig, einen signifikanten Effekt

beobachten zu können. Selbst nach der Intervention zum dritten Zeitpunkt ist kein Effekt der Intervention hinsichtlich der UCB-Konzentration erkennbar.

Aufgrund der geringeren werdenden Studienteilnehmerzahl und dem entsprechenden Studienverlauf wurde für die weitere Auswertung eine neue Gruppe gebildet, die die Gruppe „Training“ und „Training und Ernährung“ nach dem dritten Studienzeitpunkt zu einer Gruppe „Training-neu“ zusammenfasst. Der Grund dafür ist, dass sich nach dem dritten Zeitpunkt die Interventionsabläufe änderten und die Ernährungsinterventionen beendet wurde. Darüberhinaus fanden die Trainingsinterventionen zwischen Zeitpunkt 3 und 4 einmal betreut und einmal selbstständig statt. Zwischen Zeitpunkt 4 und 5 wurde nur mehr 2x pro Woche selbstständig trainiert. Insofern versuchte man auf diesem Wege, mögliche Veränderungen zu erkennen und darzustellen. Die Ergebnisse hinsichtlich der Bilirubinkonzentration zwischen den Zeitpunkten waren jedoch nicht signifikant und werden aus diesem Grund auch nicht angeführt.

Um die UCB-Konzentrationsbereiche der Probanden besser zu veranschaulichen, wurden in weiterer Folge zwei UCB-Kategorien gebildet.

Die erste Kategorie gliederte die Personen danach ein, ob ihre UCB-Werte größer oder gleich bzw. unter  $10 \mu\text{mol/L}$  lagen. Diese Menge an UCB entspricht der durchschnittlichen Konzentration im Blut (Wang et al., 2006; Bulmer et al., 2013; Wagner et al., 2015). Die zweite Kategorie spaltete die Studienpopulation in eine Gruppe mit erhöhten ( $\geq 17 \mu\text{mol/L}$ ) und normalen ( $< 17 \mu\text{mol/L}$ ) UCB-Konzentrationen auf, da  $17 \mu\text{mol/L}$  als Grenzwert für Gilbert's Syndrome gilt. Die Ergebnisse dazu werden in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14: Unterschiede UCB-Konzentrationen innerhalb UCB-Kategorien

ZP	UCB-Kategorie ( $\mu\text{mol/L}$ )	Anzahl (n)	UCB-Median ( $\mu\text{mol/L}$ )	IQR	p-Wert
1	< 10	87	5,33	2,47	<b>**0,000</b>
	$\geq$ 10	13	11,08	9,30	
2	< 17	95	5,62	2,97	<b>**0,000</b>
	$\geq$ 17	5	19,66	4,56	
3	< 10	74	5,70	2,34	<b>**0,000</b>
	$\geq$ 10	12	11,74	4,50	
4	< 17	84	5,93	3,02	<b>**0,001</b>
	$\geq$ 17	2	25,88	-	
5	< 10	68	6,15	3,20	<b>**0,000</b>
	$\geq$ 10	13	11,90	9,61	
6	< 17	76	6,37	3,75	<b>**0,000</b>
	$\geq$ 17	5	21,32	7,99	
7	< 10	55	6,03	2,33	<b>**0,000</b>
	$\geq$ 10	10	11,33	4,63	
8	< 17	64	6,24	2,95	<b>*0,031</b>
	$\geq$ 17	1	18,6	0	
9	< 10	46	6,43	2,82	<b>**0,000</b>
	$\geq$ 10	8	12,61	1,98	
10	< 17	53	7,05	3,42	<b>*0,037</b>
	$\geq$ 17	1	20,35	0	

\* p < 0,05

\*\* p < 0,02

Die hier angeführten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sich die Konzentrationen zwischen den unterschiedlichen Konzentrationsgruppen signifikant voneinander unterscheiden. Das ist einerseits der Tatsache gewidmet, dass die Anzahl der Personen mit einer Konzentration unter 10 bzw. 17  $\mu\text{mol/L}$  wesentlich häufiger im Studienkollektiv vorkommen, als Personen mit einem erhöhten UCB-Spiegel. Zum Studienbeginn lag der Anteil der Personen mit einem UCB-Wert über 17  $\mu\text{mol/L}$  bei 5%, das entspricht ungefähr dem Anteil der Personen mit GS in der Gesamtbevölkerung (Bulmer et al., 2008a; Wagner et al., 2015).

Zum ersten Studienzeitpunkt wiesen 5 Personen eine UCB-Konzentration über 17  $\mu\text{mol/L}$  auf. Dieses Kollektiv wäre für weitere statistische Auswertungen durchaus interessant gewesen, allerdings ist diese sehr geringe Probandenzahl leider nicht repräsentativ und wurde in den weiteren Analysen nicht näher



herangezogen. Andererseits gibt diese Tabelle den interessanten Aufschluss, wie die sich die Konzentrationen innerhalb der Kategorien über die Zeitpunkte hinweg voneinander unterscheiden.

In der fortlaufenden Auswertung wurden nun weitere physiologische Parameter und Biomarker der Studienpopulation herangezogen, um mögliche Zusammenhänge und Effekte der Interventionen auf die UCB-Konzentration beschreiben zu können. Diesbezüglich wurden folgende 8 Parameter aus vorausgegangenen Arbeiten für weitere statistische Ermittlungen gewählt:

- Alter
- Body Mass Index ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )
- Low-Density-Lipoprotein Cholesterin (LDL-C;  $\text{mg}/\text{dL}$ )
- Oxidiertes Low-Density-Lipoprotein (OxLDL;  $\text{ng}/\text{mL}$  bzw.  $\text{mg}/\text{dL}$ )
- 8-oxo-Guanin (8oxoGua;  $\text{nmol}/\text{mmol}$  Kreatinin)
- 8-oxo-2-Desoxyguanosin (8oxodGua;  $\text{nmol}/\text{mmol}$  Kreatinin)
- Superoxiddismutase (SOD;  $\text{IU}/\text{g}$  Hb)
- Katalase (KAT;  $\text{IU}/\text{g}$  Hb)

Die entsprechenden Aufgaben bzw. Funktionen der oben angeführten Parameter werden im Laufe der Diskussion näher erörtert.

Die hier beschriebenen Parameter wurden gesammelt, auf ihre Normalverteilung geprüft und über alle fünf Zeitpunkte analysiert. Die Resultate sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Zusammenfassung aller Parameter über alle Zeitpunkte

Parameter	ZP 1	n	ZP 2	n	ZP 3	n	ZP 4	n	ZP 5	n	p-Wert
<b>UCB</b> ( $\mu\text{mol/L}$ )	6,87 $\pm$ 3,84	100	6,99 $\pm$ 3,89	86	7,81 $\pm$ 4,70	81	7,16 $\pm$ 3,03	64	7,38 $\pm$ 3,06	54	$^{\circ}$ 0,869
<b>BMI</b> ( $\text{kg/m}^2$ )	28,96 $\pm$ 4,43	92	28,80 $\pm$ 4,53	71	28,80 $\pm$ 4,56	74	28,82 $\pm$ 4,47	61			$^{\circ}$ 0,113
<b>LDL-C</b> ( $\text{mg/dL}$ )	122,14 $\pm$ 37,35	104	121,23 $\pm$ 37,66	87	124,84 $\pm$ 39,14	79					$^{\circ}$ 0,021
<b>OxLDL-C</b> ( $\text{mg/dL}$ )	0,0067 $\pm$ 0,01	101	0,0069 $\pm$ 0,02	89	0,0067 $\pm$ 0,02	81					$^{\circ}$ 0,241
<b>OxLDL-C</b> ( $\text{ng/mL}$ )	67,26 $\pm$ 145,07	101	68,78 $\pm$ 161,17	89	67,59 $\pm$ 155,18	81	80,47 $\pm$ 138,69	65			$^{\circ}$ 0,406
<b>8oxodGua</b> ( $\text{nmol/mmol}$ Kreatinin)	18,86 $\pm$ 12,23	93	16,28 $\pm$ 10,79	84	17,79 $\pm$ 12,94	79	17,43 $\pm$ 11,32	49	15,52 $\pm$ 9,01	52	$^{\circ}$ 0,212
<b>8oxoGua</b> ( $\text{nmol/mmol}$ Kreatinin)	36,74 $\pm$ 21,40	93	35,71 $\pm$ 20,44	85	38,95 $\pm$ 20,30	78	37,88 $\pm$ 22,63	49	32,61 $\pm$ 18,42	52	$^{\circ}$ 0,488
<b>SOD</b> ( $\text{IU/g Hb}$ )	2077,03 $\pm$ 275,14	74	2105,69 $\pm$ 224,82	74	2189,30 $\pm$ 235,21	74					$^{\circ}$ 0,001
<b>KAT</b> ( $\text{IU/g Hb}$ )	128,68 $\pm$ 33,69	74	143,78 $\pm$ 34,69	74	150,30 $\pm$ 36,09	74					$^{\circ}$ 0,008

Angeführt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

$^{\circ}$  Signifikanzwerte mittels Friedman Test eruiert

\* $p < 0,05$

\*\* $p < 0,02$

In Abbildung 25 sind die einzelnen Parameter über den Interventionszeitraum (ZP1 - ZP3) betrachtet schematisch dargestellt.

