

Diplomarbeit

**Änderung des Redox-Zustandes von humanem Albumin
unter ionisierender und ultravioletter Strahlung**

eingereicht von

Daniel Domes

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am/an

**Institut für Physiologische Chemie
Universitätsklinik für Strahlentherapie - Radioonkologie**

unter der Anleitung von

**Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Karl Öttl
Dipl.-Ing. Dr. Peter Winkler, MAS**

Graz, am 22.11.2017

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 22.11.2017

Daniel Domes eh

Danksagung

Zu Beginn will ich meinen Betreuern Prof. Mag. Dr. Karl Öttl und Dipl.-Ing. Dr. Peter Winkler danken. Nur mit ihrer Hilfe war es mir möglich, diese Diplomarbeit fertig zu stellen. Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Öttl, der mir mit seiner Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft bei schwierigen Fragestellungen stets zu Seite stand.

Ferner möchte ich mich bei der Frau Doris Payer und Mag. Dr. Vera Fengler für die tatkräftige Unterstützung bei der Laborarbeit bedanken.

Weiterer Dank gilt meiner Familie. Ohne meinen Vater Heinz, meine Mutter Michaela und meine Schwester Sarah wäre ich nicht in der Lage gewesen, diese Arbeit abzuschließen.

Ich danke meinen Freunden und allen anderen Menschen, die mich während dem Studium begleitet haben. Dank gilt auch meiner geliebten Eva, die mich besonders im letzten Jahr angespornt hat und mich nie im Stich gelassen hat.

Zusammenfassung

Fragestellung:

In einigen Arbeiten wurde die Veränderung von Albumin unter erhöhtem oxidativem Stress festgestellt. Es zeigte sich, dass sich die reduzierte Form des Albumins (HMA) zu Gunsten der oxidierten Formen (HNA1 und HNA2) verringert hatte.

Ionisierende Strahlung, die in der Krebstherapie eingesetzt wird, erzeugt oxidativen Stress im malignen und ungewollt im gesunden Gewebe. Es stellt sich die Frage: Hat dieser durch Strahlung ausgelöste oxidative Stress eine Veränderung des Albumins, des häufigsten Plasmaeiweißes, zur Folge? In dieser Arbeit soll geklärt werden, ob in vitro bestrahlte Albumin-Proben unterschiedlichster Art einer Veränderung ihres Redox-Zustandes unter ionisierender und UV-Strahlung unterworfen sind.

Methode:

Albumin-Lösungen, Plasma und Vollblut wurden mit verschiedenen Strahlungsdosen zwischen 1 Gray und 100 Gray bestrahlt. Die Strahlung wurde mittels eines Linearbeschleunigers appliziert und die Veränderung des Albumins mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) vermessen. Die Daten wurden mit der Software PeakFit quantitativ ausgewertet. In weiterer Folge wurde der Einfluss von UV-Strahlung auf Albuminproben (Sigma-Aldrich), HNA1 und HMA ebenfalls auf Veränderungen des Redox-Zustandes untersucht. Der Ausschluss einer Aggregatbildung wurde mit einem Partikel-Analyser durchgeführt.

Ergebnis:

Die Versuche mit ionisierender Strahlung konnten die Annahme, der oxidative Stress würde in vitro eine Veränderung der Albuminfraktionen zu Gunsten der oxidierten Formen verschieben, nicht bestätigen. Eine konzentrationsunabhängige oxidative Veränderung konnte nicht festgestellt werden. Änderungen der Zusammensetzung der Proben sind eher auf Schwankungsbreite der Analytik bzw. des Handlings der Proben zurückzuführen.

In den Versuchen mit UV-Strahlung zeigte sich eine Oxidation des Albumins. Jedoch konnte die Art der Veränderung durch die Messung mit der HPLC nicht festgestellt werden. Für die Differenzierung der Veränderungen müssten weitere Tests durchgeführt werden. In Anwesenheit von Ascorbinsäure konnte die Oxidation stark verlangsamt und sogar weitgehend gestoppt werden.

Es konnte jedoch ausgeschlossen werden, dass eine Aggregatbildung für die Ergebnisse verantwortlich war.

Abstract

Background

Ionizing radiation, which is used in the treatment of cancer, produces reactive oxygen species. These so-called ROS cause the intended damage in cancer cells. Unfortunately, damages occur in healthy tissue too.

Albumin, the most abundant plasma protein, has a free thiol-group at Cys-34 and this free thiol-group is available for redox-reactions. Does the ionizing radiation cause any damage or change to that group?

Furthermore, albumin was irradiated with UV-radiation to compare if there were any damages when a radiation with less energy is used. If there are any changes, ascorbic acid was used to show its ability to prevent or slow down the process.

Methods:

Albumin samples in plasma-solutions, whole blood samples and albumin samples (HNA1 and Grifols-albumin) were irradiated with an effective dose of 1 Gy to 100 Gy.

The samples were analysed with high performance liquid chromatography (HPLC) to detect any change in the redox state of Cys-34.

The albumin samples in the experiments with UV were also measured with HPLC. Furthermore, a particle analyser (Anton Paar) was used to measure the diameter of the particles.

Results:

The hypothesis that oxidative stress due to ionizing radiation would cause an increase in the oxidised forms of albumin could not be confirmed. The irradiated samples showed a small increase of the oxidised forms, but in comparison to the unirradiated forms there was not a significant change.

The experiments with UV-radiation showed a clear result: albumin could be harmed with UV, but there was no increase in the measured albumin fractions. The whole sample could not be measured with HPLC anymore. The albumin molecule was damaged in a way, so that it could not be detected with HPLC-analysis anymore. The kind of change could not be determined by the analysis performed.

Ascorbic acid has the potential to prevent or slow down the damaging process.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iii
Glossar und Abkürzungen	viii
Abkürzungen von Einheiten	ix
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xii
1 Grundlagen Albumin	12
1.1. Blutplasma	12
1.2 Das Protein Albumin	12
1.3 Struktur und Aufbau:	13
1.4 Albumin Redox-Status.....	14
1.5 Ionisierende Strahlung und Einfluss auf menschliches Gewebe.....	16
1.5.1 Grundlagen der Strahlentherapie.....	16
1.6.1 Erzeugung der Strahlung im Linearbeschleuniger	17
1.7 Ultraviolette Strahlung und ihr Einfluss auf menschliches Gewebe.....	19
1.8 Oxidativer Stress	19
1.8.1 Antioxidative Wirkung von Vitamin C.....	20
2 Methoden.....	21
2.1 Proben für Versuche mit ionisierender Strahlung.....	21
2.2 Durchführung der Versuche mit ionisierender Strahlung.....	21
2.3 Messung des Redox-Zustandes der Albuminproben	23
2.4 Vorbereitung der Albumin-Proben für UV-Bestrahlung.....	26
2.5 Erzeugung der UV-Strahlung und Durchführung der Versuche	27
2.6 Messung der Partikelgröße	27
3 Ergebnisse.....	29
3.1 Auswertung Versuche mit ionisierender Strahlung	29
3.1.1 Erläuterung des Versuchsablaufs	29
3.1.2 Ergebnisse der Versuche mit ionisierender Strahlung bei steigender Strahlendosis.....	30
3.1.3 Ergebnisse der Versuche mit ionisierender Strahlung (100 Gy) nach einer Inkubationszeit	32
3.2 Ergebnisse der Versuche mit UV-Strahlung:	34
3.3 Messung der Partikelgröße	38
3.3.1 Auswertung Partikelgrößen	38
4 Interpretation und Diskussion.....	41
5 Literaturverzeichnis.....	47

6 Anhang.....	50
---------------	----

Glossar und Abkürzungen

- Cys34...Cystein34
- HMA...human mercaptalbumin
- HNA1...human nonmercaptalbumin 1
- HNA2...human nonmercaptalbumin 2
- LET... linearer Energietransfer
- reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS)
- DNA...Desoxyribonukleinsäure
- OH...Hydroxyl-Radikal
- $O_2^{\cdot-}$...Singlet-Sauerstoff
- H_2O_2 ...Wasserstoffperoxid
- UV (A, B,C)...Ultraviolette Strahlung vom Typ (A,B,C)
- RNS...reaktiven Stickstoffverbindungen
- HPLC...High-pressure-liquid-chromatography
- HSA...Humanes-Sigma-Albumin

Abkürzungen von Einheiten

- Abbildung...Abbildung
- %...Prozent
- nm...Nanometer
- μl ...Mikroliter
- ml...Milliliter
- Gy...Gray
- g...Gramm
- l...Liter
- Da...Dalton
- mV...Millivolt
- M...Mol
- Mm...Millimeter
- μm ...Mikrometer
- kg/KG...Kilogramm pro Kilogramm-Körpergewicht
- cm...Zentimeter
- min...Minute
- mg...Milligramm
- mM...Millimol
- °C...Grad Celcius
- kGy...Kilo-Gray
- keV...Kiloelektronenvolt

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tertiärstruktur von Albumin, hervorgehoben das Cys-34, das sich an der Oberfläche des Proteins befindet. (8)	14
Abbildung 2: Chromatogramm mit den 3 Albuminfraktionen (HMA, HNA1, HNA2).....	15
Abbildung 3: Modifikationen am Cys-34. Hervorgehoben in Rot sind HSA-SH (HMA), RS-SR (HNA1), HSA-SO ₃ H und HSA-SO ₂ H (HNA2). In Blau die Schritte für die Nitrosylierung von HSA am Cys-34. (7)	15
Abbildung 4: zeigt die schematische Darstellung eines Linearbeschleunigers. Der zur Bestrahlung der Proben verwendete Varian ClinaC iX entspricht diesem vereinfachten Konzept. (14).....	18
Abbildung 5: Phantomplatte in Aufsicht. 9 Ausnehmungen in der Größe eines Eppendorf-Röhrchens (1,5ml).	22
Abbildung 6: Vor Bestrahlungsversuchen durchgeführte Dosimetrie. Die unterschiedlichen Dosimetrielinien zeigen, dass über jeder der Ausnehmungen die gleiche Strahlungsdosis herrscht.	22
Abbildung 7: Chromatogramm von HMA vor Bestrahlung mit UV-Licht.	24
Abbildung 8: Chromatogramm einer Bestrahlung von Blutplasma in Peak-Fit, das mit zwei Gauß-Kurven überlagert wurde, um die Peakfläche berechnen zu können.	25
Abbildung 9: Formeln zur Berechnung der Anteile (%).	25
Abbildung 10: a) Anteile von HMA (%) bei Wiederholung	26
Abbildung 11: schematischer Aufbau des Litesizers. Der Laserstrahl wird durch eine Linse in die Probe geschickt, um die 3 Detektoren angeordnet sind, die ihre Daten über optische Leiter an eine Fotoelektrode schicken. (23)	28
Abbildung 12 : Ergebnis-Diagramm einer Messung des Litesizers (24)	29
Abbildung 13: Änderung des HMA-Anteils (%) im Plasma durch ionisierende Strahlung.	31
Abbildung 14: Änderung des HNA1-Anteils (%) im Plasma durch ionisierende Strahlung.	31
Abbildung 15: Änderung des HNA2-Anteils (%) im Plasma durch ionisierende Strahlung	32
Abbildung 16: Inkubation nach Bestrahlung. Die Differenzen zur unbestrahlten Probe sind gezeigt. a. sofort nach Bestrahlung, b. 1h nach Bestrahlung und c. nach Inkubation über	

Nacht.....	33
Abbildung 17 a,b,c): a) Differenz vom HMA zum unbestrahlten Standard. Analyse sofort und nach 1 h Inkubationszeit. b) Differenz vom HNA1 zum unbestrahlten Standard. Analyse sofort und nach 1 h Inkubationszeit. c) Differenz vom HNA2 zum unbestrahlten Standard. Analyse sofort, nach 1 h Inkubationszeit.....	34
Abbildung 18: a) HMA unter UV-Strahlung. Kurven zeigen die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Von unten beginnend in blau Messung vor Bestrahlung, bei Minute 20, bei Minute 40 und bei Minute 60. b) HMA unter UV-Strahlung + Ascorbinsäure. Kurven zeigen die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Von unten beginnend in blau Messung vor Bestrahlung, bei Minute 20, bei Minute 40 und bei Minute 60. Im Gegensatz zu Abbildung 23 folgen noch Kurven bei Minute 300 und Messung über Nacht.....	36
Abbildung 19: a) HNA1 unter UV-Strahlung. Kurven zeigen die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Von unten beginnend in blau Messung vor Bestrahlung, bei Minute 20, bei Minute 40 und bei Minute 60. b) HNA1 unter UV-Strahlung + Ascorbinsäure. Kurven zeigen die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Von unten beginnend in blau Messung vor Bestrahlung, bei Minute 20, bei Minute 40 und bei Minute 60. Im Gegensatz zu Abbildung 25 folgen noch Kurven bei Minute 300 und Messung über Nacht.....	37
Abbildung 20: a) Albumin (Sigma-Aldrich) unter UV-Bestrahlung über 120min unter Zusatz von Ascorbinsäure (4mmol/ml). Werte alle 10min ermittelt. Auf der Ordinate die Peakfläche. b) Albumin (Sigma-Aldrich) unter UV-Bestrahlung für 120min. Messung alle 10min, nach 100min in Auswertung der Peakflächen nicht mehr möglich. Keine klare Abgrenzung der Kurven zueinander mehr möglich. Auf der Ordinate die Peakfläche.....	38
Abbildung 21: Partikeldurchmesser und ihre relative Häufigkeit.....	39
Abbildung 22: lineare Regression HMA.....	42
Abbildung 23: lineare Regression HNA1	43
Abbildung 24: lineare Regression von HNA2	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Partikelgrößen des mengenmäßig größten Peaks. Es wurde Albumin (Sigma-Aldrich) mit ASC (a) und ohne ASC bestrahlt (b) über 2 Stunden lang alle 10min ein Wert ermittelt.....	40
Tabelle 2: Partikelgrößen des mengenmäßig größten Peaks. Es wurde HMA ohne ASC (a) und HMA mit ASC (b) über 1 Stunde mit UV (254nm) bestrahlt und alle 10min eine Messung durchgeführt.	40
Tabelle 3: Partikelgrößen des mengenmäßig größten Peaks. Es wurde HNA1 ohne ASC (a) und HNA1 mit ASC (b) bestrahlt, über 1 Stunde lang alle 10min ein Wert ermittelt.	40
Tabelle 4: Ergebnisse der Versuche mit gepoolten Plasmaproben (Strahlungsdosis 1-3Gy). a) Peakfläche HMA, b) Peakfläche HNA1, c) Peakfläche HNA2, d) gesamte-Peakfläche(HMA+HNA1+HNA2), e) Anteil HMA [%], f) Anteil HNA1 [%], g) Anteil HNA2 [%].	50
Tabelle 5: Ergebnisse der Plasmaproben mit Strahlendosis 6-25Gy.....	50
Tabelle 6: Plasmaproben mit Strahlendosis 100Gy. Werte wurden nach sofort, nach einer Stunde Inkubationszeit und Inkubationszeit über Nacht erhoben.	50
Tabelle 7: Ergebnisse der Plasmaproben und Vollblut mit Strahlungsdosis 100Gy. Die Versuche mit Vollblut wurden durchgeführt, um festzustellen zu können, ob das Vorhandensein von Blutzellen einen Einfluss auf die Veränderung des Albumins hätte. ...	51
Tabelle 8: Ergebnisse der reinen Albuminproben (Grifols), HMA und HNA1. Die Versuche mit reinen Albuminproben wurden durchgeführt, um die Wirkung von im Plasma vorhandenen Antioxidantien auszuschließen zu können.	51
Tabelle 9: Ergebnisse des bestrahlten Plasmas der Blutbank.....	51
Tabelle 10: Albumin-Proben (Sigma-Aldrich) bestrahlt über 120min. Ab Minute 100 Abbruch der Auswertung da keine ausreichende Abgrenzung zwischen Kurven mehr möglich war. Werte alle 10min ermittelt.	52
Tabelle 11: Albumin-Proben (Sigma-Aldrich) +Ascorbinsäure bestrahlt über 120min. Werte alle 10min ermittelt.....	52
Tabelle 12: HMA bestrahlt über 60min. Werte alle 10min ermittelt.....	53
Tabelle 13: HMA+ Ascorbinsäure bestrahlt über 60min, Werte alle 10min. Bis zu Minute 300 Werte alle 30min ermittelt. Bestrahlung über Nacht Wert am nächsten Morgen ermittelt.	54
Tabelle 14: HNA1 bestrahlt über 60min. Werte alle 10min ermittelt.	54
Tabelle 15: HNA1+ Ascorbinsäure bestrahlt über 60min, Werte alle 10min. Bis zu Minute 300 Werte alle 30min ermittelt. Bestrahlung über Nacht Wert am nächsten Morgen ermittelt.	55
Tabelle 16: Variationskoeffizienten der Versuche mit ionisierender Strahlung.	56
Tabelle 17 : Variationskoeffizient der HPLC-Kontrollmessung Variationskoeffizienten der Versuche mit ionisierender Strahlung.....	56