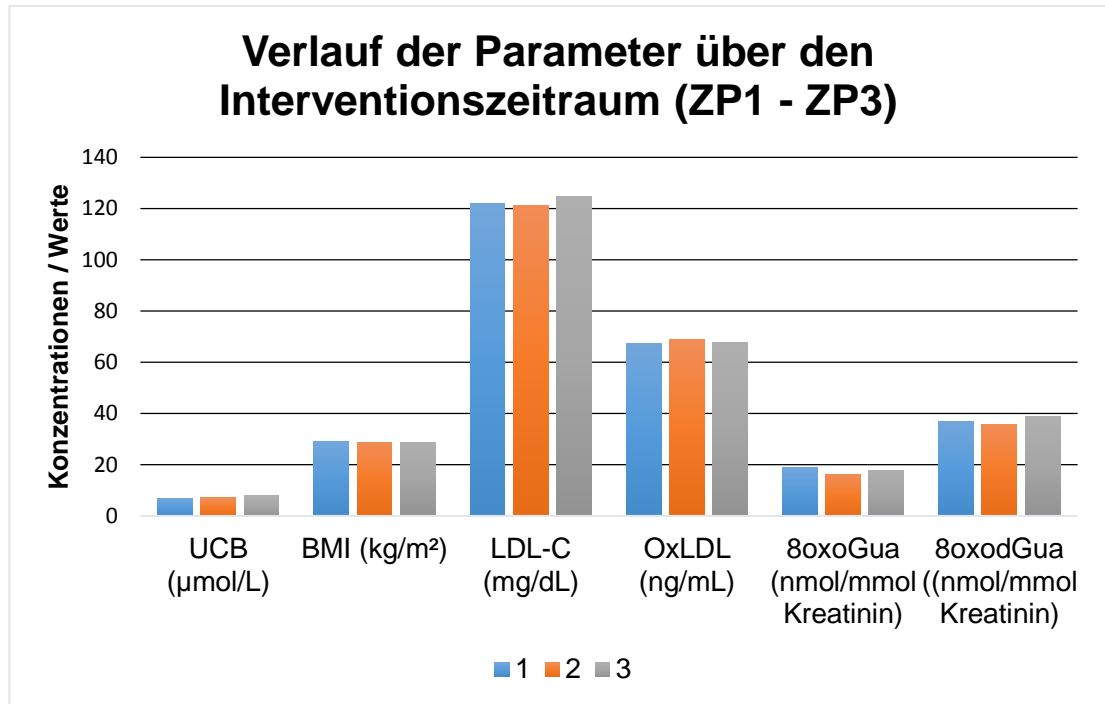


Abbildung 25: Verlauf der Parameter über den Interventionszeitraum (ZP1 - ZP3) hinweg (Mittelwerte)

Die Parameter SOD und KAT sind hier nicht angeführt und werden in Kapitel 4.5 behandelt.

## 4.1 Alter

Im Zuge der statistischen Auswertung wurden zwei Alterskategorien gebildet, um einen möglichen Einfluss oder Unterschied der UCB-Konzentration hinsichtlich des Alters testen zu können. Die erste Alterskategorie wurde in zwei Gruppen geteilt und spaltete die Studienpopulation in über und unter 85-Jährige.

Bei der Analyse dieser Alterskategorie gab es zu keinem der definierten Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied bezüglich der UCB-Konzentration zwischen den über und unter 85 Jährigen, wie aus Tabelle 16 ersichtlich ist.

**Tabelle 16: UCB-Konzentrationen innerhalb Alterskategorie 1**

<b>ZP</b>	<b>Alterskategorie 1 (Jahre)</b>	<b>Anzahl (n)</b>	<b>UCB-Median (<math>\mu\text{mol/L}</math>)</b>	<b>IQR</b>	<b>p-Wert</b>
<b>1</b>	$\leq 85$	61	5,40	2,88	0,210
	$> 85$	39	6,11	3,89	
<b>2</b>	$\leq 85$	53	5,94	3,63	0,870
	$> 85$	33	6,04	2,99	
<b>3</b>	$\leq 85$	50	6,63	3,65	0,977
	$> 85$	31	7,20	4,42	
<b>4</b>	$\leq 85$	39	6,29	2,85	0,979
	$> 85$	26	6,37	3,36	
<b>5</b>	$\leq 85$	36	6,85	3,41	0,714
	$> 85$	18	7,60	3,48	

Bezugnehmend auf diese Alterskategorie kam es im Laufe der Intervention bei den unter 85-Jährigen bzw. bei den über 85-Jährigen zu keiner wesentlichen Veränderung der UCB-Konzentration hinsichtlich der Zeitpunkte, wobei wieder eine leichte Steigerung zu erkennen ist.

Die zweite Altersgruppe wurde in 3 Gruppen eingeteilt: unter 76 bzw. 76-Jährige, 77 bis 85-Jährige und Personen die 86 Jahre alt oder älter waren. Allerdings gab es, wie Tabelle 17 zeigt, auch innerhalb dieser Gruppen keinen signifikanten Unterschied zwischen den UCB-Konzentrationen:

Tabelle 17: UCB-Konzentrationen innerhalb Alterskategorie 2

ZP	Alterskategorie 2 (Jahre)	Anzahl (n)	UCB-Median ( $\mu\text{mol/L}$ )	IQR	p-Wert
1	$\leq 76$	13	5,18	0,99	0,179
	77–85	48	5,91	3,13	
	$\geq 86$	39	6,10	3,89	
2	$\leq 76$	11	5,64	2,50	0,320
	77–85	42	6,36	3,91	
	$\geq 86$	33	6,04	2,99	
3	$\leq 76$	11	5,51	3,54	0,351
	77–85	39	7,13	3,55	
	$\geq 86$	31	7,20	4,42	
4	$\leq 76$	11	6,59	2,45	0,839
	77–85	28	6,07	2,66	
	$\geq 86$	26	6,37	3,36	
5	$\leq 76$	10	5,88	2,44	0,252
	77–85	26	7,27	4,24	
	$\geq 86$	18	7,60	3,48	

Abschließend wurde eine signifikante ( $p=0,043$ ) positive Korrelation der Bilirubinkonzentration mit dem Alter beobachtet ( $r=0,203$ ). Dieses Phänomen ist auch in den deskriptiven Tabellen (Tabelle 10/Tabelle 15) zu beobachten, jedoch ist der Unterschied zwischen den einzelnen Zeitpunkten nicht signifikant. Es könnte jedoch in weiterer Folge darauf hindeuten, dass mit fortschreitendem Lebensalter die Konzentration von UCB im Körper ansteigt, wie in Abbildung 26 dargestellt ist.

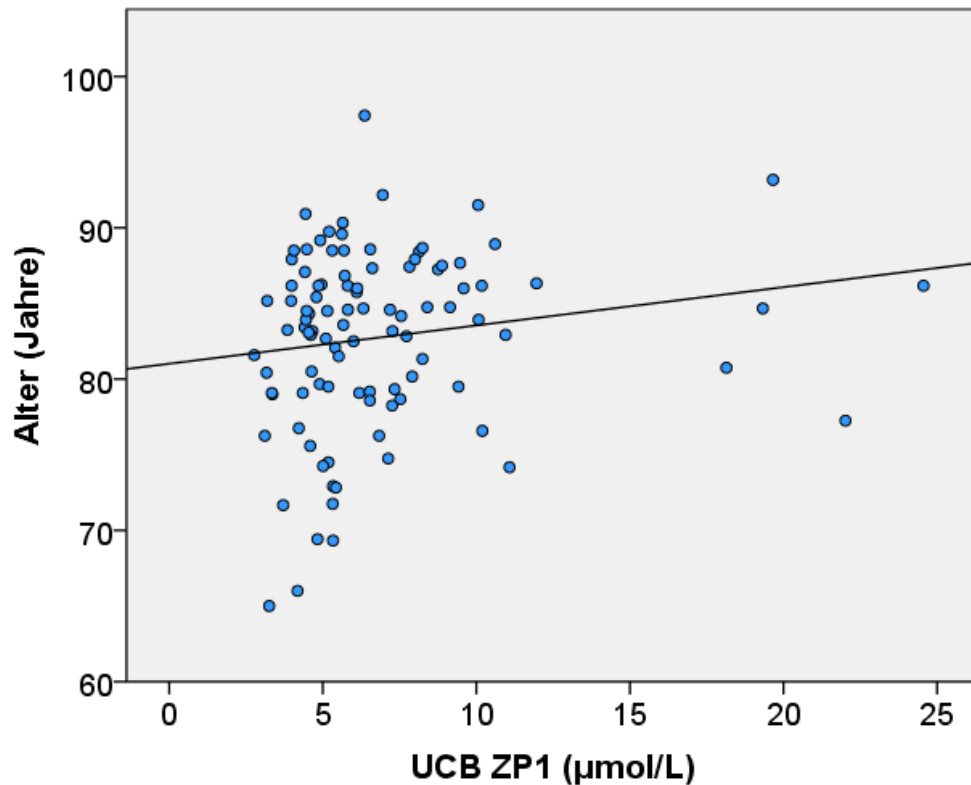


Abbildung 26: Streudiagramm zwischen Alter und UCB-Konzentration zu ZP 1

Diese Beobachtung beschrieben auch Boland et al. 2014 in ihrer Forschungsarbeit. In ihrer Beobachtungsstudie mit Personen über 70 Jahren und über einen Zeitraum von acht Jahren kam es mit fortschreitendem Alter zu einer Steigerung der UCB-Konzentrationen. Allerdings stellen die Autoren bei der Auswertung der Langzeitergebnisse fest, dass mit dem Anstieg der UCB-Konzentration schrittweise die Mortalität in der Studienpopulation zunahm und somit eine Steigerung der UCB-Konzentration nicht unbedingt mit einer erniedrigten Mortalität zusammenhängt (Boland et al., 2014).

In der Literatur wird weiter noch ein Zusammenhang bezüglich Alter und dem vermehrten Auftreten von DNA- und RNA-Schäden beschrieben (Poulsen et al., 1998; Broedbaek et al., 2013). Diese Korrelation wurde in weiterer Folge getestet, allerdings waren keine Zusammenhänge zwischen dem Alter und dem DNA- bzw. RNA-Marker in der vorliegenden Gesamtstudienpopulation und in den einzelnen Gruppen erkennbar, weswegen die entsprechenden Resultate

nicht angeführt werden. Insofern konnte im Zuge dieser Studie kein Zusammenhang zwischen dem vermehrten Auftreten von DNA- bzw. RNA-Schäden mit fortschreitendem Alter festgestellt werden.