1. Grundlagen Albumin

1.1. Blutplasma

Das Blutplasma besteht aus einer Vielzahl von Stoffen: Wasser, Proteinen und kleinmolekularen Stoffen (Plasmaelektrolyte), wobei der größte Teil Plasma aus Wasser besteht (1).

Die Proteine im Plasma liegen in einer Konzentration von etwa 70g /l vor. Bei einem Plasmavolumen von annähernd 3l (Blutvolumen ohne Hämatokrit) ergibt sich eine Menge von ca. 200g Plasmaproteinen (2).

Mit der Plasmaproteinelektrophorese steht ein simples Verfahren zur Identifikation der verschiedenen Plasmaproteine zur Verfügung. Die Elektrophorese beruht auf dem Wanderungsverhalten von geladenen Teilchen im Gleichspannungsfeld. Je nach Ladung und Gestalt wandern die Proteine unterschiedlich weit (1). Bei den intensivsten und am weitesten von der Kathode entfernten Bande im Elektropherogramm handelt es sich um Albumin (2).

1.2 Das Protein Albumin

Das erste Mal in der Geschichte der Medizin wurde das Protein Albumin (vom deutschen Wort für Eiklar: Albumen (3)) von Hippokrates von Kos erwähnt. Er beschrieb es als Ursache des Aufschäumens von Urin. Die Aminosäuren-Sequenz wurde erst im Jahr 1975 zeitgleich von Brown und Mitarbeitern (Austin, Texas) und Meloun in Prag erforscht (3).

Albumin, das häufigste Protein im menschlichen Plasma, kommt beim gesunden Menschen in einer Konzentration von etwa 42g/l vor. Im gesamten Plasma befinden sich etwa 120g. Es kommt so gut wie in jedem anderen Gewebe vor (Haut, Muskel, Leber, Liquor...), jedoch in unterschiedlicher Konzentration (3). Albumin besitzt ein Molekulargewicht von 66470 Da, besteht aus 585 Aminosäuren und sein isoelektrischer Punkt befindet sich bei einem pH von 4,6. Ein weiterer wichtiger Aspekt des Proteins ist seine stark negative Ladung (bei pH 7,4), die seine Filtration in der Niere weitgehend verhindert (4).

Albumin wird in der Leber synthetisiert und gleich nach seiner Synthese aus den Hepatozyten abgegeben. Im Gegensatz zu bestimmten Hormonen (z.B. Insulin und Parathormon) wird dieses frisch gebildete Protein nicht gespeichert. Nach etwa 27 Tagen wird Albumin abgebaut. Dies geschieht in jedem größeren Organ. Hauptabbauorte sind Leber, Nieren, Muskulatur und Haut. Gleichzeitig geht ein Teil dieses Proteins über den

Harn- beziehungsweise den Verdauungstrakt- verloren. Wie lange Albumin im Körper zirkuliert, hängt von seinem akkumulierten, strukturellen Schaden ab, beziehungsweise davon, welche Liganden gebunden sind (3).

Albumin bildet ferner durch seine Cystein-Reste den größten Pool an freien Thiolgruppen im Plasma. Diese freiliegenden Thiol-Gruppen sind für die antioxidativen Eigenschaften des Proteins ausschlaggebend. Sie neutralisieren reaktive Spezies oder verhindern ihre Bildung, in dem sie z.B. freies Kupfer binden (Fenton-Reaktion) (5).

Albumin ist es ein essentieller Bestandteil des Transportsystems:

- Transport von Pharmaka,
- Fettsäuren,
- Abbauprodukte wie beispielsweise Bilirubin
- sowie Metallionen (5).

Zusätzlich leistet Albumin einen wesentlichen Beitrag zum kolloid-osmotischen Druck in den Gefäßen, da es allein für mindestens 70% dieses Drucks verantwortlich ist. Aus diesem Grund ist Albumin der Hauptakteur in der Verteilung von Flüssigkeit zwischen intra- und extravasalem Raum (6).

1.3 Struktur und Aufbau:

Das Protein lässt sich in drei homologe Abschnitte (I, II, III) unterteilen, welche je zwei Subdomänen (A+B) beinhalten. Diese Subdomänen bestehen aus vier und sechs Alpha-Helices. Obwohl die Subdomänen durch Disulfidbrücken verbunden sind, sind sie zueinander flexibel beweglich (7).

Jeder Abschnitt des Proteins besitzt trotz seiner homologen Struktur unterschiedliche Liganden-Bindungsfähigkeiten (3).

Der strukturelle Aufbau von Albumin ähnelt dem anderer Plasmaproteine. Das Transportprotein Transthyretin ist vergleichbar aufgebaut.

Durch die Aneinanderreihung gleicher Abschnitte entsteht ein Protein, welches einerseits durch die Wiederholung gleicher Abschnitte relativ einfach zu synthetisieren ist, andererseits groß genug ist, um nicht von der Niere ausgeschieden zu werden (3).

Albumin ist zudem ein relativ einfaches Protein ohne prosthetische Gruppen (4) oder einen Kohlehydrat-Rest. Hierbei fehlt die Aminosäuren-Sequenz, welche für N-Glykolysierung notwendig wäre. Im Plasma besitzt jedoch etwa 1% des Albumins eine kovalente Bindung

mit Glucose. Dies kann zu einer Veränderung der Bindungsfähigkeiten für andere Liganden führen (5).

1.4 Albumin Redox-Status

Albumin besitzt 35 Cystein-Reste, wobei 34 davon in intramolekularen Disulfidbrücken gebunden sind. Cys-34, wobei die Zahl 34 für die Position im Protein steht, befindet sich an der Oberfläche des Moleküls und ist für Redoxreaktionen verfügbar. Beim gesunden Menschen tragen etwa 70-80% der Albumin-Moleküle am Cys-34 (Abbildung.1) eine freie Thiolgruppe (HMA Human-Mercaptalbumin). Weitere 25% bilden Bindungen mit anderen Thiolen (Cystein, Gluthation oder Homocystein) aus (Human Nonmercaptalbumin1, HNA1). Ein kleiner Teil der Cys-34 in Albumin ist höher zur Sulfon- oder Sulfinsäure oxidiert (Human Nonmercaptalbumin2, HNA2) (Abbildung.2) (3). HNA2 ist irreversibel oxidiert (6).

Eine weitere Möglichkeit der Derivatisierung bezüglich Cys-34 ist die Nitrosylierung durch Stickstoff-Monoxid (6). Einen Überblick über die verschiedenen Oxidationsstufen zeigt Abbildung 3.

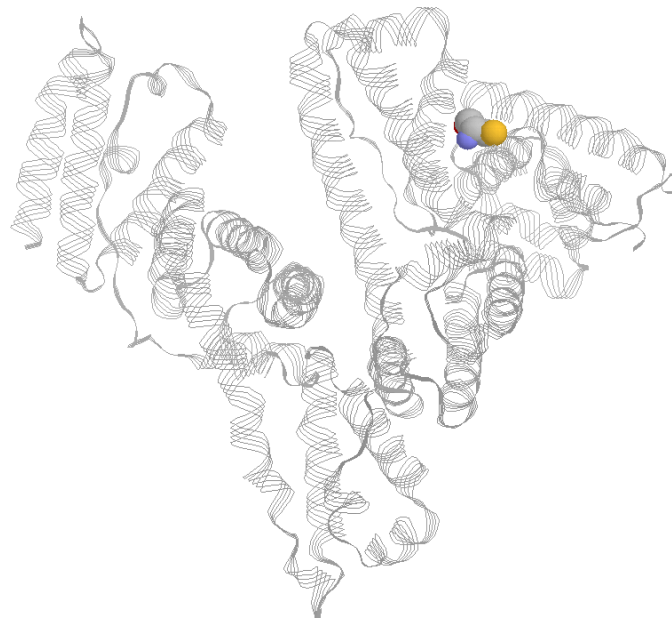


Abbildung 1: Tertiärstruktur von Albumin, hervorgehoben das Cys-34, das sich an der Oberfläche des Proteins befindet (8).

Redox-state of albumin

in terms of cysteine-34

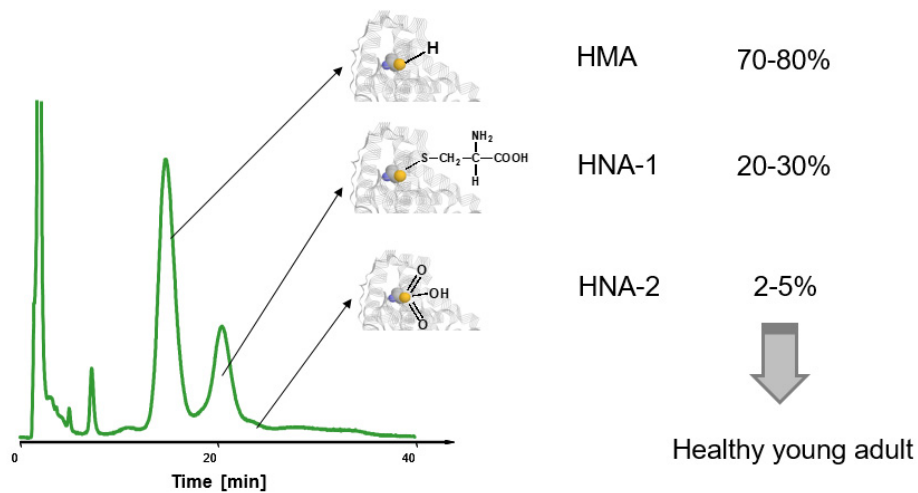


Abbildung 2: Chromatogramm mit den 3 Albuminfraktionen (HMA, HNA1, HNA2)

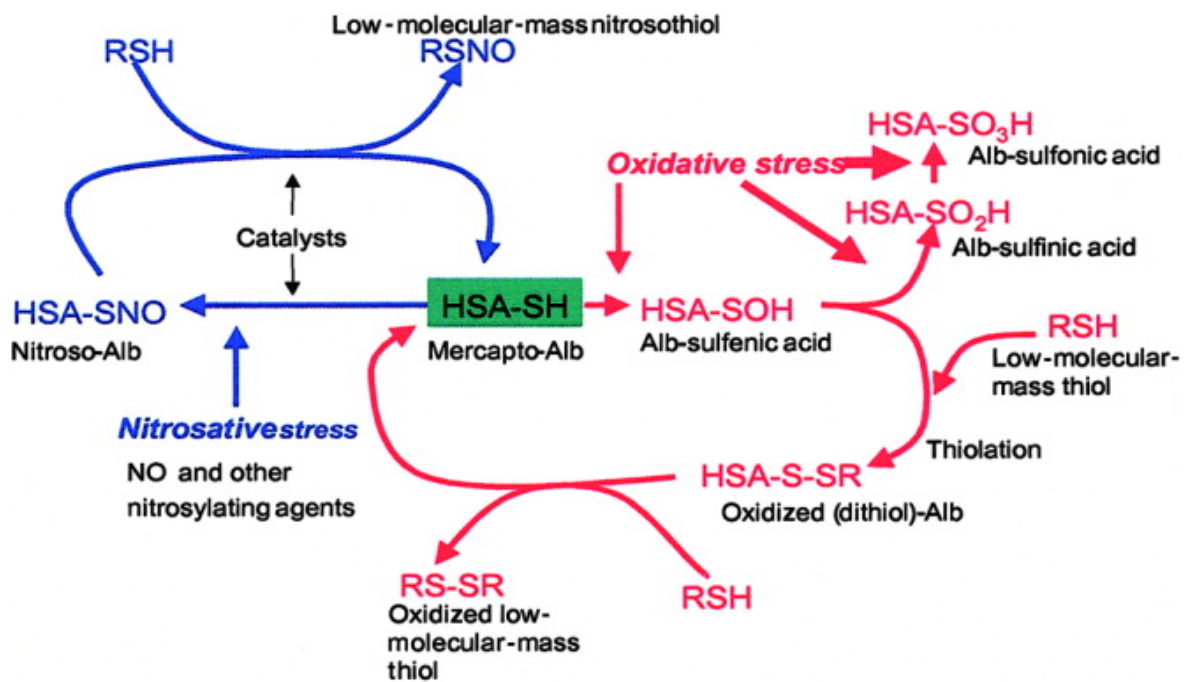


Abbildung 3: Modifikationen am Cys-34. Hervorgehoben in Rot sind HSA-SH (HMA), RS-SR (HNA1), HSA-SO₃H und HSA-SO₂H (HNA2). In Blau sind die Schritte für die Nitrosylierung von HSA am Cys-34 (7).

1.5 Ionisierende Strahlung und ihr Einfluss auf menschliches Gewebe

1.5.1 Grundlagen der Strahlentherapie

Die Radiotherapie ist ein integraler Bestandteil der Tumorthherapie. Neben Chirurgie und Chemotherapie bietet sie Möglichkeiten der lokalregionären Behandlung sowie der systemischen Behandlung. Bei 50% aller KrebspatientenInnen wird Bestrahlung zur kurativen Behandlung eingesetzt, wobei die Heilungsrate bei etwa 40% liegt (9). Jedoch muss ein möglichst optimales Gleichgewicht zwischen Strahlenwirkung im malignen Gewebe und Schaden im umliegenden gesunden Gewebe gefunden werden. Dieses Verhältnis wird durch die Radiosensitivität des Tumors und die ungewollte Reaktion des umliegenden Gewebes bestimmt (10). Die unterschiedlichen Qualitäten ionisierender Strahlung werden anhand ihres Bremsvermögens unterschieden (Abbildung 4). Dieses Bremsvermögen wird in der pro Wegstrecke beziehungsweise Eindringungstiefe abgegebenen Energie gemessen. Ein Ausdruck dafür ist der lineare Energietransfer (LET). Dieser beschreibt indirekt die Anzahl von Ionisationen pro Wegstrecke, besonders in Bezug auf die Wirkung von Strahlung in biologischem Gewebe. Röntgen und Gamma-Strahlung mit LET Werten zwischen 0.2 und 5 keV/ μm sind Low-LET Strahlungen. Im Gegensatz dazu stehen Neutronen-Strahlung und die Bestrahlung mit schwereren Ionen, deren LET zwischen 50 und 200 keV/ μm liegt (high-LET) (9).

Hauptangriffsort der ionisierenden Strahlung ist die DNA. Bei der Bestrahlung des Gewebes wird die DNA von den Partikeln (Elektron oder Ion) entweder direkt ionisiert oder es entstehen in der Umgebung des Stranges reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) durch Ionisierung von Wassermolekülen. Wichtigste reaktive Spezies dabei ist das Hydroxyl-Radikal (OH^\cdot). Andere reaktive Spezies, wie beispielsweise Superoxid und Wasserstoffperoxid ($\text{O}_2^{\cdot-}$ und H_2O_2), sind quantitativ vernachlässigbar. Die durch die Strahlung gebildeten reaktiven Spezies reagieren mit der DNA. Dies entspricht der indirekten Wirkung der Strahlung (9). Direkte und indirekte Wirkung an der DNA haben in unterschiedlichem Verhältnis Einfluss. Bei high-LET Strahlung dominiert die direkte Wirkung an der DNA. Bei low-LET Strahlung überwiegt indirekte gegenüber direkter Wirkung im Verhältnis von 3:1 (9). Die verursachten Schäden sind:

- Veränderung der Basen,
- Schädigung der Phosphat-Zucker-Struktur oder
- Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche (11).

Nur 5% der Schäden sind zu komplex für die Reparatur-Enzyme der DNA. Diese Schäden sind für das Auslösen des Zelltodes verantwortlich (9).

Jedoch können die entstehenden reaktiven Spezies auch andere Strukturen als DNA angreifen, wie beispielsweise Lipide in Membranen oder Proteine. Als Beispiel dienen die Versuche von Cho und Song (2000). Bei diesen Versuchen konnte mit Gammastrahlung und applizierten Dosen von bis zu 10 kGy eine Abnahme der Alpha-Helix Strukturen und eine Zunahme der Random-Coils festgestellt werden. Dies bedeutet, dass eine starke Veränderung der Proteinstruktur von Albumin stattgefunden hatte. Ebenfalls konnte eine Spaltung von kovalenten Bindungen und eine Formung von größeren Aggregaten festgestellt werden (12).

1.6 Wirkungsweise eines Linearbeschleunigers

An der Universitätsklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie Graz werden für die Behandlung von PatientenInnen mit Strahlentherapie Linearbeschleuniger eingesetzt.

Vor der Einführung des Linearbeschleunigers (Linac) in der Strahlentherapie wurden verschiedene Methoden zur Erzeugung von Strahlung genutzt:

- Röntgenröhren,
- Betatrons oder Kreisbeschleuniger sowie
- Kobalt-60.

Diese Methoden wurden jedoch mit der Einführung des modernen Linearbeschleunigers obsolet (13).

1.6.1 Erzeugung der Strahlung im Linearbeschleuniger

Das Konzept des Linearbeschleunigers geht auf Wideroe (1928/30) zurück (Abbildung 4). In modernen Linearbeschleunigern werden Elektronen aus einem Injektor in eine Beschleunigungskomponente (Waveguide) abgegeben. Die Elektronen werden durch das elektrische Feld, das zwischen den Ringkondensatoren im Waveguide aufgebaut wird, in axialer Richtung beschleunigt (13).

Nach dem Verlassen der Beschleunigungsröhre wird der Elektronenstrahl mittels eines magnetischen Umlenkensystems (meist 270°) in seiner Richtung verändert. Im Elektronenbetrieb (wenn also Elektronenstrahlen für die Therapie verwendet werden sollen) muss der aus dem Umlenkmagnet-System austretende Elektronenstrahl durch Streufolien

geglättet, verbreitert und homogenisiert werden. Dies wird als Feldhomogenisierung bezeichnet.

Im Photonenbetrieb werden die Elektronen auf ein Bremsstrahlungstarget (meist Wolfram oder Material mit ähnlicher hoher Ordnungszahl, um die Ausbeute an Bremsstrahlung zu erhöhen) gelenkt (13).

Der durch das Abbremsen der Elektronen erzeugte Photonenstrahl wird im kegelförmigen Ausgleichskörper ebenfalls einer Homogenisierung unterzogen.

Zur Kontrolle und Formung des Photonenstrahlungsfeldes werden drei Kollimatoren genutzt.

Die drei Kollimatoren erfüllen folgende Aufgaben:

- Der erste Kollimator begrenzt das Bestrahlungsfeld zirkulär und ist ausschlaggebend für die maximale Größe des Feldes.
- Der zweite besteht aus mehreren, beweglichen Komponenten, die rechteckige Felder erzeugen können.
- Der dritte Kollimator (multi leaf collimator) ermöglicht die Formung eines irregulären Feldes, mithilfe vielfacher Kollimatorenblätter (14).

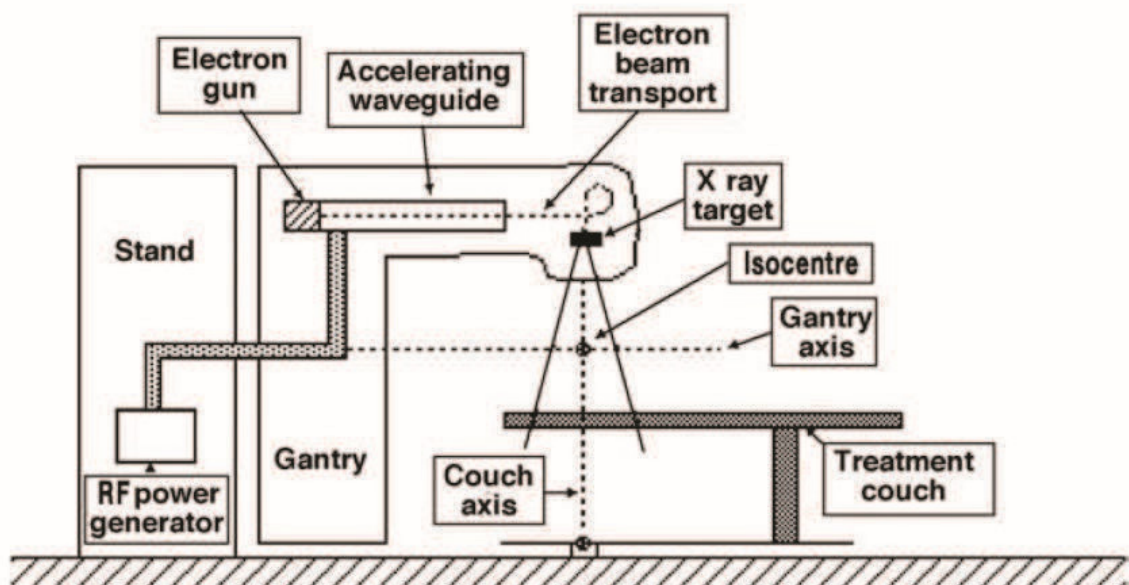


Abbildung 4: zeigt die schematische Darstellung eines Linearbeschleunigers. Der zur Bestrahlung der Proben verwendete Varian Clinac iX entspricht diesem vereinfachten Konzept (14).

1.7 Ultraviolette Strahlung und ihr Einfluss auf menschliches Gewebe

Als ultraviolette Strahlung wird jene Strahlung bezeichnet, die unterhalb des für den Menschen sichtbaren Spektrums liegt (<400nm Wellenlänge). Sie wird unterteilt in:

- UV-A (315-400nm)
- UV-B (280-315nm) und
- UV-C (<280nm) (15).

Natürliche UV-C Strahlung wird durch den in der Atmosphäre vorhandenen Sauerstoff und Ozon absorbiert und hat aus diesem Grund kaum biologische Relevanz. UV-A und UV-B können jedoch signifikanten Einfluss auf biologisches Gewebe haben. Direkte Schäden wie beispielsweise an der DNA werden hauptsächlich durch UV-B ausgelöst, da es von der DNA direkt absorbiert wird (15). UV-A bewirkt den Schaden hauptsächlich über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies.

Für experimentelle Zwecke wird oft eine UV-Strahlung mit einer Wellenlänge <280nm verwendet. Dies war auch in den Experimenten in Zusammenhang mit dieser Arbeit der Fall.

1.8 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress im Körper entsteht, wenn ein Überhang an reaktiven Sauerstoff (ROS) und reaktiven Stickstoffverbindungen (RNS) gegenüber dem körpereigenen antioxidativen Systems besteht (17). Die Dysbalance in diesem System kann durch Einwirkung von:

- Umweltschadstoffen,
- ionisierender und ultravioletter Strahlung,
- erhöhte Ozonkonzentrationen, Zigarettenrauch etc. ausgelöst werden (16).

Antioxidantien spielen in der Inaktivierung von ROS und RNS die entscheidende Rolle.

Ein Antioxidans lässt sich folgendermaßen definieren: ein Stoff, der selbst in geringer Konzentration die Oxidation eines Substrats (Protein, Lipid, Nukleinsäure oder Ähnliches) verzögern oder gänzlich verhindern kann (17).

1.8.1 Antioxidative Wirkung von Vitamin C

Ascorbinsäure ist ein wichtiger wasserlöslicher, antioxidativer Faktor in biologischen Flüssigkeiten (17). Sie schützt vor ROS wie beispielsweise Superoxid, Singlet-Sauerstoff, reaktiven Stickstoffspezies und hypochloriger Säure etc.

Vitamin C besitzt auch die Fähigkeit, als Co-Antioxidans zu wirken, in dem es das Alpha-Tocopherol Radikal, welches bei der Inaktivierung von fettlöslichen Radikalen entstanden ist, wieder reduziert (18).

Die Fähigkeit von Ascorbinsäure und dem Ascorbyl-Radikal, praktisch jedes Radikal zu reduzieren, liegt in ihrem extrem niedrigen Reduktionspotential (Ascorbinsäure 282 mV und -174 mV für das Ascorbylradikal), wobei Ascorbinsäure zum Ascorbyl-Radikal und in einem weiteren Schritt zum Dehydroascorbyl oxidiert wird (19).

Selbst Dehydroascorbinsäure kann beispielsweise durch Glutathion wieder zu Ascorbat reduziert werden (17). Ascorbinsäure kann selbst in zweifach oxidiert Form noch antioxidativ wirken. Aus diesem Grund ist Ascorbinsäure das ideale wasserlösliche Antioxidans.

In einer zu dieser Diplomarbeit parallel laufenden Studie wurde die Frage aufgeworfen, wie Albumin (in niedriger Konzentration) im Glaskörper, in dem eine relative hohe Konzentration von Ascorbinsäure vorliegt, auf UV-Strahlung reagiert. Aus diesem Grund wurde Ascorbinsäure als Antioxidans für die Versuche mit UV-Strahlung ausgewählt.

Es wurde in einer Konzentration verwendet, die der Konzentration im Glaskörper entspricht (4 mmol/ml).

Erwähnenswert ist ebenfalls eine Arbeit, in der Mäusen nach einer Ganzkörperbestrahlung mit 7,5Gy Ascorbinsäure in hoher Dosierung (1-4,5 g/kgKG) verabreicht wurde. Die Ascorbinsäure hatte einen positiven Einfluss auf das Gesamtüberleben. Das legt die Überlegung nahe, Vitamin C als Antioxidans bei den Bestrahlungsversuchen zu verwenden (20).

2. Methoden

2.1 Proben für Versuche mit ionisierender Strahlung

Für die Versuche mit ionisierender Strahlung wurden verwendet:

- gepooltes Plasma,
- bestrahltes Plasma (zur Verfügung gestellt von der Blutbank der Universitätsklinik Graz),
- Vollblut (zur Verfügung gestellt von der Blutbank der Universitätsklinik Graz),
- Albuminlösung (Grifols),
- HNA1 und HNA2.

2.2 Durchführung der Versuche mit ionisierender Strahlung

Eine Voraussetzung zur Durchführung der Versuche mit ionisierender Strahlung war, eine gleichmäßige Verteilung der Strahlungsdosis für jede der Proben zu erzielen.

Die Bestimmung der Dosisverteilung wurde in Vorversuchen an der Universitätsklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie durchgeführt. Diese Versuche sollten den Nachweis einer äquivalenten Dosisverteilung über allen Ausnehmungen erbringen.

Ein Plexiglasblock mit 9 Ausnehmungen (Abbildung 6) wurde hergestellt.