## 4.2 Body Mass Index

In der weiteren Analyse wurde aufgrund der vorhergegangenen Beobachtung versucht, einen weiteren möglichen Zusammenhang der Intervention bzw. der UCB-Konzentration mit dem BMI zu beschreiben. Zu diesem Zwecke wurden die Teilnehmer anhand ihres BMI's den entsprechenden Klassen zugeordnet. Die Klassifikation verlief dahingehend, dass Personen mit einem BMI unter 26 kg/m<sup>2</sup> als normalgewichtig und Personen über 26 kg/m<sup>2</sup> als übergewichtig eingestuft wurden.

In Abbildung 27 wird dementsprechend die UCB-Konzentrationen vom ersten Zeitpunkt der Studie, eingeteilt nach Gruppenzugehörigkeit und BMI Klassifizierung, dargestellt.

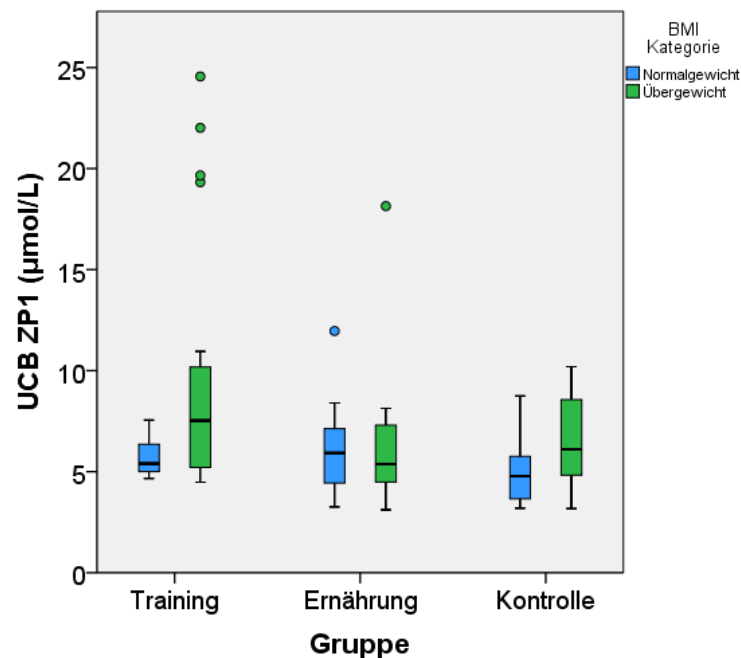


Abbildung 27: Darstellung der UCB-Konzentrationen nach Gruppen und BMI Kategorie (Geschlechterunabhängig)

Die Ergebnisse der Auswertung hinsichtlich unterschiedlicher UCB-Konzentrationen zwischen den normal- und übergewichtigen Studienteilnehmer sind in Tabelle 18 zusammengefasst.

Tabelle 18: UCB-Konzentrationen in BMI Kategorie über alle Zeitpunkte

ZP	Kategorie	Anzahl (n)	UCB-Median ( $\mu\text{mol/L}$ )	IQR	p-Wert
1	Normalgewicht	25	5,15	2,08	0,056
	Übergewicht	64	5,96	3,90	
2	Normalgewicht	18	4,86	2,68	*0,031
	Übergewicht	40	6,52	3,84	
3	Normalgewicht	14	6,36	2,69	0,346
	Übergewicht	48	6,44	4,20	
4	Normalgewicht	8	7,08	4,56	0,813
	Übergewicht	32	6,24	3,15	

\*  $p < 0,05$

Zum zweiten Studienzeitpunkt gibt es einen signifikanten Unterschied der UCB-Konzentrationen zwischen normal- und übergewichtigen Studienteilnehmer, die es wiederum bei den übrigen Zeitpunkten nicht gibt. Allerdings ist dieses Ergebnis leicht verfälscht, da einige Daten zur statistischen Auswertung nicht vorhanden waren. So sind beispielsweise bei Zeitpunkt 2 nur insgesamt 58 Daten von BMI's vorhanden, obwohl insgesamt 86 Personen noch an der Studie beteiligt waren.

Der Zusammenhang zwischen der UCB-Konzentration und dem BMI wurden schon in mehreren Forschungsarbeiten beschrieben (Wallner et al., 2013a; Wallner et al., 2013b; Choi et al., 2011, Jenko-Praznikar et al., 2013).

Abbildung 28 zeigt in weiterer Folge die Korrelationen zum ersten Zeitpunkt innerhalb der Studienpopulation, die eine UCB-Konzentration größer oder gleich  $10 \mu\text{mol/L}$  aufwiesen. Dabei kommt man zu dem Schluss, dass es einen signifikant negativen Zusammenhang zwischen der UCB-Konzentration und dem BMI gibt ( $r = -0,622$ ,  $p = 0,031$ ).



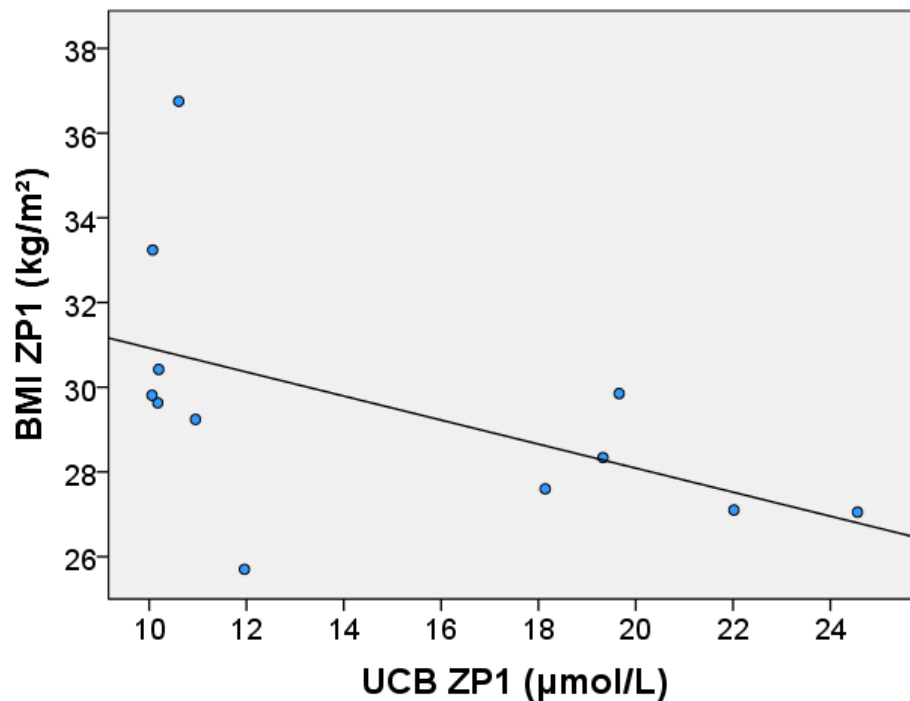


Abbildung 28: Korrelation zwischen BMI und UCB zu ZP 1 (Personen > 10 µmol/L)

Diese Erkenntnis wurde 2013 auch schon von Wallner et al. beschrieben. Diese passten ihre Studienpopulation, die aus GS und Kontrolle bestand, für Geschlecht und Alter an und kamen in weiterer Folge zu dem Schluss, dass Personen mit GS einen niedrigeren BMI aufwiesen als die Kontrollgruppe. Darüber hinaus wies die ältere Kontrollgruppe einen signifikant höheren BMI auf als ihre angepasste GS-Gruppe. (Wallner et al., 2013c). Diese Erkenntnis wurde zudem auch bei der vorliegenden Population beobachtet.

Zu diesem Schluss kamen auch Jenko-Praznikar et al. während ihrer Forschungsarbeit 2013. Im Zuge dessen kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass die UCB-Konzentrationen bei übergewichtigen Personen erniedrigt waren und mit einem erhöhten Risiko für metabolisches Syndrom einhergingen (Jenko-Praznikar et al., 2013). Insofern stellt eine leicht erhöhte UCB-Konzentration im Serum, wie es bei der vorliegenden Auswertung der Fall war, möglicherweise einen präventiven Faktor hinsichtlich der Entwicklung des metabolischen Syndroms dar.

Obwohl die oben angeführte Korrelation (siehe Abbildung 28) diesen Zusammenhang zwischen UCB und BMI unterstreicht, ist bei der vorliegenden Studienpopulation die UCB-Konzentration bei den Normalgewichtigen erniedrigt und bei den Übergewichtigen erhöht. Dieses Resultat verläuft also konträr zu der in der Literatur gefunden und oben schon besprochenen Beobachtungen. Allerdings sei an dieser Stelle auch erwähnt, dass die Teilnehmeranzahl innerhalb der vorliegenden Gruppen nicht annähernd gleich groß ist und es vielleicht aus diesem Grund zu einem veränderten Resultat kommen konnte. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass diese Beobachtungen im fortgeschrittenen Alter nicht zutreffen und es sich in weiterer Folge um andere Mechanismen handeln, die die Bilirubinkonzentration in Abhängigkeit des BMI's im Alter determinieren.

Darüber hinaus wurde versucht einen möglichen Effekt der verschiedenen Interventionen hinsichtlich des BMI's der definierten Gruppen zu beschreiben. Die Resultate dazu finden sich in Tabelle 19.

**Tabelle 19: BMI Veränderung innerhalb der Gruppen von ZP 1 - ZP 3**

<b>Gruppe</b>	<b>Anzahl (n)</b>	<b>ZP</b>	<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>) (MW+Stdabw.)</b>	<b>p-Wert (T1-T3)</b>
<b>Training</b>	27	1	29,56 ± 5,29	0,736
		3	29,64 ± 5,74	
<b>Ernährung</b>	24	1	28,27 ± 3,88	0,086
		3	28,55 ± 3,60	
<b>Kontrolle</b>	23	1	27,99 ± 3,85	0,549
		3	28,08 ± 3,88	

Hinsichtlich dieser Ergebnisse ist eindeutig, dass es durch die Lebensstilintervention in keiner der Interventionsgruppen zu einer signifikanten Änderung des BMI's kam. Weiterführend konnte auch keine Veränderung des BMI's in der Gesamtpopulation nach den entsprechenden Interventionen ausgemacht werden (T1 - T3, p= 0,171; T1 - T4, p= 0,894). Die BMI's innerhalb

der einzelnen Interventionsgruppen zeigen über den gesamten Studienverlauf ebenso keine signifikante Veränderung.

Folglich wurden alle vorliegenden Parameter von Zeitpunkt 1 und Zeitpunkt 3 herangezogen und im Hinblick auf die BMI Klassifizierung statistisch ausgewertet. Das Ziel dieser Auswertung war es, einen Zusammenhang zwischen oxidativen Schäden sowie Parameter aus dem Fettstoffwechsel mit dem BMI zu assoziieren und somit Einflussfaktoren beschreiben zu können. Allerdings gab es in diesem Bezug keine signifikanten Unterschiede zwischen den BMI Gruppen. In Tabelle 20 sind die resultierenden Signifikanzwerte für die BMI-Klassifizierungen angeführt.

Tabelle 20: Signifikanzwerte aller Parameter bezogen auf BMI-Kategorie

ZP	Parameter	Normalgewicht (Median + IQR)	n	Übergewicht (Median+IQR)	n	p-Wert
1	<b>UCB</b>	5,15 (2,08)	25	5,96 (3,90)	64	0,056
3	( $\mu\text{mol/L}$ )	6,36 (2,69)	14	6,44 (4,20)	48	0,346
1	<b>LDL-C</b>	117,00 (46,00)	25	119,00 (53,00)	67	0,580
3	(mg/dL)	114,00 (61,50)	13	123,00 (68,00)	47	0,851
1	<b>Ox-LDL</b>	0,003 (0,01)	25	0,001 (0,01)	64	0,238
3	(mg/dL)	0,005 (0,01)	13	0,001 (0,01)	49	0,444
1	<b>8-oxo-Gua</b>	27,65 (30,20)	24	32,40 (30,50)	63	0,485
3	(nmol/mmol Kreatinin)	34,15 (27,32)	12	37,70 (28,40)	47	0,799
1	<b>8-oxo-dGua</b>	19,50 (19,77)	24	15,60 (17,80)	63	0,708
3	(nmol/mmol Kreatinin)	18,10 (21,65)	13	13,80 (10,40)	47	0,566
1	<b>SOD</b>	2081,00 (406,50)	17	2048,00	50	0,313
3	(IU/g Hb)	2134,50 (349,00)	12	(340,25) 2192,00 (285,00)	43	0,409
1	<b>KAT</b>	129,00 (38,00)	17	123,00 (47,25)	50	0,403
3	(IU/g Hb)	132,00 (28,75)	12	149,00 (43,00)	43	*0,026

\*  $p < 0,05$

Vor der Intervention gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Parameter zwischen den normal- und übergewichtigen Studienteilnehmern.

Nach der Intervention hingegen unterscheidet sich die Enzymaktivität der Katalase zwischen den BMI Gruppen signifikant voneinander.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Keaney et al. (2003) nicht überein. Die Autoren kamen dabei zu dem Schluss, dass Übergewicht zu einem vermehrten Auftreten von oxidativen Stress führt, da das Fettgewebe grundsätzlich die größte Quelle für erhöhte Plasmaoxidantien darstellt (Keaney et al., 2003). Betrachtet man jedoch das Durchschnittsalter der Studienpopulation bei Keaney et al. ( $60 \pm 10$  Jahre) stellt man fest, dass dieses etwas jünger ist als das vorliegende Studienkollektiv.

Boon et al. behandeln in weiterer Folge diese Beobachtung und verweisen auf den Einfluss des Lipidmetabolismus und dem allgemein niedrigeren Lipidprofil bei Personen mit GS und bezeichnen diesen Umstand als ausschlaggebend für den geringeren BMI in dieser Population (Boon et al., 2012). Allerdings ist die Altersverteilung bei der beschriebenen Studienpopulation wesentlich weitläufiger (18 - 63 Jahre) und jünger als die hier betroffene Studienpopulation.

Diesbezüglich könnte wiederum das Alter im Zusammenhang mit BMI einen wesentlichen Einfluss auf das Auftreten von oxidativem Stress haben und diesen in weiterer Folge beeinflussen.

Insofern gibt es in der vorliegenden Studienpopulation keinen signifikanten Unterschied bei genauerer Betrachtung der BMI Klassifikationen mit den oxidativen Parametern (siehe Tabelle 21). In diesem Zusammenhang wurden auch die Personen mit einem anfänglichen UCB-Konzentration  $\geq 17 \mu\text{mol/L}$  genauer analysiert, jedoch gab es bei dieser Gruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich oxidativer Parameter bzw. BMI.

### 4.3 LDL-Cholesterin und oxidiertes LDL

Im Hinblick auf die LDL-C Konzentration innerhalb der einzelnen Interventionsgruppen gab es über alle Studienzeitpunkte keine signifikanten Unterschiede (Training,  $p=0,127$ ; Ernährung,  $p=0,247$ ; Kontrolle,  $p=0,280$ ).

Es ist auch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu den ersten drei Zeitpunkten hinsichtlich der LDL-C Konzentration zu erkennen (ZP1,  $p=0,960$ ; ZP 2,  $p=0,676$ ; ZP 3,  $p=0,954$ ).

Bulmer et al. konnten im Zuge ihrer Studie von 2008 keinen Unterschied zwischen der GS Gruppe und Kontrollgruppe hinsichtlich der LDL-C Konzentrationen beschreiben. Wallner et al. wiesen jedoch im Zuge ihrer 2013 durchgeführten Studie darauf hin, dass Personen mit GS unter anderem eine erniedrigte LDL-C Konzentration als die Kontrollgruppe aufweisen (Bulmer et al., 2008a; Wallner et al., 2013c). Dieselbe Beobachtung beschrieben auch Boon et al. 2012 hinsichtlich der LDL-C Konzentrationen bei Personen mit GS (Boon et al., 2012).

Im Hinblick auf Personen mit einer UCB-Konzentration  $\geq 10 \mu\text{mol/L}$  konnte ebenso kein signifikanter Zusammenhang bezüglich der LDL-C Konzentration beobachtet werden.

In der vorliegenden Studienpopulation erhöhte sich bei der LDL-C Spiegel von 119 auf 125 mg/dl. Dieser Anstieg ist zwar statistisch signifikant, allerdings von keiner klinischen oder physiologischen Relevanz. Der Referenzwert für LDL-C in dieser Bevölkerungsgruppe entspricht einer Konzentration bis zu 140 mg/dL (Elmadfa et al., 2012). Die vorliegende Studienpopulation liegt gesamt betrachtet unterhalb dieses Referenzwertes.

Der Grund für die leichte Erhöhung der LDL-C Konzentration könnte möglicherweise eine im Zuge der Studie entstandene Gruppendynamik sein, die in weiterer Folge zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme führte. Im Zuge dieser Arbeit konnte kein erkennbarer Trend hinsichtlich des Zusammenhangs von UCB mit der LDL-C Konzentration beobachtet werden.

Es gibt einen moderat negativen Zusammenhang zwischen der UCB-Konzentration und dem oxidativem LDL ( $r = -0,356$ ,  $p = 0,031$ ). Diese Ergebnisse unterstreichen die in der Literatur oftmals erwähnte anti-oxidative Eigenschaft des Bilirubins und implizieren, dass mit steigender UCB-Konzentration im Blut die Konzentration an pro-atherogenem OxLDL sinkt. (Stocker, 2004; Vitek und Schwertner, 2009). Darüber hinaus könnten Veränderungen hinsichtlich des Lipid-Metabolismus eine Rolle des Bilirubins oder der UGT1A1 bezugnehmend auf die Modifikation des Fettstoffwechsels bedeuten (Bulmer et al., 2013).

Einen schwach negativen Zusammenhang gibt es auch bei zwischen dem LDL-C und dem 8oxodGua ( $r = -0,303$ ,  $p = 0,011$ ). Die Ergebnisse zeigen weiterführend, dass im Hinblick auf das LDL-C und das OxLDL ein schwach positiven Zusammenhang besteht ( $r = 0,332$ ,  $p = 0,039$ ). Somit geht eine erhöhte Konzentration von LDL-C mit einer erhöhten Konzentration von OxLDL einher und erhöht somit das Risiko für pro-atherogene bzw. kardiovaskuläre Ereignisse im Körper (Fraunberger et al., 2005).

Abschließend kam es durch die Lebensstilintervention weder im Gesamtstudienkollektiv noch innerhalb der Gruppen zu einer signifikanten Veränderung des OxLDL-Status.

#### **4.4 8-oxo-Guanin und 8-oxo-2'-Desoxyguanosin**

Bei 8oxoGua und 8oxodGua handelt es sich um zwei Metabolite, die sowohl im Blut als auch im Urin nachweisbar sind. Diese Biomarker sind Parameter, die die DNA (8oxodGua) bzw. RNA (8oxoGua) Oxidation und somit die oxidativen Schäden charakterisieren. Eine Erhöhung der 8oxodGua-Konzentration während des Alterungsprozesses könnte auf eine Erhöhung der oxidativen Schäden bzw. eine Verminderung der entsprechenden Reparaturmechanismen hindeuten (Olinski et al., 2007; Wallner et al., 2013c).

Bezüglich der Biomarker für oxidative Schäden gab es weder hinsichtlich des gesamten Studienkollektivs noch innerhalb der Gruppen signifikante Veränderungen: 8-Oxoguanin (8oxoGua) sowie 8-oxo-2'-Desoxyguanosin (8oxodGua) wurden in dieser Arbeit nicht wesentlich von der Lebensstil- und Ernährungsintervention beeinflusst, wie in Tabelle 15 klar ersichtlich ist. Bei genauerer Betrachtung der gemessenen Werte fällt jedoch auf, dass es zu einem geringfügigen Abfall der 8oxoGua-Konzentrationen nach dem Interventionszeitraum (Zeitpunkt 4 und 5) kommt.