Die Phantomplatte (mit den 9 Ausnehmungen) wurde auf einer 5cm dicken Platte platziert. Als Abdeckung folgte eine ca. 2cm dicke Plexiglasplatte. Danach folgte die Positionierung mittels eines Laserfadekreuzes. Die Strahlung wurde mit Photonen der Nominalenergie von 6 MeV an einem Varian Clinac iX Linearbeschleuniger appliziert. Beim Transport zwischen Vorbereitung, Bestrahlung, Analyse wurden die Proben auf Eis gelagert. Die Bestrahlung (500µl Probe in Eppendorf-Röhrchen) wurde mit verschiedenen Strahlendosen durchgeführt (1 Gy, 2 Gy, 3 Gy, 6 Gy, 10 Gy, 15 Gy, 20 Gy, 25 Gy und 100 Gy).

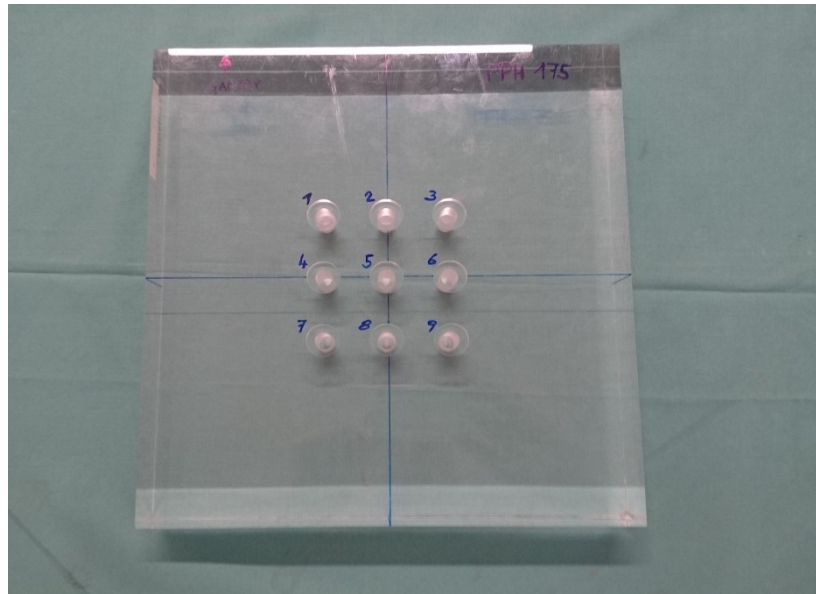


Abbildung 5: Phantomplatte in Aufsicht. 9 Ausnehmungen in der Größe eines Eppendorf-Röhrchens (1,5ml).

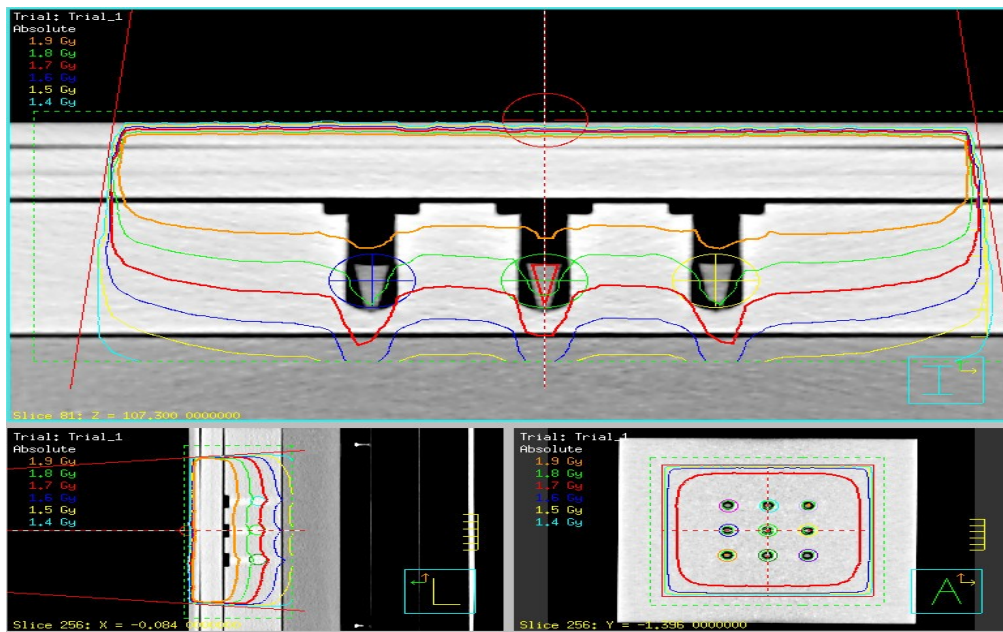


Abbildung 6: Vor Bestrahlungsversuchen durchgeführte Dosimetrie (Dosisberechnung mit dem Bestrahlungsplanungssystem Pinnacle/Philips). Die unterschiedlichen Isodosenlinien zeigen, dass über jeder der Ausnehmungen die gleiche Strahlungsdosis herrscht.

2.3 Messung des Redox-Zustandes der Albuminproben

Die Detektion des Redox-Zustandes der Proben folgte mittels HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). Die Vermessung wurde unmittelbar nach der Bestrahlung durchgeführt.

Das chromatographische Messsystem bestand aus:

- einem Autosampler (SIL-20AC, Shimadzu, Austria),
- einer Pumpe (Elite La Chrom),
- einem CTO Säulenofen (Shimadzu, Austria),
- einem Fluoreszenzdetektor (821-FP Jasco),
- einer Anionenaustauschsäule (Shodex-Asahipak ES-502N 7C) und
- einer Systemsteuerung CBM-20A (Shimadzu, Austria)

Als Standard wurde jede Probe vor der Bestrahlung analysiert. Bei jeder Messung wurden 10µl Probe mittels Pipette abgehoben und mit 990µl Probenpuffer (0,1M Natriumhydrogenphosphat; 0,3 M Natriumchlorid, pH 6,87) verdünnt. Dann folgte eine Filtration mittels Whatman 0,45 µm Nylonfilters (Bartelt Labor- & Datentechnik, Graz) in ein HPLC-Proben-Röhrchen.

20µl des Filtrats wurden in das HPLC System injiziert und in einer Shodex Asahipak ES-502N 7C Anionenaustauschsäule (7,5 x 100 mm, Bartelt Labor- & Datentechnik, Graz) bei 35°C aufgetrennt.

Die Elution erfolgte mittels zweier Laufmittel A und B (mit bzw. ohne Ethanol). Daraus resultierte ein Ethanol-Gradient von 0-6% (1ml/min).

Als Laufmittel A=mobile Phase wurde (50mM Natriumsulfat und 400mM Natriumacetat; pH von 4,85) und als Laufmittel B (Laufmittel A und 10% Ethanol) verwendet.

Bei einem Gradienten von:

- 0 - 5 min: 100% A
- 5 - 25 min: 100% A → 40% A / 60% B
- 25 - 30 min: 40% A / 60% B
- 30 - 35 min: 40% A / 60% B → 100% A
- 35 - 40 min: 100% A

Die Albumin-Moleküle wurden nach dem Prinzip der Fluoreszenzchromatographie detektiert. Dies erfolgte mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 340 nm.

Analysiert wurden die Chromatogramme (Abbildung 7) mit Peak Fit 4.0 (Jandel Scientific, Rafael, CA, USA). Peak Fit ermöglicht durch die Anpassung einer Gauß-Kurve an das Chromatogramm die Quantifizierung der Peakfläche (Abbildung 8).

Der prozentuelle Anteil der einzelnen Peakflächen wurde mit Microsoft Excel berechnet (Abbildung 9)

Die statistische Auswertung wurde mittels linearer Regression nach Pearson durchgeführt und in Microsoft Excel berechnet.

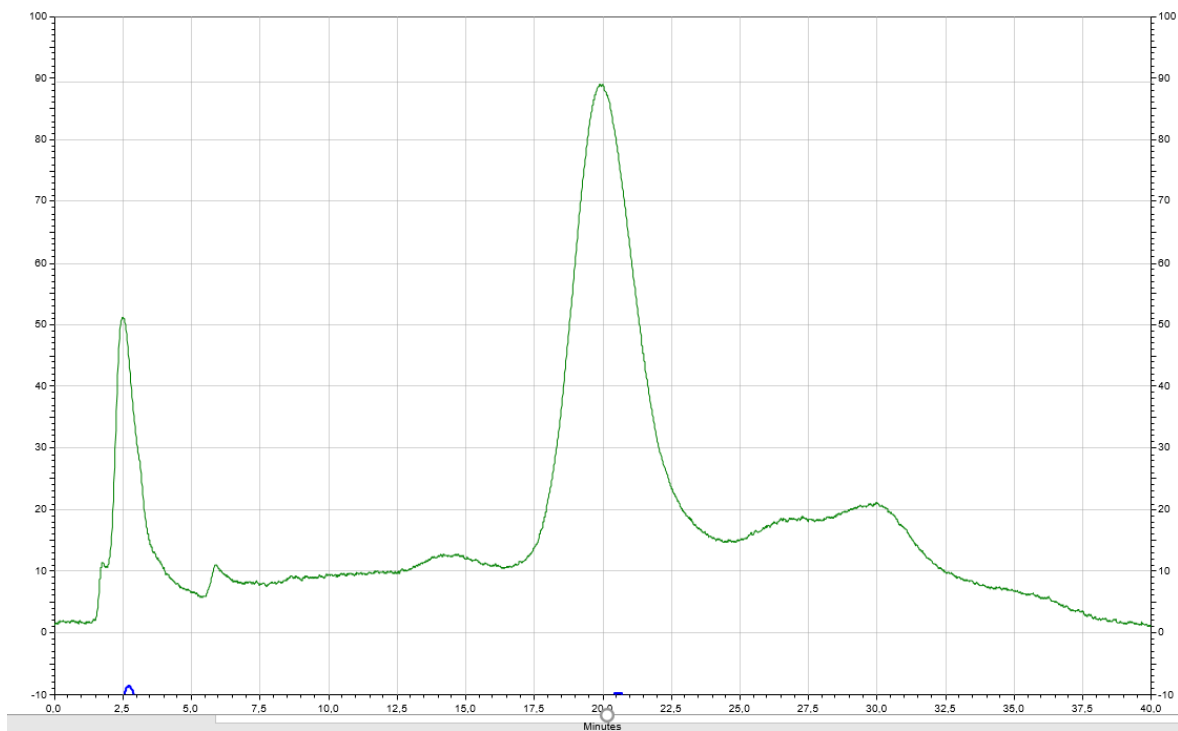


Abbildung 7: Chromatogramm von HMA vor Bestrahlung mit UV-Licht.

- 160428 Albumin Plasma 2 vorher

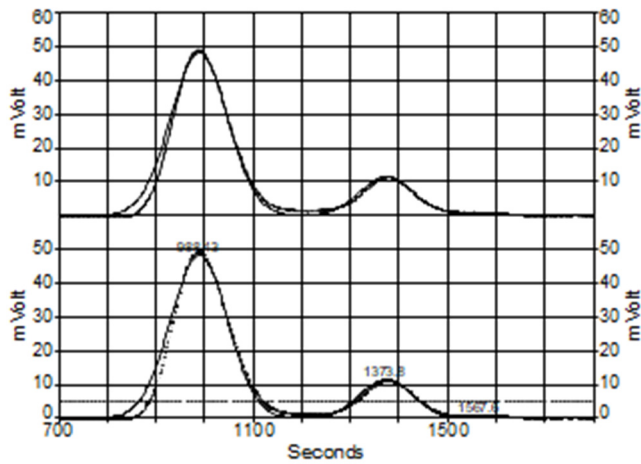


Abbildung 8: Chromatogramm einer Bestrahlung von Blutplasma in Peak Fit, das mit zwei Gauß-Kurven überlagert wurde, um die Peakfläche berechnen zu können.

$$\frac{\text{Fläche}(HMA)}{\text{Fläche}_{\text{gesamt}}(HMA + HNA1 + HNA2)} * 100 = HMA(\%)$$

$$\frac{\text{Fläche}(HNA1)}{\text{Fläche}_{\text{gesamt}}(HMA + HNA1 + HNA2)} * 100 = HNA1(\%)$$

$$\frac{\text{Fläche}(HNA2)}{\text{Fläche}_{\text{gesamt}}(HMA + HNA1 + HNA2)} * 100 = HNA2(\%)$$

Abbildung 9: Formeln zur Berechnung der Anteile in Prozent.

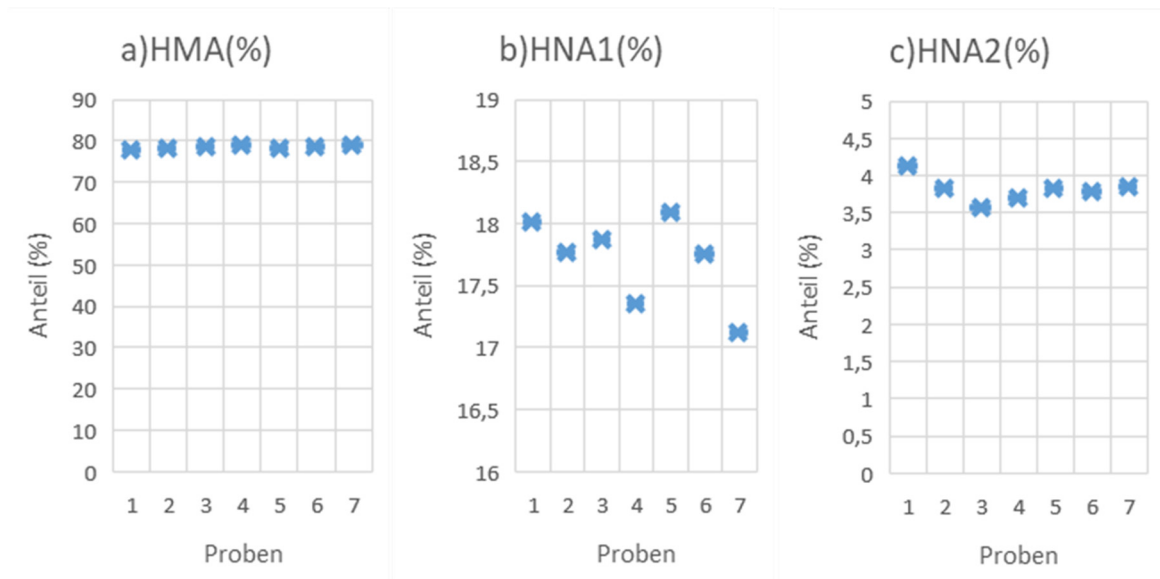


Abbildung 10: a) Anteile von HMA (%) bei Wiederholung
 b) Anteile von HNA1(%) bei Wiederholung
 c): Anteile von HNA2 (%) bei Wiederholung

Diese Überprüfung der Streubreite der HPLC-Analyse einer Plasmaprobe wurde durchgeführt, um Unterschiede bei den Ergebnissen der bestrahlten Proben richtig einschätzen zu können. Zunächst wurde ermittelt, wie gut sich die Messung der Verteilung der Albuminfraktionen reproduzieren lässt. Von geschultem Personal durchgeführt, wurde für HMA ein Variationskoeffizient von 0,5%, für HNA1 von 2% und für HNA2 von 4,5% ermittelt. Es wurden 7 unbestrahlte Proben aus dem gleichen Plasmapool entnommen, um die Werte zu ermitteln (siehe Tabelle 18).

2.4 Vorbereitung der Albumin-Proben für UV-Bestrahlung

Bei der Untersuchung der Auswirkung von UV 254 nm wurde Human-Albumin (Sigma-Aldrich), gereinigtes HMA und HNA1 in einer Konzentration von 2 mg/ml verwendet. Ascorbinsäure wurde in einer Konzentration von 4 mmol/ml vorbereitet. Mit dieser Konzentration liegt man im Bereich des Glaskörpers.

Das jeweilige Albumin-Präparat wurde eingewogen und mit PBS in einer Konzentration verdünnt, um die gewünschte Konzentration von 2 mg/ml zu erreichen.

Die Albuminproben wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um eine ausreichende Auflösung zu gewährleisten. Die Ascorbinsäure wurde ebenfalls eingewogen und mit PBS verdünnt. Hier war keine längere Inkubationszeit notwendig.

Die Bestrahlung der Proben wurde in einer Quarz-Küvette- mit 1 ml Lösung befüllt-

durchgeführt. Die Quarz-Küvette war mit Parafilm bedeckt, um einer Oxidation durch Luft-Sauerstoff vorzubeugen. Die Küvetten blieben- auch während der Bestrahlung mit Ausnahme der Probenentnahme- dauerhaft bedeckt.

2.5 Erzeugung der UV-Strahlung und Durchführung der Versuche

In einem Vorversuch wurde festgestellt, dass bei Albumin unter der Bestrahlung mit einer Wellenlänge von 360 nm keine Veränderung auftrat. Jedoch konnte im Vorversuch unter einer Bestrahlung mit 254 nm eine Veränderung festgestellt werden. Aus diesem Grund wurden die Proben mit UV-C-Strahlung (254 nm) bestrahlt.

Die verschiedenen Albuminproben wurden in einem Abstand von ca. 4 cm zur Strahlungsquelle platziert. Eine weitere Annäherung hätte zu einer zu starken Erhitzung der Proben und einer Verfälschung der Messung geführt.

In unterschiedlichen Zeitabständen:

- bei 2 Versuchen alle 10 min über 2 Stunden,
- bei den 3 weiteren in der 1 Stunde alle 10 min,
- danach alle 30 min bis zu Minute 300,
- daraufhin Bestrahlung über Nacht und Messung am nächsten Morgen,

wurden den Proben 40µl für die chromatographische Messung entnommen. Die Probe wurde mit 160 µl Albumin-Puffer verdünnt und in ein Vial gefüllt. Diese Vial wurde in ein HPLC Probenfläschen platziert.

2.6 Messung der Partikelgröße

Bei der chemischen Modifikation von Proteinen (z.B. durch UV-Strahlung verursacht) besteht die Gefahr, dass es zur Bildung von größeren Aggregaten kommt. Um eine solche Aggregatbildung auszuschließen, wurden mit dem Litesizertm 500 (Anton Paar) Messungen der Partikelgröße durchgeführt.

Der Litesizer ist ein Instrument zur Charakterisierung von Partikeln in einer Dispersion (heterogenes Gemisch von mind. 2 Stoffen) anhand ihrer Größen, molekularer Masse und Zeta-Potenzials (21). Der Apparat nutzt dafür verschiedene Messtechniken. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen ist nur der hydrodynamischen Durchmesser (=Partikelgröße) von Interesse. Die Partikelgröße wird mittels der dynamischen

Lichtstreuung von monochromatisches Licht gemessen. Ein Laserstrahl wird in eine Lösung mit sphärischen Partikeln geschickt. Durch die sich in der Probe befindlichen Moleküle kommt es zu einer Streuung und Veränderung der Wellenlänge des eingestrahlten Lichts. Der in seiner Wellenlänge veränderte Laserstrahl wird von Detektoren, die rund um die Küvette angeordnet sind, erfasst (Abbildung 11). Aus der Verschiebung der Wellenlänge in Abhängigkeit vom Streuwinkel lässt sich auf die Partikelgröße schließen (22). Die Küvette wurde bei jeder Messung mit 45 μl bestrahlter Albuminprobe befüllt. Zur Reinigung nach jedem Messvorgang wurde sie mit Aqua dest. und Ethanol (70%) gespült, um danach mit Druckluft getrocknet zu werden.

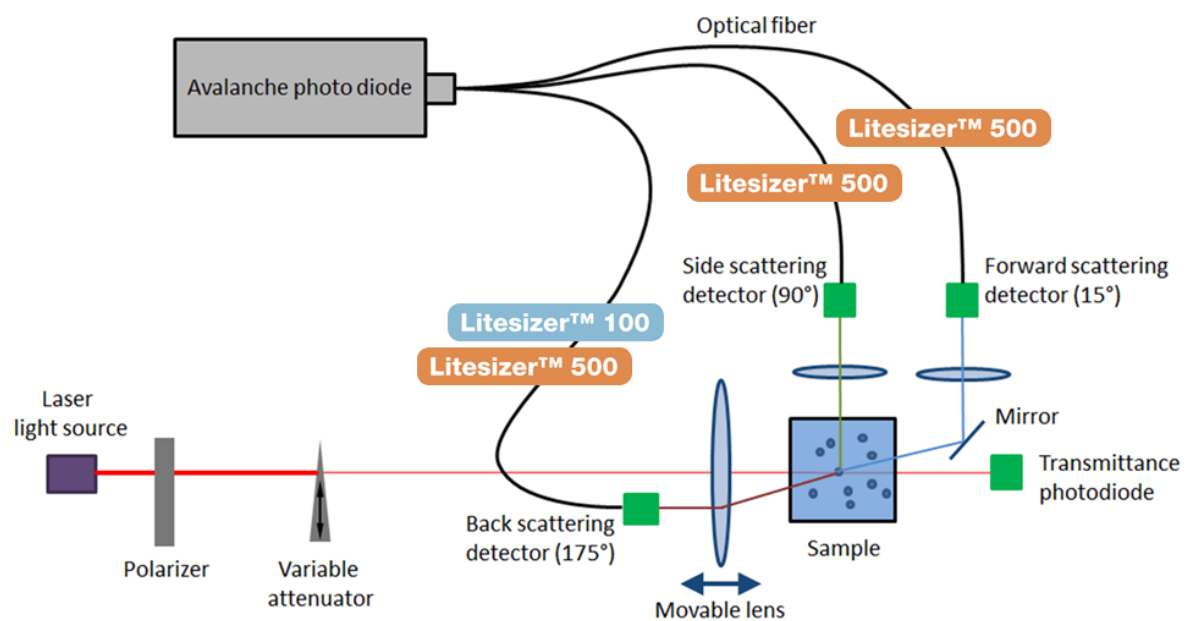


Abbildung 11: zeigt den schematischen Aufbau des Litesizers. Der Laserstrahl wird durch eine Linse in die Probe geschickt, um die 3 Detektoren angeordnet sind, die ihre Daten über optische Leiter an eine Fotoelektrode schicken (23).

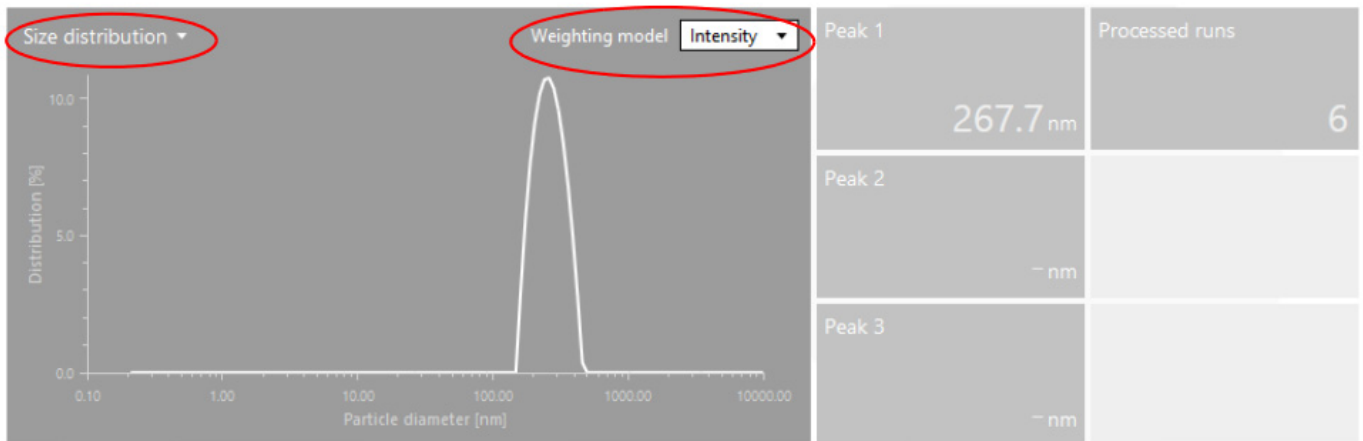


Abbildung 12 : Ergebnis-Diagramm einer Messung des Litesizers (24).

3. Ergebnisse

Der folgende Teil dieser Arbeit zeigt die erhobenen Resultate und deren Auswertung.

Die Ergebnisse sollen klären, ob es zu einer Veränderung der Anteile der verschiedenen Albuminfraktionen (HMA, HNA1 und HNA2) unter ionisierender sowie UV-Strahlung gekommen ist, genauer gesagt, die Veränderungen durch oxidativen Stress am Cys-34.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Versuche mit ionisierender Strahlung, gefolgt von den UV-Strahlungsversuchen und abschließend die Auswertung der Daten aus der Partikelgrößenmessung.

3.1 Auswertung Versuche mit ionisierender Strahlung

3.1.1 Erläuterung des Versuchsablaufs

In den durchgeführten Versuchen wurde eine kontinuierliche Steigerung der applizierten Strahlendosis vorgenommen. Begonnen wurde mit 1 Gy und es wurde bis zu einer Strahlendosis von 100 Gy erhöht.

Der Bereich der verwendeten Strahlendosen repräsentiert einerseits die Strahlendosis einer einzelnen Bestrahlungssitzung, andererseits deckt er auch die Gesamtdosis einer Strahlentherapie eines Carcinom-Patienten ab. Da in einer parallel laufenden Diplomarbeit die Auswirkung der Strahlung auf Albumin bei Prostatakrebs-Patienten untersucht wurde,

wurde auch in dieser Arbeit der Bezug zur Bestrahlungsdosis von Prostatakrebs gewählt. Die applizierte Strahlendosis bei Prostatakrebs liegt pro Sitzung bei 1,8-2 Gy, während die gesamte applizierte Strahlendosis im Laufe der Therapie etwa 78 Gy erreicht (25). Eine Steigerung der Dosis über 100 Gy hätte wohl eine Denaturierung des Proteins zur Folge gehabt und keine Aussage über die Oxidations- oder Reduktionsreaktionen geliefert. Ein weiteres Problem war die Limitierung der wöchentlichen Strahlendosis an der Klinik. Die geplante Steigerung auf eine Strahlendosis von 300 Gy hätte 10% der erlaubten Strahlendosis eines LINAC entsprochen. Da die wöchentliche Dosis für die Behandlung von Patienten benötigt wird, wurde auf eine weitere Steigerung der Strahlung verzichtet.

3.1.2 Ergebnisse der Versuche mit ionisierender Strahlung bei steigender Strahlendosis

In den Versuchen wurden Plasmaproben mit steigenden Dosen bestrahlt und analysiert. In den Abbildungen 13,14 und 15 wurden die verschiedenen Albuminfraktionen (HMA, HNA1 und HNA2) separat ausgewertet, wobei jeder Datenpunkt eine bestrahlte Probe repräsentiert. Bei den Versuchen mit einer Strahlendosis von 1 Gy -3Gy wurden jeweils 3 Proben aus je einem Plasmapool bestrahlt. Bei den höheren Strahlendosen wurden nur mehr 2 bzw. ab einer Strahlendosis von 20 Gy nur noch eine Probe bestrahlt, da in den Versuchen mit niedrigerer Dosis aufgezeigt werden konnte, dass sich die Ergebnisse der bestrahlten Proben aus einem Pool kaum voneinander unterschieden. Bei der höchsten verwendeten Strahlendosis von 100 Gy, wurden aus den Versuchen mit Vollblut, in deren Zuge erneut Plasma bestrahlt wurde, die Ergebnisse in Abbildung 13,14 und 15 hinzugefügt. Eine Reproduktion der Versuche mit 100 Gy wurde durchgeführt, da eine Veränderung des Albumins der Theorie nach am ehesten bei der höchsten Strahlendosis auftreten müsste. Die Ergebnisse zeigen bei niedrigen Bestrahlungswerten eine Differenz zum unbestrahlten Wert, die teilweise größer ist als ermittelte Variationskoeffizient der unbestrahlten Proben in Abbildung 10 (a,b,c). Dies gilt sowohl für HMA, HNA1 und HNA2. Die Differenz zum unbestrahlten Wert ist bei 1 Gy am größten und nimmt tendenziell bei höheren Strahlendosen ab. Bei 3 Gy (Abbildung 13) nimmt HMA sogar im Gegensatz zu den oxidierten Albuminfraktionen HNA1 und HNA2 zu. Bei den höheren Strahlendosen nimmt HMA zwar immer ab, jedoch wird die Differenz zum unbestrahlten Vergleichswert kleiner. Die Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen Strahlendosis und Anstieg der oxidierten Albuminfraktionen besteht, konnte anhand dieser Messreihe widerlegt werden. Würde diese Annahme zutreffen, würde es bei 100 Gy die größte Differenz zum unbestrahlten Vergleichswert geben. In Abbildung 14 und 15 zeigt sich jedoch, dass bei einer Strahlendosis

von 100 Gy keine Differenz größer als der Variationskoeffizient von HNA1 und HNA2 (Tab.16) auftritt.