In der Literatur scheinen die Beobachtungen in Bezug auf Lebensstilinterventionen mit dem Auftreten von oxidativen Stress und dessen Metabolite widersprüchlich (Poulson et al., 1998)

Bulmer et al. wies 2008 darauf hin dass Personen mit GS einen erhöhten anti-oxidativen Status im Serum aufweisen und darüber hinaus eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber Serum Oxidation. In einer weiteren Studie von Wallner et al. von 2013 untersuchten sie das anti-genotoxische Potential von Bilirubin bei Personen mit GS. Dabei untersuchten sie unter anderem die Konzentrationen von 8oxoGua und 8oxodGua, konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Konzentrationen dieser zwei Metaboliten zwischen Personen mit GS und den Kontrollen feststellen und verwiesen darauf, dass der protektive Effekte von Bilirubin in keinem Zusammenhang mit DNA-Schäden steht (Bulmer et al., 2008a; Wallner et al., 2013c).

Diese Schlussfolgerung kann auch für diese Arbeit herangezogen werden. Im Laufe der Studie kam es zu keiner signifikanten Veränderung der 8oxoGua- sowie 8oxodGua-Konzentration durch die Lebensstilintervention. Die Ergebnisse gelten sowohl für das Gesamtstudienkollektiv als auch für die einzelnen Gruppen. Somit konnte in dieser Arbeit kein Zusammenhang zwischen einer Lebensstilintervention und dem verminderten oder vermehrten Auftreten von DNA-Schäden beschrieben werden (Stocker, 2004, Bulmer et al., 2008a, Wallner et al., 2013c, Wagner et al., 2015).

Ebenso gab es keinen signifikanten Zusammenhang bei Personen mit einer UCB-Konzentration  $\geq 10 \mu\text{mol/L}$  und dem vermehrten oder verminderten Auftreten von oxidativen Schäden im Sinne von 8oxoGua bzw. 8oxodGua. Diesbezüglich unterstützen die hier beobachteten Erkenntnisse die protektive Wirkung von UCB gegenüber oxidativen Schäden nicht. Die häufig in der Literatur erwähnten erhöhten DNA Schäden, die im Zuge des Altersprozess vermehrt auftreten (Poulson et al, 1998; Broedbaek et al., 2013), wurden in dieser Arbeit nicht beobachtet. Allerdings gibt es zu diesem Thema mehrere Master- sowie Doktorarbeiten die sich mit derselben Studienpopulation befassen und das Auftreten von DNA-und Chromosomenschäden behandeln.

#### **4.5 Superoxiddismutase und Katalase**

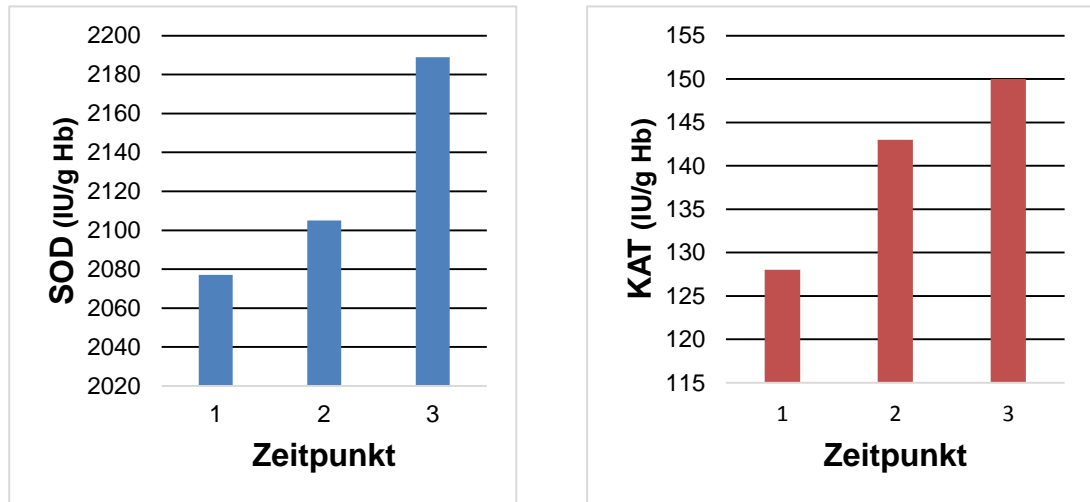
Die Superoxiddismutase kommt in verschiedene Isoformen vor und ist eines der effektivsten intrazellulären Enzyme mit anti-oxidativer Wirkung. Sie katalysiert den Abbau von Superoxidanionen zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid, welches in weiterer Folge von der Katalase neutralisiert wird (Landis und Tower, 2005). Die Aktivität der SOD im Muskel kann durch sportliche Aktivität gesteigert werden (Powers und Jackson, 2008).

Die Katalase befindet sich in den Peroxisomen von aeroben Zellen und gehört zu den enzymatischen Antioxidantien in unserem Körper. Sie katalysiert sehr effektiv die Konversion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff und besitzt sehr hohe Umsatzraten: 1 Molekül Katalase kann bis zu 6 Millionen Moleküle Wasserstoffperoxid pro Minute abbauen (Mates et al., 1999).

Es kam zu einer signifikanten Zunahme der anti-oxidativen Enzymaktivität der Superoxiddismutase ( $p=0,004$ ) und der Katalase ( $p=0,002$ ) in der Gesamtstudienpopulation. Im Hinblick auf die Katalase ist der Unterschied der Konzentrationen vom ersten Zeitpunkt bis zum zweiten ( $p=0,008$ ) als auch zum



dritten Zeitpunkt ( $p= 0,002$ ) in der Gesamtpopulation signifikant. Der Verlauf der Enzymaktivitäten im Gesamtstudienkollektiv ist in Abbildung 29 dargestellt.



**Abbildung 29: Verlauf der Enzymaktivitäten im Gesamtstudienkollektiv (dargestellt sind Mittelwerte)**

Bei der Superoxiddismutase hingegen ist der Unterschied vom ersten zum zweiten Zeitpunkt nicht signifikant ( $p= 0,456$ ), jedoch unterscheiden sich die Konzentrationen vor und nach der Intervention signifikant voneinander ( $p= 0,004$ ).

Bezugnehmend auf die Enzymaktivitäten der Superoxiddismutase und Katalase wurden darüber hinaus noch die Gruppenzugehörigkeiten zu den verschiedenen Zeitpunkten verglichen. Tabelle 21 erläutert die Unterschiede der Enzymaktivitäten innerhalb der einzelnen Gruppen vor und nach der Intervention.

Tabelle 21: Veränderung der SOD- und KAT-Enzymaktivität innerhalb der Gruppen

Parameter	ZP	Gruppe	Anzahl (n)	Median (IU/g Hb)	IQR	p-Wert
<b>SOD</b>	1	Training	28	1987,50	486,75	<i>*0,034</i>
	3		28	2146,50	244,75	
	1	Ernährung	22	2162,50	408,75	0,263
	3		22	2198,50	233,50	
	1	Kontrolle	24	2091,50	184,75	0,073
	3		24	2145,00	371,75	
<b>KAT</b>	1	Training	28	125,00	47,75	<i>**0,013</i>
	3		28	146,00	53,50	
	1	Ernährung	22	124,50	54,75	0,299
	3		22	142,50	56,25	
	1	Kontrolle	24	127,00	43,50	0,073
	3		24	148,50	40,00	

\* p < 0,05

\*\* p < 0,02

In dieser Tabelle ist klar ersichtlich, dass es innerhalb der Trainingsgruppe zu einem signifikanten Anstieg hinsichtlich der Aktivität der SOD als auch der KAT zwischen dem ersten und dritten Zeitpunkt der Studie gekommen ist. Dieser Unterschied ist jedoch nur in der Trainingsgruppe vorhanden und weder in der Ernährungs- noch in der Kontrollgruppe erkennbar.

Betrachtet man die einzelnen Gruppen separat und über alle Zeitpunkte hinweg, so kommt man zu der Erkenntnis, dass sich die SOD Enzymaktivität signifikant in der Gruppe Ernährung ( $p=0,011$ ) und die KAT Enzymaktivität signifikant in der Gruppe Training ( $p=0,011$ ) verändert. Die KAT-Aktivität nimmt in der Gruppe Training von Zeitpunkt 1 bis Zeitpunkt 3 um 22% ( $p=0,013$ ) zu. Die SOD-Aktivität steigt in der Gruppe Ernährung von Zeitpunkt 2 zu Zeitpunkt 3 um 6% ( $p=0,005$ ). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