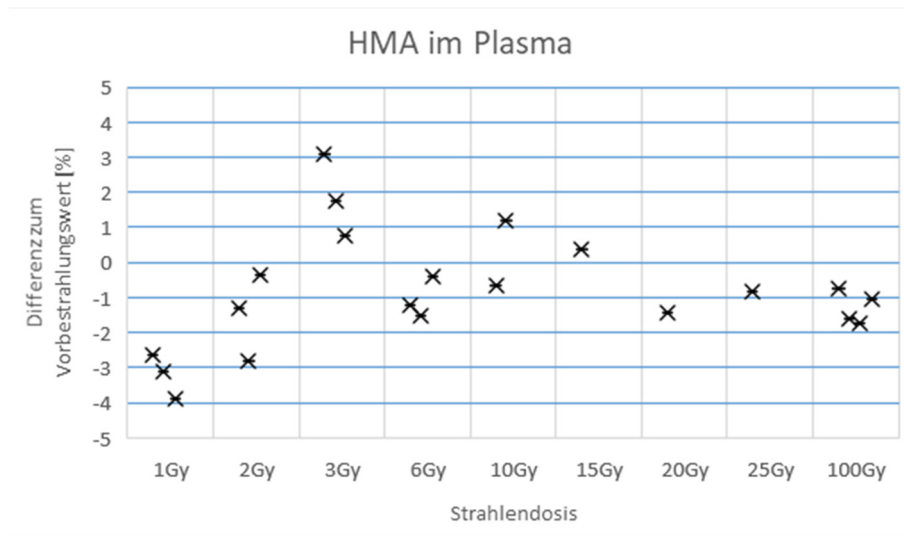


Abbildung 13: Änderung des HMA-Anteils in Prozent im Plasma durch ionisierende Strahlung. ($HMA_{\text{nachher}} - HMA_{\text{vorher}}$).

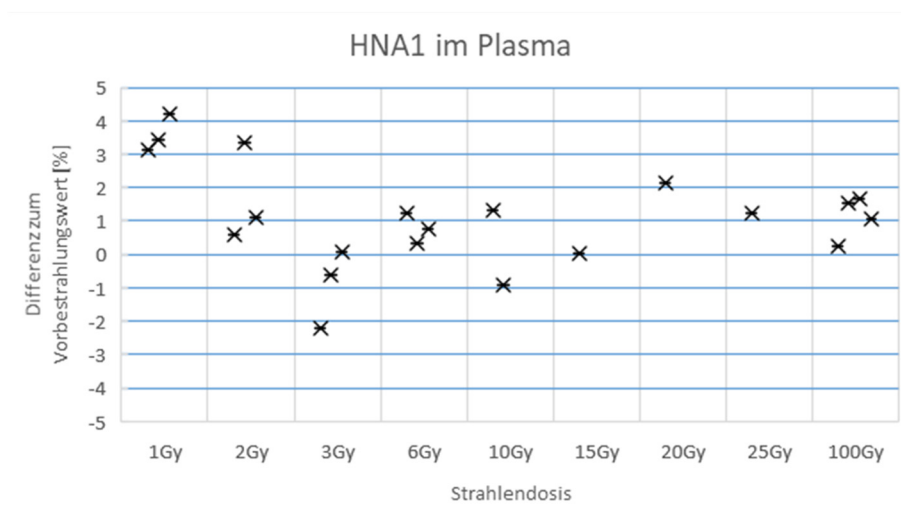


Abbildung 14: Änderung des HNA1-Anteils in Prozent im Plasma durch ionisierende Strahlung. ($HNA1_{\text{nachher}} - HNA1_{\text{vorher}}$).

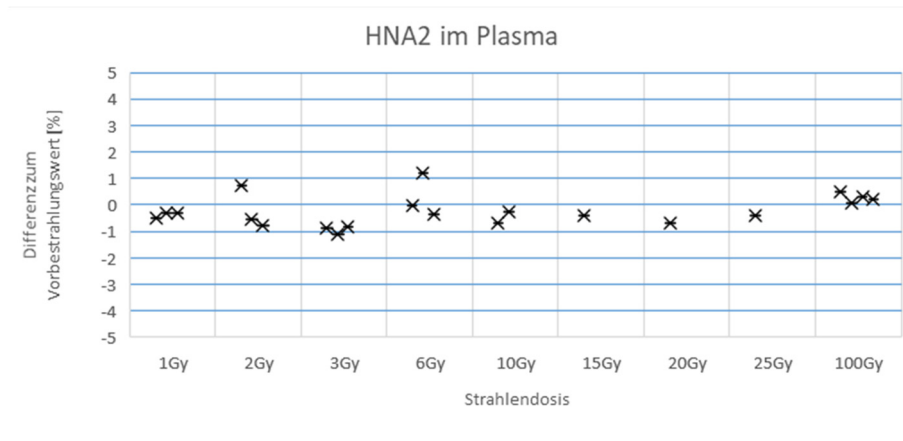


Abbildung 15: Änderung des HNA2-Anteils in Prozent im Plasma durch ionisierende Strahlung ($HNA2_{\text{nachher}} - HNA2_{\text{vorher}}$).

3.1.3 Ergebnisse der Versuche mit ionisierender Strahlung (100 Gy) nach einer Inkubationszeit

Da die Versuche nach Bestrahlung keine Zunahme der Oxidation von Albumin zeigten, wurde untersucht, ob eine zeitlich Komponente eine Rolle spielen könnte. Da reaktive Spezies aufgrund ihrer Reaktivität sehr kurzlebig sind, könnten Folgereaktionen vorliegen, die langsamer verlaufen und zu Änderungen am Albumin führen. Aus diesem Grund wurden Plasmaproben und Vollblut mit 100 Gy bestrahlt und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Analyse erfolgte nach einer Stunde, die zweite Analyse dann nach Inkubation über Nacht. Diese Auswertungen sollten Aufschluss darüber geben, ob die Inkubation einen Einfluss auf den Redox-Zustand hatte. Beim Versuch mit Vollblut sollte auch untersucht werden, ob die Anwesenheit von Zellen einen Einfluss auf das Ergebnis haben könnten. Durch die ionisierende Strahlung könnte es zu einer Lyse der Zellen kommen und z.B. nun aus den Zellen austretende Gluthation könnte eine Reduktion der Albuminfraktionen bewirken. In einer parallel laufenden Diplomarbeit wurde bei Patienten mit Prostatakrebs nach Bestrahlung der Redox-Zustand von Albumin untersucht. In dieser Arbeit wurde eine geringe, aber signifikante Verringerung von HNA1 zu HMA festgestellt. Es stellt sich also die Frage, ob diese Veränderung auch in vitro auftritt. Die Auswertung des Vollbluts erfolgte nach 1 Stunde. Es wurde nicht über Nacht inkubiert. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse von bestrahltem Plasma mit einer Inkubationszeit von 1 Stunde und über Nacht. Die Messung, die sofort nach der Bestrahlung durchgeführt wurde, zeigte praktisch keine Differenz zum unbestrahlten Standard. Diese Messung bestätigt das Ergebnis aus den vorangegangenen Versuchen, dass bei 100 Gy keine Veränderung des Albumins sofort nach Bestrahlung auftritt. Nach einer Stunde Inkubationszeit lässt sich in

Abbildung.16 eine Zunahme von HNA1 feststellen. HMA wird gegenläufig weniger, während HNA2 keine Veränderung zeigt. Die Analyse nach Inkubation über Nacht zeigt, dass HNA1 um 9% zugenommen hat. Jedoch zeigt diese Veränderung auch der unbestrahlte Standard, der ebenfalls bei Raumtemperatur als Kontrolle inkubiert wurde (Tab.6). Die Vermutung, dass langsamere Prozesse, die durch die Bestrahlung ausgelöst wurden, zu Veränderungen der Albumin-Molekülen führten, kann somit widerlegt werden. Wäre die Bestrahlung Ursache für die 9%-Zunahme von HNA1 gewesen, hätte diese Veränderung im unbestrahlten Standard nicht auftreten dürfen. HNA2 zeigte auch bei Inkubation über Nacht keine Veränderung, die über die Genauigkeit der Analytik hinausgegangen wäre.

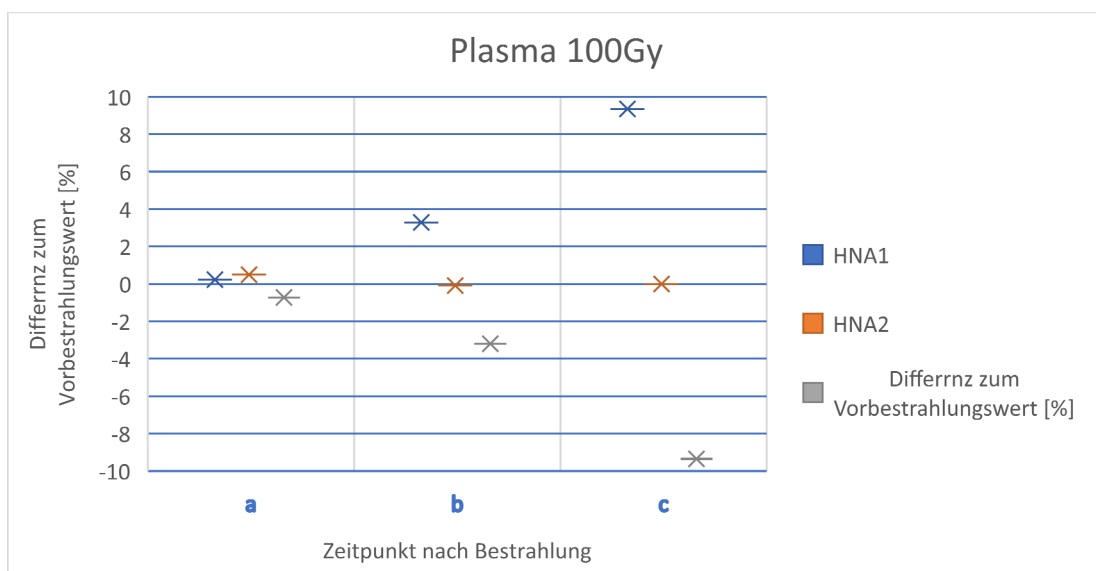


Abbildung. 16: Inkubation nach Bestrahlung. Die Differenzen zur unbestrahlten Probe werden gezeigt. a. sofort nach Bestrahlung, b. 1h nach Bestrahlung und c. nach Inkubation über Nacht

Die Versuche mit Vollblut, die den Einfluss von Zellen zeigen sollten, sind in Abbildung 17 (a,b,c) zusammengefasst. Es wurden Vollblut und Plasma aus Vollblut mit 100 Gy bestrahlt und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich sollte (wie in den vorangegangenen Versuchen) die zeitliche Komponente untersucht werden. In Abbildung 17a zeigt HMA bei der sofortigen Analyse aus dem Plasma eine Abnahme von etwa einem 1%. Nach einer Stunde wurde diese Differenz zum unbestrahlten Standard kleiner. Auch bei der Analyse der Proben aus Vollblut waren nur einige Werte zu ermitteln, die außerhalb der Genauigkeit der Analysemethode lagen. HNA1 zeigte bei allen Analysen Werte (Abbildung 17b), die innerhalb von ihrem Variationskoeffizienten lagen. HNA2 zeigte weder bei sofortiger, noch bei 1 Stunde Inkubationszeit eine signifikante Veränderung zum unbestrahlten Standard (Abbildung 19). Die Versuche mit Vollblut brachten das Ergebnis, dass zwischen Plasma und

Vollblut keine Veränderung von Albumin auftrat. Das heißt, die eine antioxidative Eigenschaft von Vollblut im Vergleich zu Plasma kann ausgeschlossen werden. Des Weiteren wird bestätigt, dass eine Inkubationszeit von 1 Stunde keinen Einfluss auf das Ergebnis hatte.

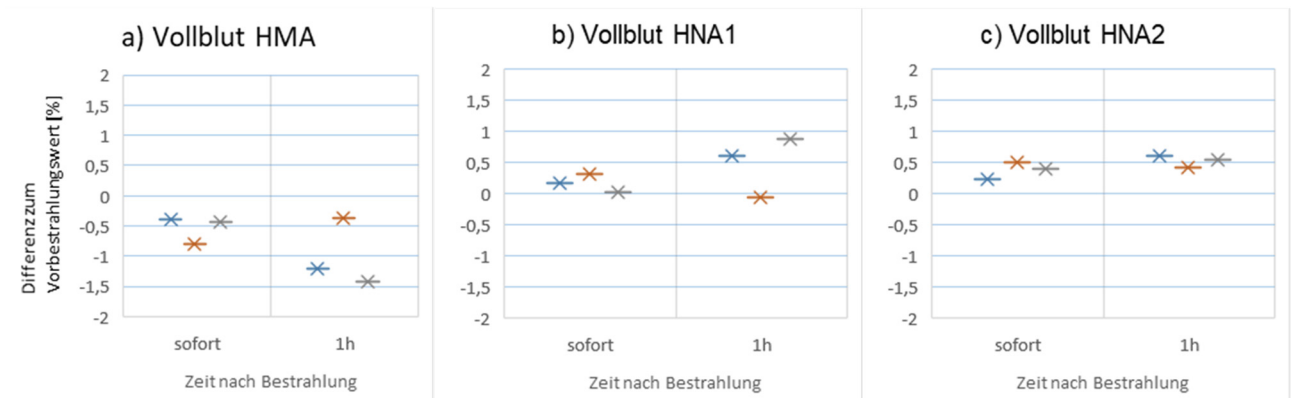


Abbildung. 17 a,b,c): a) Differenz vom HMA zum unbestrahlten Standard. Analyse sofort und nach 1 h Inkubationszeit. b) Differenz vom HNA1 zum unbestrahlten Standard. Analyse sofort und nach 1 h Inkubationszeit. c) Differenz vom HNA2 zum unbestrahlten Standard. Analyse sofort, nach 1 h Inkubationszeit

In Tabelle 9 wurde bestrahltes Spenderplasma untersucht. Es zeigte sich, dass das bestrahlte Plasma (25 Gy) einen höheren Anteil an HNA2 aufweist als die unbestrahlte Kontrolle. Die vorangegangenen Versuche bestätigten aber, dass ein Anstieg der oxidierten Formen keine Abhängigkeit der Strahlendosis aufweist. Der Anstieg von HNA2 ist wahrscheinlich in Folge der Lagerungszeit durch unbekannte Prozesse aufgetreten und keine direkte Folge der Bestrahlung.

3.2 Ergebnisse der Versuche mit UV-Strahlung:

Die Auswertung der Chromatogramme der Versuche mit UV-Strahlung war in Peak Fit nur eingeschränkt möglich, da bei längerer Bestrahlungsdauer die verschiedenen Peaks zueinander nicht mehr ausreichend abgrenzbar waren. Aus diesem Grund wurde in Abbildung 18 (a,b) und 19 (a,b) auf eine quantitative Auswertung zugunsten einer qualitativen verzichtet.

Die Versuche wurden in Anlehnung an eine laufende Studie durchgeführt. In dieser wurde folgende Fragestellung aufgeworfen: Verändert sich im Glaskörper unter UV-Strahlung das vorhandene Albumin?

Da im Glaskörper eine hohe Konzentration von Ascorbinsäure (im Gegensatz zu Albumin) herrscht, wurde die Veränderung in Anwesenheit dieses Antioxidans untersucht.

In Abbildung 18 (a,b) wurde HMA mit und ohne Ascorbinsäure bestrahlt. Es zeigt sich, dass

ohne Ascorbinsäure in Abbildung 18a eine schnelle Verbreiterung und Verwischung der Peaks stattfindet. Die einzelnen Fraktionen sind nicht mehr zueinander abgrenzbar. In Anwesenheit von Ascorbinsäure kann dieses Phänomen aufgehalten werden. Erst nach einer Bestrahlung über Nacht scheint seine Wirkung erschöpft zu sein. Welche Veränderung mit HMA vor sich geht, kann aus dieser Untersuchung nicht festgestellt werden. Es ist davon auszugehen, dass das Wanderungsverhalten von HMA in der HPLC stark eingeschränkt wird. Die angewendete Analyseverfahren stellte sich als ungeeignet zur Detektion der Veränderung dar. Die Verwendung weiterer Analyseschritte würde den Rahmen dieser Diplomarbeit sprengen.

In Abbildung 19 (a,b) lässt sich ebenfalls feststellen, dass die Veränderung von HMA zu HNA1 nahezu äquivalent ist. Es zeigt sich eine Verbreiterung und Verwischung der Peaks nach einer Stunde Bestrahlungszeit. Die Anwesenheit von Ascorbinsäure kann (wie auch in Abbildung 18 b) die Verbreiterung der Peaks aufhalten. Erst bei Bestrahlung über Nacht verliert auch in Abbildung 19b Ascorbinsäure ihre Wirkung und es kommt zu einer Veränderung der Kurve. Die Kurve der Messung über Nacht wurde bewusst nicht in die Grafik aufgenommen, da keine ausreichend verwertbare Kurve zustande kam. Es lässt sich der Trend zur Verbreiterung erahnen, aber mehr nicht.

Bei der Messung aller drei Albuminfraktionen in Sigma-Albumin (siehe Abbildung 20 a,b) zeigt sich eine leichte Abnahme der Peakflächen in der ersten Stunde der Bestrahlung. Ab Minute 60 kommt es zu einer starken Abnahme, bis bei Minute 100 dann keine weitere Auswertung in Peakfit mehr möglich war. Auch bei den Versuchen mit Sigma-Albumin über zwei Stunden konnte die antioxidative Fähigkeit von Ascorbinsäure gezeigt werden.

Die einzelnen Fraktionen zeigen mit Ascorbinsäure über zwei Stunden keinen signifikanten Abfall.

Die Versuche zeigten die Fähigkeit von Vitamin C, die durch UV-Strahlung induzierten Schäden am Albumin zu verhindern bzw. massiv zu verzögern. Die Art der chemischen Veränderung der Albuminmoleküle kann allerdings in dieser Arbeit nicht beantwortet werden.

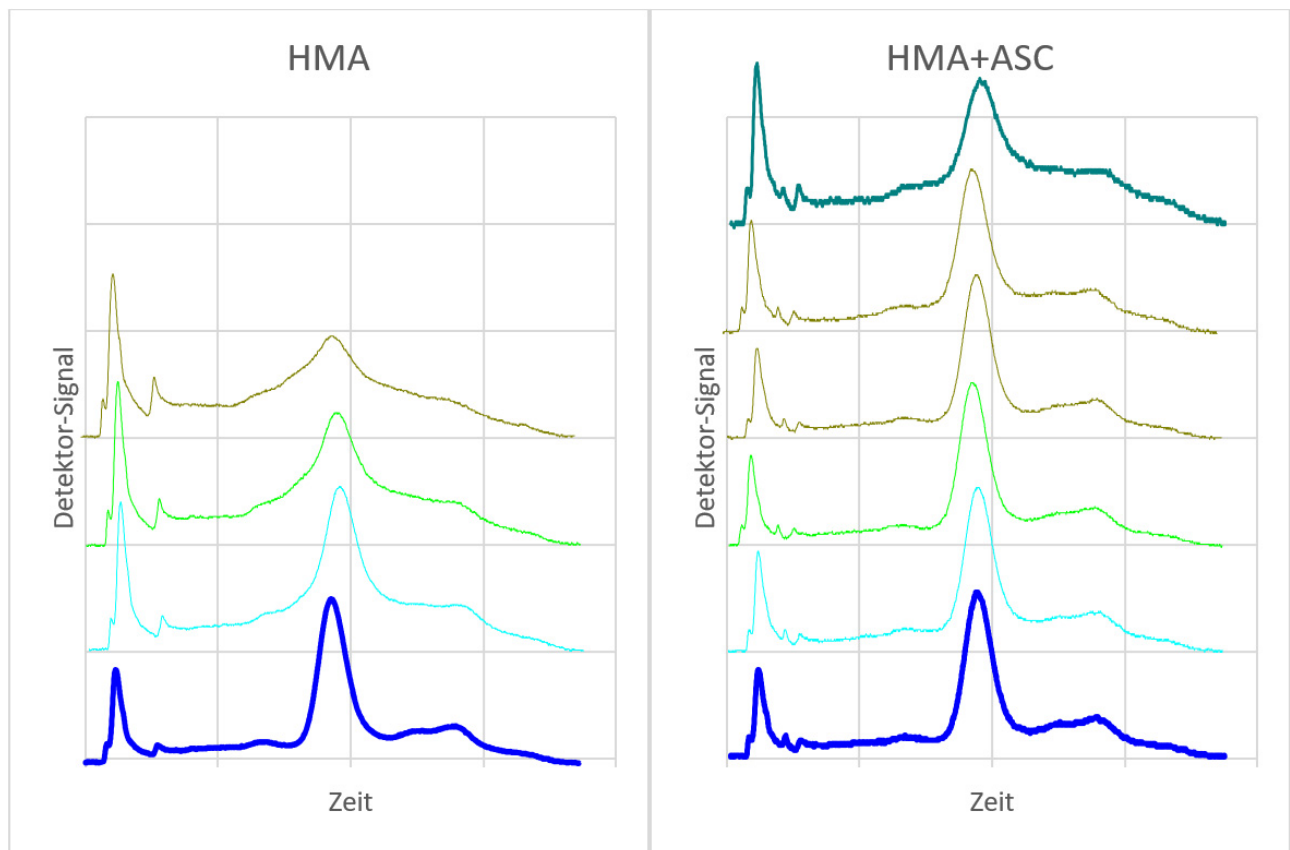


Abbildung 18: a) – linke Abbildung: HMA unter UV-Strahlung. Kurven zeigen die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Von unten beginnend in blau Messung vor Bestrahlung, bei Minute 20, bei Minute 40 und bei Minute 60. **b) – rechte Abbildung:** HMA unter UV-Strahlung + Ascorbinsäure. Kurven zeigen die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Von unten beginnend in blau Messung vor Bestrahlung, bei Minute 20, bei Minute 40 und bei Minute 60. Im Gegensatz zu Abbildung 18a folgen noch Kurven bei Minute 300 und Messung über Nacht.

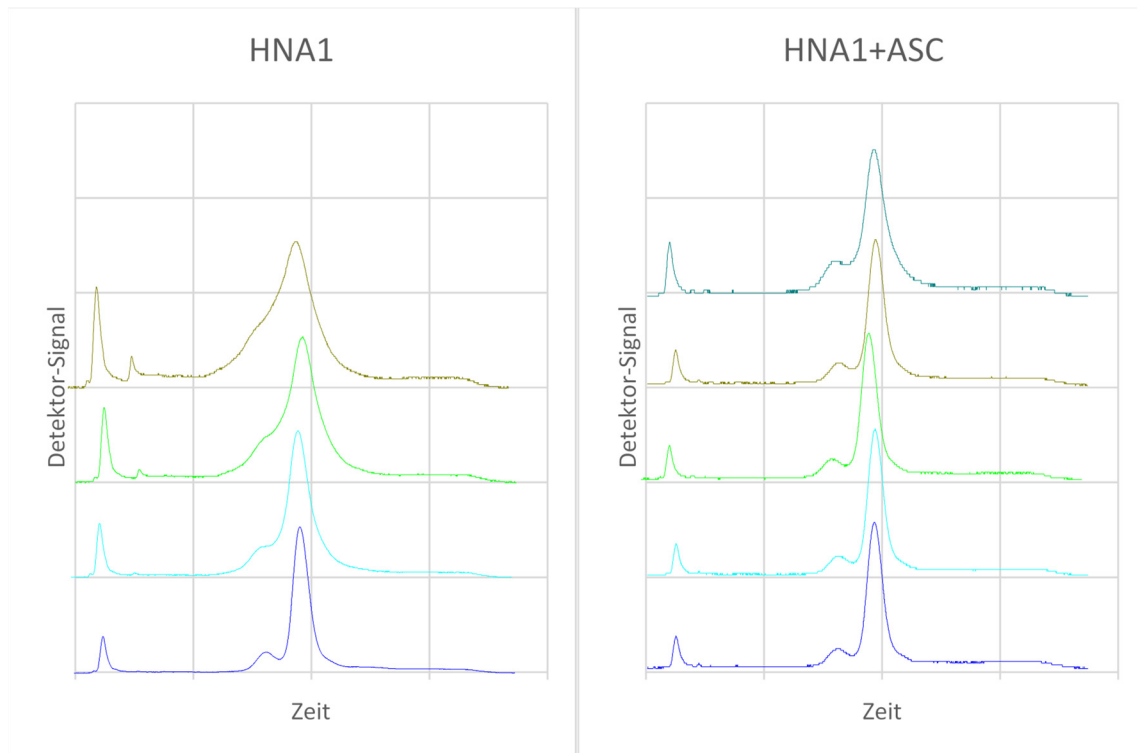


Abbildung 19: a) – linke Abbildung: HNA1 unter UV-Strahlung. Kurven zeigen die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Von unten beginnend in blau Messung vor Bestrahlung, bei Minute 20, bei Minute 40 und bei Minute 60. **b) -rechte Abbildung:** HNA1 unter UV-Strahlung + Ascorbinsäure. Kurven zeigen die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Von unten beginnend in blau Messung vor Bestrahlung, bei Minute 20, bei Minute 40 und bei Minute 60. Im Gegensatz zu Abbildung 19a folgt die Kurve bei Minute 300.

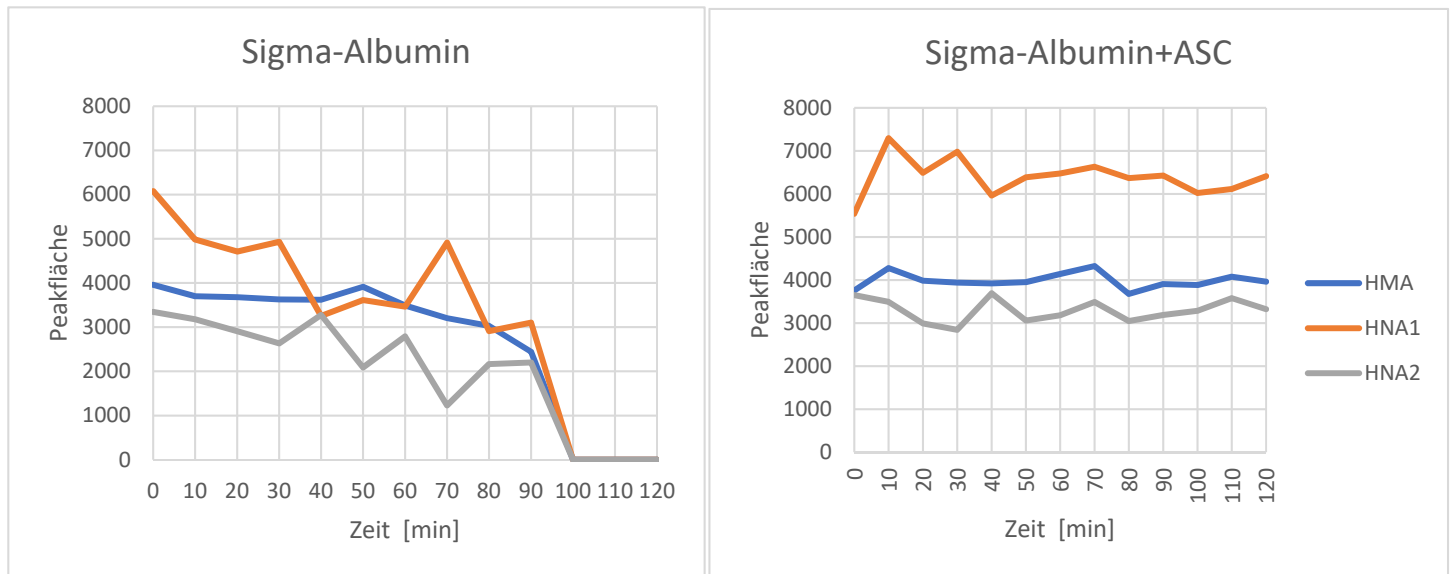


Abbildung 20:a) -linke Abbildung: Albumin (Sigma-Aldrich) unter UV-Bestrahlung über 120min unter Zusatz von Ascorbinsäure (4mmol/ml). Werte alle 10min ermittelt. Auf der Ordinate die Peakfläche. **b) – rechte Abbildung:** Albumin (Sigma-Aldrich) unter UV-Bestrahlung für 120min. Messung alle 10min, nach 100min in Auswertung der Peakflächen nicht mehr möglich. Keine klare Abgrenzung der Kurven zueinander mehr möglich. Auf der Ordinate die Peakfläche

3.3 Messung der Partikelgröße

Um eine mögliche Aggregation der Albuminmoleküle unter Bestrahlung mit UV-Licht auszuschließen zu können, wurden Messungen mit dem Litesizer 500 durchgeführt. Des Weiteren sollte eine Erklärung gefunden werden, ob eine Aggregatbildung unter Umständen für die Ergebnisse der Chromatogramme verantwortlich war. Aggregate würden das Wanderungsverhalten des Albumins in der HPLC beeinflussen.

In Abbildung 21 zeigt sich, dass die Methode zur Vermessung der Partikelgrößen geeignet ist. Sie liefert plausible Ergebnisse.