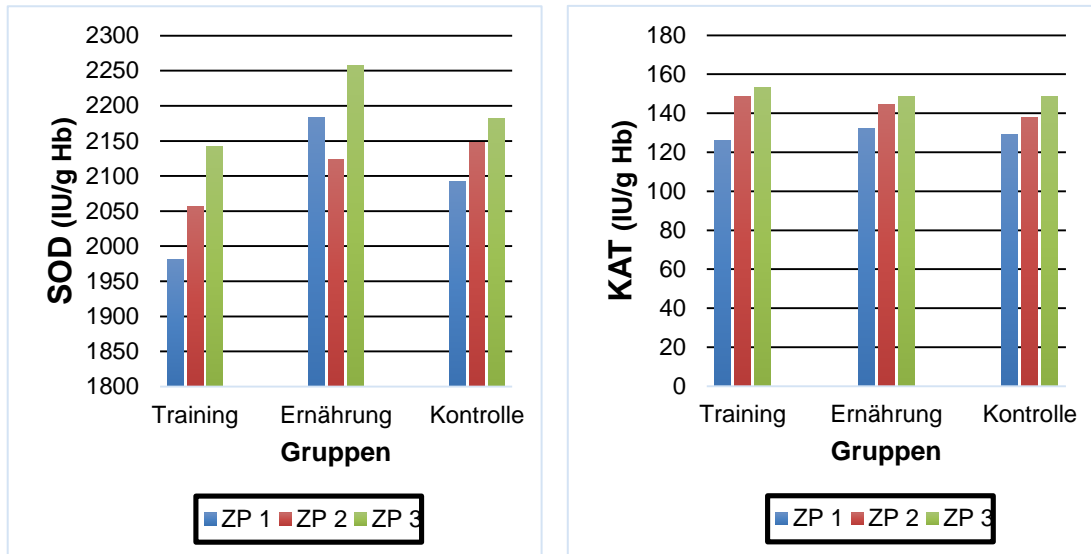
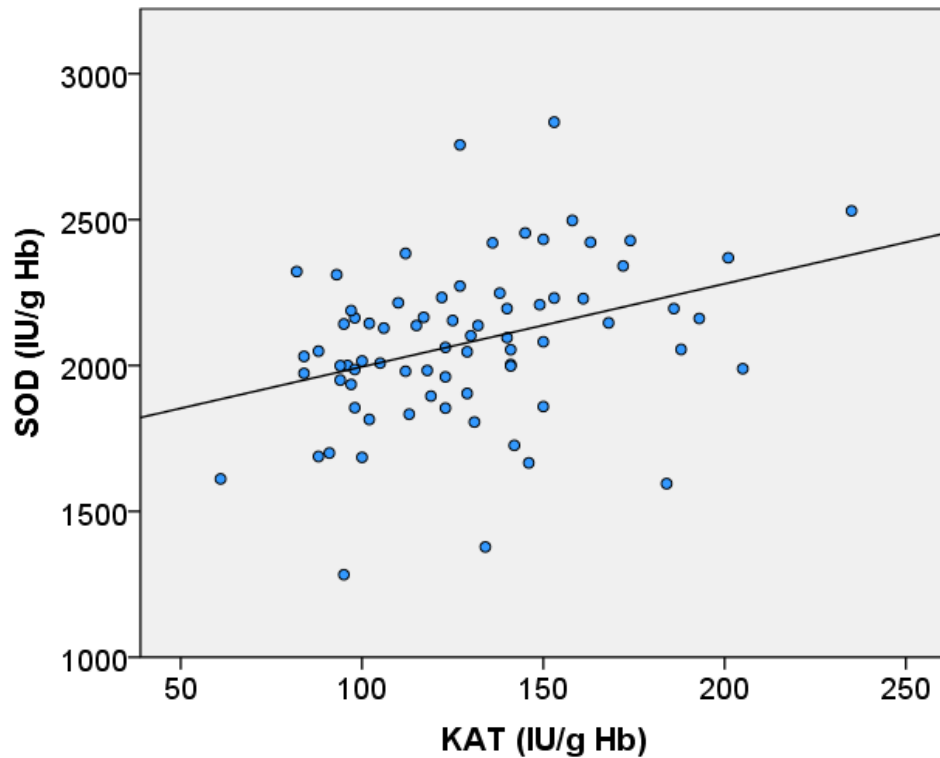


Abbildung 30: Änderungen der Enzymaktivitäten im Zuge der Intervention innerhalb der Gruppen (dargestellt sind Mittelwerte)

Es wurde auch ein schwach positiver Zusammenhang zwischen den anti-oxidativ wirksamen Enzymen SOD und KAT beobachtet ( $r=0,276$ ,  $p=0,019$ , Abbildung 31). Diese Aktivitätszunahme der beiden Enzyme kam mitunter auch durch die Trainingsintervention zustande und lässt darauf schließen, dass beide Enzymaktivitäten voneinander abhängig sind bzw. zusammenarbeiten und durch einen entsprechenden körperlichen Reiz induziert werden.



**Abbildung 31: Korrelation zwischen SOD und KAT**

Betrachtet man die hier vorliegenden Ergebnisse hinsichtlich Enzymaktivitäten von KAT und SOD, so kommt man zu dem Schluss, dass die vollzogene Lebensstilintervention einen positiven Effekt auf die anti-oxidativen Schutzmechanismen im Körper hat. Insofern stellt ein regelmäßiges körperliches Training im fortgeschrittenen Alter eine gute Basis für einen verbesserten anti-oxidative Schutz dar.

Abschließend gilt es auch zu erwähnen dass eine schwach positive Korrelation zwischen der Enzymaktivität von KAT und UCB ( $r= 0,276$ ,  $p= 0,019$ ) gibt, was wiederum die anti-oxidative Wirksamkeit einmal mehr in den Vordergrund rückt.

## 5) Schlussbetrachtung

Nach der statistischen Auswertung aller verfügbaren Parameter kommt man zu dem Erkenntnis, dass die in der vorliegenden Studie angewandte Lebensstilintervention keine signifikante Veränderung der UCB-Konzentration mit sich bringt. In keiner der Interventionsgruppen noch in der Gesamtstudienpopulation konnte eine Veränderung der Bilirubin Werte über alle fünf Zeitpunkte der Intervention beobachtet werden.

Zu den weitaus interessanteren Ergebnissen zählen die signifikant positive Korrelation zwischen dem Alter und der UCB-Konzentration zum ersten Studienzeitpunkt, bzw. die signifikant negative Korrelation zwischen dem BMI und der UCB-Konzentration bei Probanden mit einem Bilirubin Spiegel  $\geq 10 \mu\text{mol/L}$ . Diese beiden Resultate sind nicht alleine Beobachtungen dieser Arbeit, sondern spiegeln sich schon in einer Vielzahl von anderen Studienergebnissen wieder (Bulmer et al., 2008a, Wallner et al., 2013c, Boland et al., 2014).

Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass Bilirubin in Zusammenhang mit einem erniedrigten Körpergewicht steht, was wiederum im fortgeschrittenen Alter mit der Prävention von kardiovaskulären Ereignissen einhergeht (Leitzmann et al., 2011)

Darüber hinaus spiegelt sich auch die Steigerung der Enzymaktivitäten, der Superoxiddismutase sowie Katalase in einigen anderen Arbeiten wieder. Diese Steigerung wurde innerhalb beider Interventionsgruppen beobachtet und ebenso durch bereits durchgeführte Studien untermauert.

Powers und Jackson (2008) berichteten dabei, dass die Aktivität der SOD durch Intensität und Dauer von Training beeinflussbar ist. Darüber hinaus liefert diese Aktivitätssteigerung dieser Enzyme einen erhöhten Schutz vor oxidativen Einflüssen und gilt somit als stark präventiver Faktor.

Weitere Parameter, die im Laufe dieser Arbeit behandelt worden sind, wie das LDL-C, OxLDL, 8oxoGua, 8oxodGua sowie der BMI ergaben keine signifikanten Änderungen durch die Intervention. Weder innerhalb der Gruppen, noch zwischen den Gruppen gab es zu den jeweiligen vorgegebenen Studienzeitpunkten einen signifikanten Unterschied.

Ein Teil der hier vorliegenden Ergebnisse lässt darauf schließen, dass mit einer erhöhten UCB-Konzentration im Blut die Konzentration der oxidativ wirkenden Parameter teilweise erniedrigt ist, bzw. der Anteil an anti-oxidativen Enzymen erhöht ist und bestätigen die Ergebnisse von Maruhashi et al. (2012), Vitek et al. (2002) sowie Vitek und Schwertner (2009). Es gibt in diesem Zusammenhang einige Studien, die zeigen, dass regelmäßiges Training vor allem bei Personen im fortgeschrittenem Alter zur Reduktion von oxidativem Stress durch Promotion der anti-oxidativen Kapazität führen kann und somit DNA-Reparatur- sowie Abwehrmechanismen adaptiert werden können (Goon et al., 2008). Zum einen ist dies bei der vorliegenden Studie der Fall, da es zur Aktivitätszunahme der SOD und KAT kommt, andererseits gibt es keine signifikante Veränderung der oxidativen Parameter.

## 6) Zusammenfassung

Das primäre Ziel der Vienna Active Ageing Studie war die Auswirkung einer kontrollierten Ernährungs- sowie Trainingsintervention auf die körperliche Leistungsfähigkeit, den Ernährungsstatus und der Lebensqualität von SeniorInnen zu erforschen. Diese Intervention wurde über 6 Monate hinweg 2 Mal pro Woche vollzogen und geschah unter der Aufsicht eines geschulten Expertenteams. Die Studiendauer betrug 18 Monate.

Die vorliegende Arbeit stellt dabei nur eine Teilauswertung der 2011 begonnen Studie dar, deren Fokus auf der Auswertung und Interpretation der UCB-Konzentrationen in Hinblick auf physiologische Parameter bei Personen im fortgeschrittenen Alter liegt.

In diesem Zusammenhang wurden die damals gesammelten Serumproben der Probanden entsprechend aufgearbeitet und die UCB-Konzentration mit Hilfe einer HPLC ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der UCB-Konzentration und dem Alter gibt, dahingehend, dass mit fortschreitendem Alter die Bilirubinkonzentration zunimmt ( $r = 0,203$ ;  $p = 0,043$ ). In weiterer Folge wurde eine negative Korrelation hinsichtlich der UCB-Konzentration mit dem BMI ermittelt ( $r = -0,622$ ,  $p = 0,031$ ). Darüber hinaus kam es im Zuge der Trainings- und Ernährungsintervention zu einer Aktivitätssteigerung der antioxidativ wirksamen Enzyme, Katalase und Superoxiddismutase (KAT,  $p = 0,011$ ; SOD,  $p = 0,011$ ). In weiterer Folge konnten im Laufe dieser Arbeit keine signifikanten Veränderungen hinsichtlich der oxidativen sowie DNA- bzw. RNA-Schäden beobachtet werden.

Abschließend bleibt zu erwähnen, dass die Datenlage bezüglich der längerfristigen Veränderungen der Bilirubinkonzentration während des Alterungsprozesses bzw. bei älteren Personen mangelhaft ist und aus diesem Grund weiterer Forschungsbedarf für populationsbasierte Studien herrscht.

## 7) Summary

The primary objective of the Vienna Active Ageing Study was to investigate the effects of a long term nutritional and training intervention on physical performance, nutritional status and quality of life of the elderly people. This intervention was performed over 6 months twice a week and was maintained under the supervision of an educated team of experts. The duration of the whole study was 18 months.

The present thesis represents one part of the study which started in 2011. The focus of this work is the evaluation and interpretation of the UCB-concentration in regard to physiological parameters in subjects at advanced age.

In this context the collected serum samples from the participants were treated in the appropriate way and the UCB-concentration was measured with reversed phase HPLC.

We could show a significant, positive correlation between the UCB-concentration and age, meaning the higher the age the higher the UCB-concentration ( $r= 0,203$ ;  $p= 0,043$ ). In addition to these findings, there was a significant negative correlation between UCB-concentration and the BMI ( $r= -0,622$ ,  $p= 0,031$ ). Moreover a significant increase in the anti-oxidative enzymes Catalase as well as Superoxiddismutase was observed in the training and nutritional intervention group (KAT,  $p= 0,011$ ; SOD,  $p= 0,011$ ).

There were no significant changes in oxidative damage or DNA and RNA damage marker.

Finally, data according to long term changes of the bilirubin concentration alongside the ageing process is rare and therefore much more population-based studies in this field needed.



## 8) Quellenangabe

Abraham NG, Kappas A. Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol Reviews*, 2008; 60: 79 – 127.

Asad SF, Singh S, Ahmad A, Khan NU, Hadi SM. Prooxidant and antioxidant activities of bilirubin and its metabolic precursors biliverdin: a structure-activity study. *Chemico-Biological Interactions* 2001; 137: 59 – 74.

Bergmann K, Pachota E, Odrowaz-Sypniewska G. Association of serum total bilirubin with traditional and novel cardiovascular risk factors in apparently healthy subjects. *Folia Medica Copernicana* 2015; 3 (1): 26 – 31.

Bisht K, Tampe J, Shing C, Bakrania B, Winearls J, Fraser J, Wagner KH, Bulmer AC. Endogenous tetrapyrroles influence leukocyte responses to lipopolysaccharide in human blood: pre-clinical evidence demonstrating the anti-inflammatory potential of biliverdin. *Journal of Clinical and Cellular Immunology* 2014; 5: 1000218.

Boland BS, Dong MH, Bettencourt R, Barrett-Connor E, Looma R. Association of serum bilirubin with ageing and mortality. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* 2014; 4: 1 – 7.

Boon AC, Hawkins CL, Bisht K, Bakrania B, Coombes JS, Wagner KH, Bulmer AC. Reduced circulating oxidized ldl is associated with hypocholesterolemia and enhanced thiol status in gilbert's syndrome. *Free Radical Biology and Medicine* 2012; 52: 2120 – 2127.

Bosma PJ, Chowdhury JR, Bakker C, Gantla S, de Boer A, Oostra BA, Lindhout D, Tytgat GNJ, Jansen PLM, Oude-Elferink RPJ, Chowdhury NR. The genetic basis of the reduced expression of bilirubin UDPglucuronosyltransferase 1 in Gilbert's syndrome. *The New England Journal of Medicine* 1995; 333: 1171 – 1175.

Bratic A, Larsson NG. The role of mitochondria in ageing. *Journal of Clinical Investigation* 2013; 123 (3): 951 – 957.

Broedbaek K, Siersma V, Henriksen T, Weimann A, Petersen M, Andersen JT, Jimenez-Solem E, Hansen LJ, Henriksen JE, Bonnema SJ, Olivarius NdF, Poulsen HE. Association between urinary markers of nucleic acid oxidation and mortality in type 2 diabetes: a population-based cohort study. *Diabetes Care* 2013; 36: 669 – 676.

Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK. Aging and proinflammatory cytokines. *Current Opinion in Hematology* 2001; 8 (3): 131 – 136.

Bulmer AC, Blanchfield JT, Toth I, Fassett RG, Coombes JS. Improved Resistance to serum oxidation in Gilbert's syndrome: A mechanism for cardiovascular protection. *Atherosclerosis* 2008a; 199: 390 – 396.

Bulmer AC, Ried K, Blachfield JT, Wagner KH. The anti-mutagenic properties of bile pigments. *Mutation Research* 2008b; 658: 28 – 41.

Bulmer AC, Verkade HJ, Wagner KH. Bilirubin and beyond: A review of lipid status in Gilbert's syndrome and its relevance to cardiovascular disease protection. *Progress in Lipid Research* 2013; 52: 193 – 205.

BZgA (Bundeszentrale Für Gesundheitliche Aufklärung). Leitbegriffe der Gesundheitsförderung und Prävention Glossar zu Konzepten, Strategien und Methoden. Verlag für Gesundheitsförderung, Werbach-Gamburg, Neuausgabe 2011.

Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R, Follo C, Santambrogio L. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. *Journal of proteomics* 2011; 74: 2313 – 2323.

Choi SH, Yun KE, Choi HJ. Relationship between serum total bilirubin levels and metabolic syndrome in Korean adults. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 2011; 23 (1): 31 – 37.

Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel JP, Rolland Y, Schneider SM, Topinkova E, Vandewoude, Zamboni M. Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis. *Age and Ageing* 2010; 39: 412 – 423.

Datla SR, Dusting GJ, Mori TA, Taylor CJ, Croft KD, Jiang F. Induction of heme oxygenase-1 in vivo suppresses NADPH oxidase derived oxidative stress. *Hypertension* 2007; 50: 636 – 642.

De la Fuente M, Miquel J. An update of the oxidation-inflammation theory of aging: the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging. *Current Pharmaceutical Design* 2009; 15 (26): 3003 – 3026.

Deetman PE, Bakker SJL, Dullaart RPF. High sensitive C-reactive protein and serum amyloid A are inversely related to serum bilirubin: effect-modification by metabolic syndrome. *Cardiovascular Diabetology* 2013; 12: 166 – 174.

Elmadfa, I. et al. Österreichischer Ernährungsbericht 2012. 1.Auflage, Wien, 2012.

Elmadfa & Leitzmann. Ernährung des Menschen; 4 Auflage, Wien (2004).

Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, de Luca M, Ottaviani E, de Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Annals of the New York Academy Science* 2000; 908: 244 – 254.

Fraunberger P, Wang Y, Blessing FJ, Seidel D, Walli AK. Atherogenese: Wechselspiel zwischen Cholesterolin, Inflammation und Koagulation. *Herz* 2005; 30: 723 – 732.

Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1988; 85 (24): 9748 – 9752.

Gill R, Tsung A, Billiar T. Linking oxidative stress to inflammation: toll-like receptors. *Free Radical Biology and Medicine* 2010; 48 (9): 1121 – 1132.

Goon JA, Noor Aini AH, Musalmah M, Yasmin Anum MY, Wan Ngah WZ. Long Term Tai Chi Exercise Reduced DNA Damage and Increased Lymphocyte Apoptosis and Proliferation in Older Adults. *Medical Journal Malaysia* 2008; 63 (4): 319 – 324.

Haga Y, Tempero MA, Zetterman RK. Unconjugated bilirubin inhibits in vitro cytotoxic T lymphocyte activity of human lymphocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; 1317: 65 – 70.

Harman D. Ageing: Overview. *Annals of the New York Academy of Science* 2001; 928: 1 – 21.

Horsefall LJ, Nazareth I, Pereira SP, Peterson I. Gilbert's syndrome and the risk of death: A population-based cohort study. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2013; 28: 1643 – 1647.

Jenko-Praznikar Z, Petelin A, Jurdana M, Ziberna L. Serum bilirubin levels are lower in overweight asymptomatic middle age adults: an early indicator of metabolic syndrome? *Metabolism Clinical and Experimental* 2013: 976 – 985.

Jiraskova A, Novotny J, Novotny L, Vodicka P, Pardini B, Naccarati A, Schwertner HA, Hubacek JA, Puncocharova L, Smerhovsky Z, Vitek L. Association of serum bilirubin and promoter variations in HMOX1 and UGT1A1 genes with sporadic colorectal cancer. *International Journal of Cancer* 2012; 131: 1549 – 1555.

Keaney JF, Larson MG, Vasan RS, Wilson PW, Lipinska I, Corey D, Massaro JM, Sutherland P, Vita JA, Benjamin EJ. Obesity and systemic oxidative stress: clinical correlates of oxidative stress in the Framingham Study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2003; 23: 434 – 439.

Kim SY, Park SC. Physiological antioxidative network of bilirubin system in ageing and age-related diseases. *Pharmacology* 2012; 3 (45): 183 – 191.

Kirkwood TB. Understanding the odd science of aging. *Cell* 2005; 120: 437–447.

Knight J, Nigam Y. The anatomy and physiology of ageing. Part 1—the cardiovascular system. *Nursing Times* 2008; 104 (31): 26 – 27.

Köhler J, Leonhäuser IT. Changes in Food Preferences during Aging. *Annals of Nutrition and Metabolism* 2008; 52: 15 – 19.

Kundur AR, Singh I, Bulmer AC. Bilirubin, platelet activation and heart disease: A missing link to cardiovascular protection in Gilbert's syndrome? *Atherosclerosis* 2015; 239: 73 – 84.

Landis GN, Tower J. Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mechanisms of Ageing and Development* 2005; 126: 365 – 379.

Leitzmann MF, Moore SC, Koster A, Harris TB, Park Y, Hollenbeck A, Schatzkin A. Waist circumference as compared with body-mass index in predicting mortality from specific causes. *PLOS ONE* 2011; 6 (4): e18552.

Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *Journal of the American College of Cardiology* 2009; 54: 2129 – 2138.

Mackenzie PI, Gardner-Stephen DA, Miners JO. UDP-Glucuronosyltransferase. *Comprehensive Toxicology* 2010; 2 (4): 413 – 434.

Maruhashi T, Soga J, Fujimura N, Idei N, Mikami S, Iwamoto Y, Kajikawa M, Matsumoto T, Kihara Y, Chayama K, Noma K, Nakashima A, Tomiyama H, Takase B, Yamashina A, Higashi Y. Hyperbilirubinemia, augmentation of endothelial function, and decrease in oxidative stress in gilbert syndrome. *Circulation* 2012; 126: 598 – 603.

Mates JM, Perez-Gomez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 1999, 32: 595 – 603.

Miners JO, McKinnon RA, Mackenzie PI. Genetic Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase and their functional significance. *Toxicology* 2002; 181-182: 453 – 456.

Morley J.E. Frailty: Diagnosis and Management. *The Journal of Nutrition, Health and Aging* 2011; 15 (8): 667 – 670.

Neuzil J, Stocker R. Free and albumin-bound bilirubin is an efficient co-antioxidant for  $\alpha$ -Tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *Journal of biological chemistry* 1994; 269 (24):16712 – 16719.

Nigam Y, Knight J, Bhattacharya S, Bayer A. Physiological Changes associated with ageing and immobility. *Journal of Ageing Research* 2012; 12: 1 – 2.

Olinski R, Siomek A, Rozalski R, Gackowski D, Foksinski M, Guz J, Dziaman T, Szpila A, Tudek B. Oxidative damage to DNA and antioxidant status in aging and age-related diseases. *Acta Biochimica Polonica* 2007; 54 (1): 11 – 26.

Oliveria BF, Nogueira-Machado JA, Chaves MM. The role of oxidative stress in the ageing process. *The Scientific World Journal* 2010; 10: 1121 – 1128.

O'Mally SS, Ran Wu MS, Mayne ST, Jatlow PI. Smoking cessation is followed by increase in serum bilirubin, an endogenous antioxidant associated with lower risk of lung cancer and cardiovascular disease. *Nicotine & Tobacco Research* 2014; 16 (8): 1145 – 1149.

Ong KL, Allison MA, Cheung BMY, Wu BJ, Barter PJ, Rye KA. The Relationship between Total Bilirubin Levels and Total Mortality in older Adults: The United States national health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999 – 2014 *PLoS ONE* 2014; 9: e94479.

Poulsen HE, Loft S, Prieme H, Vistisen K, Lykkesfeldt J, Nyssonen K, Salonen JT. Oxidative DNA damage in vivo: relationship to age, plasma antioxidants, drug metabolism, glutathione-S-transferase activity and urinary creatinine excretion. *Free Radical Research* 1998; 29: 565 – 571.

Powers SK, Jackson MJ. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Reviews* 2008; 88: 1243 – 1276.

Rahman K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging* 2007; 2 (2): 219 – 236.

Rocuts F, Zhang X, Yan J, Yue Y, Thomas M, Bach FH, Czismadia E, Wang H. Bilirubin promotes de novo generation of T regulatory cells. *Cell Transplant* 2010; 19: 443 – 451.

Schwager C. Silver Ager – Kommunikation 50+. *Ernährung im Fokus* 2012; 01: 8 – 13.

Sedlak TW, Saleh M, Higginson DS, Paul BD, Juluri KR, Snyder SH. Bilirubin and glutathione have complementary antioxidant and cytoprotective roles. *National Academy of Science of the USA* 2009; 106 (13): 5171 – 5176.

Sedlak TW, Snyder SH. Bilirubin Benefits: Cellular Protection by a Biliverdin Reductase Antioxidant Cycle. *Pediatrics* 2004; 113 (6): 1776 – 1782.

Silbernagl S. & Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie. 6 Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2003).

Slijepcevic P. DNA damage response, telomere maintenance and ageing in light of the integrative model. *Mechanisms of Ageing and Development* 2008; 129 (1-2): 11 – 16.

Stocker R. Antioxidant Activities of bile pigments. *Antioxidants & Redox Signaling* 2004; 6 (5): 841 – 849.

Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 1987; 235 (4792): 1043 – 1046.

Strassburg CP, Lankisch TO, Manns MP, Ehmer U. Family 1 uridine-5'-diphosphate glucuronosyltransferase (UGT 1A): From Gilbert's Syndrome to genetic organization and variability. *Archives of Toxicology* 2008; 82 (7): 415 – 433.

Sugatani J. Function, Genetic Polymorphism, and Transcriptional Regulation of Human UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A1. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 2013; 28 (2): 83 – 92.

Targher G. Risk of ischemic stroke and decreased serum bilirubin levels – is there a causal link? *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2014; 34: 702 – 704.

Temme EHM, Zhang J, Schouten EG, Kesteloot H. Serum bilirubin and 10 year mortality risk in a Belgian population. *Cancer Causes and Control* 2001; 12: 887 – 894.

Tomaro ML, Batlle AMC. Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. *The international Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2002; 34: 216 – 220.

Visser M, Pahor M, Taaffe DR, Goodpaster BH, Simonsick EM, Newman AB, Nevitt M, Harris TB. Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: The health abc study. *Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Science* 2002; 57: M326 – M332.

Vitek L. The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases. *Pharmacology* 2012; 3 (55): 192 – 198.

Vitek L, Jirsa M, Brodanova M, Kalab M, Marecek Z, Danzig V, Novotny L, Kotal P. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis* 2002; 160 (2): 449 – 456.

Vitek L, Ostrow JD. Bilirubin Chemistry and Metabolism; Harmful and Prospective Aspects. *Current Pharmaceutical Design* 2009; 15: 2869 – 2883.

Vitek L, Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Advanced Clinical Chemistry* 2007; 43: 1 – 57.



Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B. Biomarkers of Ageing: From Function to molecular biology. *Nutrients* 2016; 8 (338): 1 – 12.

Wagner KH, Wallner M, Mölzer C, Gazzin S, Bulmer AC, Tiribelli C, Vitek L. Looking to the horizon: the role of bilirubin in the development and prevention of age-related chronic diseases. *Clinical Science* 2015; 129: 1 – 25.

Wallner M, Marculescu R, Doberer D, Wolzt M, Wagner O, Vitek L, Bulmer AC, Wagner KH. Protection from age related increase in lipid biomarkers and inflammation contributes to cardiovascular protection in Gilbert's syndrome. *Clinical Science* 2013a; 125: 257 – 264.

Wallner M, Bulmer AC, Mölzer C, Mullner E, Marculescu R, Doberer D, Wolzt M, Wagner OF and Wagner KH. Haem catabolism: a novel modulator of inflammation in Gilbert's syndrome. *European Journal of Clinical Investigation* 2013b; 43 (9): 912 –919.

Wallner M, Antl N, Rittmannsberger B, Schreidl S, Najafi K, Mullner E, Mölzer C, Ferik F, Knasmüller S, Marculescu R, Doberer D, Poulsen HE, Vitek L, Bulmer AC, Wagner KH. Anti-genotoxic potential of bilirubin in vivo: damage to DNA in hyperbilirubinemic human and animal models. *Cancer Prevention Research* 2013c; 6: 1056 – 1063.

Wang X, Chowdhury JR, Chowdhury NR. Bilirubin Metabolism: Applied physiology. *Current Paediatrics* 2006; 16: 70 – 74.

Watchko JF, Tiribelli C. Bilirubin-induced neurologic damage – mechanisms and management approaches. *The New England Journal of Medicine* 2013; 369: 2021 –2030.

Wen CP, Zhang F, Liang D, Wen C, Gu J, Skinner H, Chow WH, Ye Y, Pu X, Hildebrandt MAT, Huang M, Chen CH, Hsiung CA, Tsai MK, Tsao CK, Lippmann SM, Wu X. The Ability of Bilirubin in Identifying Smokers with higher risk of lung cancer: A large Cohort Study in Conjunction with Global Metabolomic Profiling. *Clinical Cancer Research* 2015; 21 (1): 193 – 200.

Yesilova Z, Serdar M, Ercin CN, Gunay A, Kilciler G, Hasimi A, Uygun A, Kurt I, Erbil MK, Dagalp K. Decreased oxidation susceptibility of plasma low density lipoproteins in patients with Gilbert's Syndrome. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2008; 23 (10): 1556 – 1560.

Zelenka J, Lenicek M, Muchova L, Jirsa M, Kudla M, Balaz P, Zadinova M, Ostrow JD, Wong RJ, Vitek L. Highly sensitive method for quantitative determination of bilirubin in biological fluids and tissues. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2008; 867 (1): 37 – 42.

Zhang F, Wen CP, Liang D, Skinner H, Gu J, Chow WH, Ye Y, Hildebrandt MAT, Pu X, Huang M, Tsai MK, Tsao CK, Wu X. Metabolomic profiling identifies bilirubin as a novel serum marker of lung cancer. *Cancer Research* 2013; 73 (1): 10.

Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin- interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nature Immunology* 2010; 11 (2): 136 – 140.

Zucker SD, Horn PS, Sherman KE. Serum bilirubin levels in the U.S. population: gender effect and inverse correlation with colorectal cancer. *Hepatology* 2004; 40: 827 – 835.

### **Internetquellen:**

[1] [http://www.statistik.at/web\\_de/statistiken/index.html](http://www.statistik.at/web_de/statistiken/index.html)

[2] <http://www.nutricia.at/produkte/ernaehrung-im-alter-und-bei-krankheit/sortiment/fortifit/produktsortiment/132>

[3] <http://www.nutricia.at/produkte/ernaehrung-im-alter-und-bei-krankheit/sortiment/fortifit>

[4] <http://www.nutricia.at/produkte/ernaehrung-im-alter-und-bei-krankheit/sortiment/fortifit/fortifit-anwendung>

[5] <http://graphpad.com/quickcalcs/molarityform.cfm>

[6] <http://activeageing.univie.ac.at/>

[7] [http://www.bmgf.gv.at/home/Gesundheit/Ernaehrung/Rezepte\\_Broschueren\\_Berichte/Ernaehrung\\_im\\_Alter](http://www.bmgf.gv.at/home/Gesundheit/Ernaehrung/Rezepte_Broschueren_Berichte/Ernaehrung_im_Alter)