3.3.1 Auswertung Partikelgrößen

Humanes Albumin (Sigma-Aldrich) wurde 120 min mit und ohne Ascorbinsäure bestrahlt (siehe Tabelle 1a/b). Diese beiden Messungen wurden zuerst durchgeführt und ergaben die konstantesten Ergebnisse. Über 2 Stunden gab es keine Änderung der Partikelgröße, wobei auch die Hinzugabe von Ascorbinsäure keine Auswirkung hatte. Diese Messung schließt eine Aggregatbildung aus.

In Tabelle 3 zeigen sich bei bestrahltem HMA Artefakte. Nur die Werte von Minute 40 und 50 sind aussagekräftig.

Da auch bei Messung mit Ascorbinsäure (siehe Tabelle 2b) keine Veränderung der Partikelgröße zu beobachten war, kann davon ausgegangen werden, dass in Tabelle 2a Fehler aufgetreten sind. Eine Aggregat-Bildung wäre nur bei Proben ohne Ascorbinsäure wahrscheinlich, wie aus den Chromatogrammen zu entnehmen ist.

Die Messungen von HNA1 in Tabelle 3a zeigen ebenfalls keine Änderung der Partikelgröße. Der erhöhte Wert in 3 bei 20 Minuten lässt auf ein Artefakt schließen.

Da der Litesizer 500 nur als Demogerät für zwei Wochen zur Verfügung stand, war es nicht möglich, die fehlerhaften Messungen zu wiederholen. Eine weitere Ursache der Artefakte könnte die fehlende Praxis im Umgang mit dem Gerät gewesen sein.

In Zusammenschau der Ergebnisse der Vermessungen mit dem Litesizer 500 lässt sich eine Aggregatbildung von Albumin-Molekülen durch UV-Bestrahlung mit großer Sicherheit ausschließen. Die Aussagekraft der Ergebnisse leidet durch die Artefakte. Da jedoch während der längeren Bestrahlungszeiten keine Veränderung der Partikelgröße zu detektieren war, kann eine Aggregation bei den Messungen mit verfälschten Werten mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

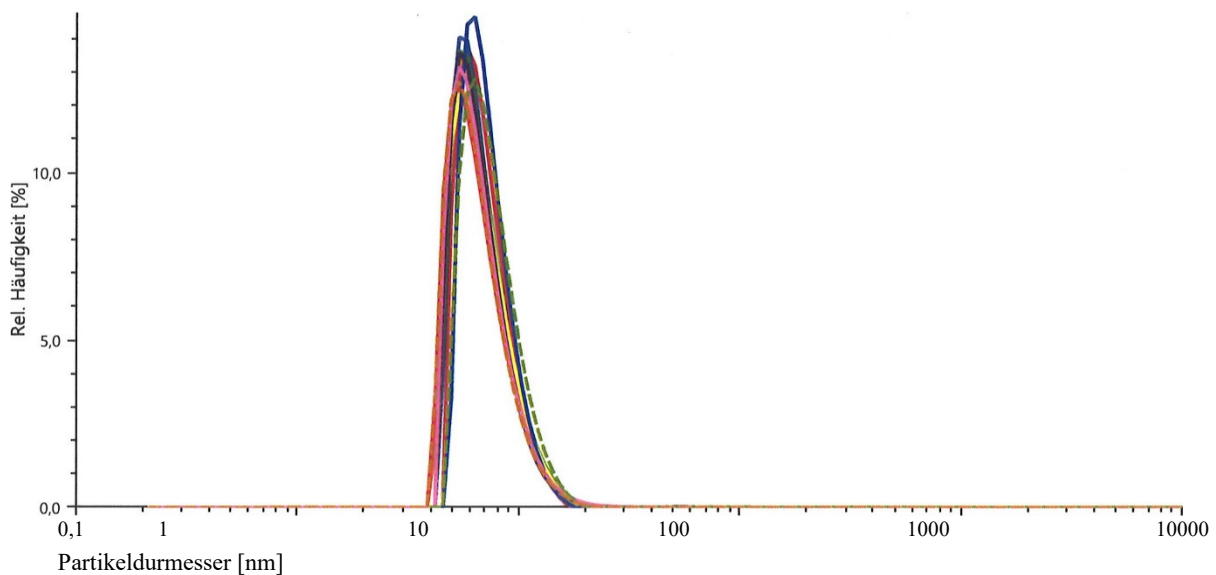


Abbildung 21: Partikeldurchmesser und ihre relative Häufigkeit.

Zeit	Partikeldurchmesser in [nm] (a)	Partikeldurchmesser in [nm] (b)
HSA vor Bestrahlung	7	7
HSA 10min	7	7
HSA 20min	7	7
HSA 30min	7	7
HSA 40min	7	7
HSA 50min	7	7
HSA 60min	7	7
HSA 70min	7	7
HSA 80min	7	7
HSA 90min	7	7
HSA 100min	7	7
HSA 110min	7	7
HSA 120min	8	7

Tabelle 1: Partikelgrößen des mengenmäßig größten Peaks. Es wurde Albumin (Sigma-Aldrich) mit ASC (a) und ohne ASC bestrahlt (b) über 2 Stunden lang alle 10min ein Wert ermittelt.

Zeit	Partikeldurchmesser in [nm] (a)	Partikeldurchmesser in [nm] (b)
HMA vor Bestrahlung	61	10
HMA 10min	38	8
HMA 20min	62	7
HMA 30min	60	10
HMA 40min	11	11
HMA 50min	9	11
HMA 60min	15	7

Tabelle 2: Partikelgrößen des mengenmäßig größten Peaks. Es wurde HMA ohne ASC (a) und HMA mit ASC (b) über 1 Stunde mit UV (254nm) bestrahlt und alle 10min eine Messung durchgeführt.

Zeit	Partikeldurchmesser in [nm] (a)	Partikeldurchmesser in [nm] (b)
HNA1 vor Bestrahlung	6	13
HNA1 10min	27	6
HNA1 20min	7	7
HNA1 30min	7	7
HNA1 40min	7	5
HNA1 50min	6	5
HNA1 60min	6	8

Tabelle 3: Partikelgrößen des mengenmäßig größten Peaks. Es wurde HNA1 ohne ASC (a) und HNA1 mit ASC (b) bestrahlt, über 1 Stunde lang alle 10min ein Wert ermittelt.

4. Interpretation und Diskussion

Das Fazit, das aus den Ergebnissen der Versuche mit ionisierender Strahlung gezogen werden kann, ist folgendes: eine Veränderung, die über das Maß der Variabilität des Messvorgangs hinausgeht, konnte nicht festgestellt werden. Die Überprüfung der Streubreite der HPLC durch geübtes Personal ergab für HMA einen Variationskoeffizienten von 0,5%, für HNA1 von 2% und für HNA2 von 4,5%. Die Variationskoeffizienten der bestrahlten Proben zeigten zwar erhöhte Werte (siehe Tabelle 17), dennoch nicht so ausgeprägt, um von signifikanten Veränderung des Albumins sprechen zu können. Der Variationskoeffizient (durch Bestrahlung) bei HNA2 war in einigen Fällen sehr viel höher als der der Analytik (siehe Tabelle 17). Jedoch ist hier zu bedenken, dass HNA2 nur einen sehr kleinen Prozentsatz des Albumins ausmacht. Daraus lässt sich schließen, dass eine große Veränderung bei HNA2 in absoluten Zahlen praktisch keine signifikante Veränderung durch Bestrahlung bedeutet. Außerdem erschwert die nicht vollständige chromatographische Trennung eine exakte Quantifizierung.

Schwankungen der Ergebnisse haben ihre Ursache wahrscheinlich in der Durchführung der Experimente und nicht in einer direkten Korrelation zwischen Strahlendosis und Veränderung der Albumin-Moleküle.

Die bestrahlten Proben wurden über eine bestimmte Wegstrecke transportiert. Währenddessen waren sie mit Eis gekühlt, allerdings nicht während der Bestrahlung, die im Falle von 100Gy fast eine halbe Stunde dauerte. Das heißt, es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Veränderungen, die beobachtet wurden, nicht Folgen der natürlichen Oxidation des Albumins waren.

Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der HPLC Analytik wurde von der Probenvorbereitung bis zur Auswertung der Chromatogramme von geübtem Personal durchgeführt und weisen aus diesem Grund zu hoher Wahrscheinlichkeit kleinere Variationskoeffizienten als die bestrahlten Proben auf.

Für einen solchen persönlichen Faktor würde auch sprechen, dass die Schwankungen der Ergebnisse von Beginn zum Ende der Arbeit (von niedrigen zu hohen Dosen) geringer werden. Dieses Phänomen könnte durch die Übung und bessere Vertrautheit mit der Analytik erklärt werden.

Die Annahme, dass es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Strahlendosis und Veränderung der Albuminfraktionen gibt, wird durch die durchgeführte Statistik,

untermauert.

Die statistische Auswertung nach Pearson mittels linearer Regression zeigte, dass die Änderungen der Albuminfraktionen mit der Bestrahlungsdosis ein sehr kleines r aufweist und das Vertrauensintervall die Null (über weite Teile) miteinschließt. Damit gibt es keinen signifikanten Zusammenhang zwischen Strahlendosis und Redox-Zustand. Die Mittelwerte liegen bei HMA (Abbildung.22) etwas unter 0, bei HNA1 (Abbildung.23) etwas drüber, bei HNA2 (Abbildung.24) praktisch bei 0. So könnte sich also ein Trend von HMA zu HNA1 feststellen lassen, jedoch kein signifikanter Zusammenhang und schon gar keine Dosis-Wirkungsbeziehung.

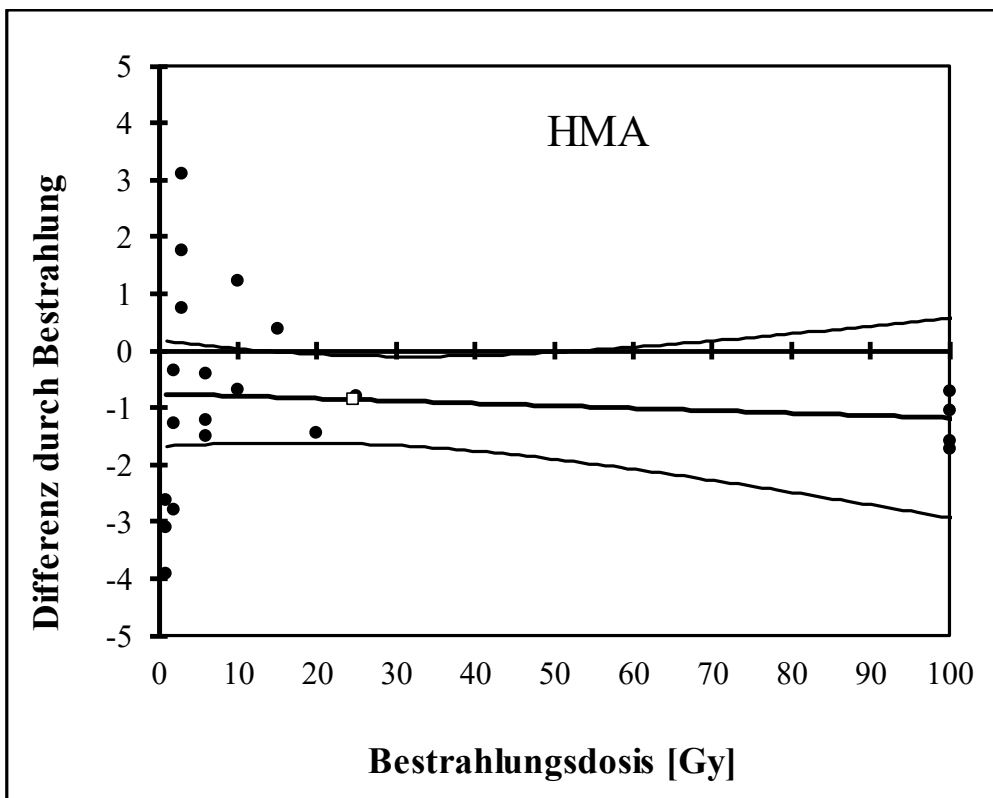


Abbildung 22: lineare Regression HMA.

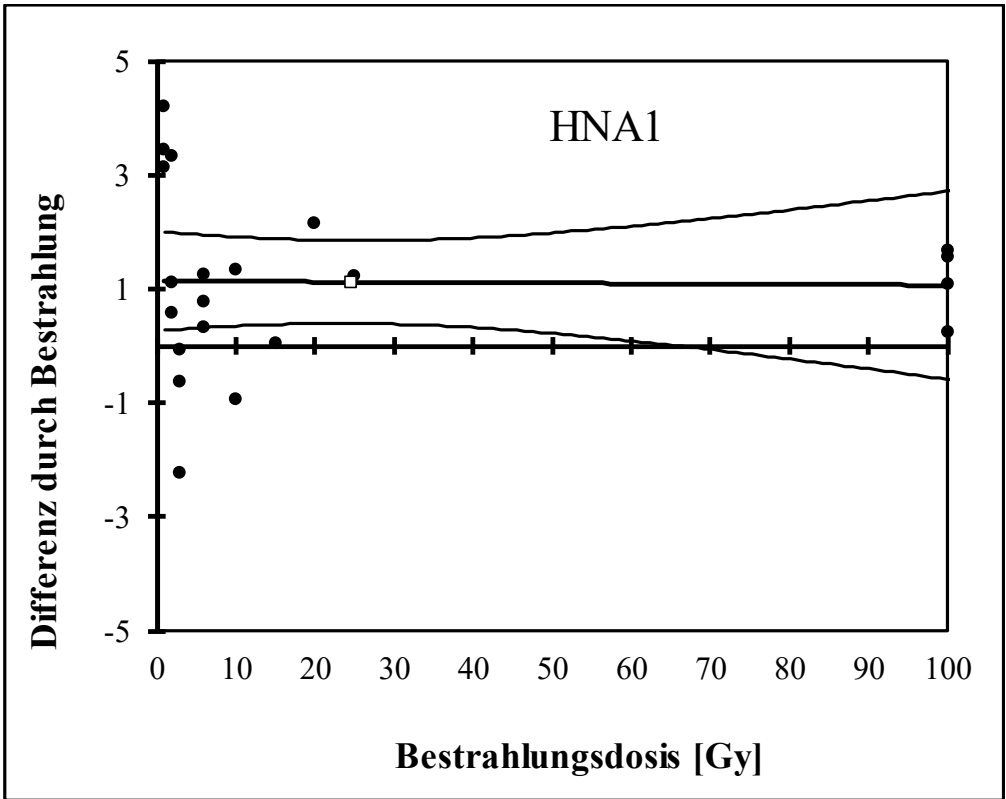


Abbildung. 23: lineare Regression HNA1.

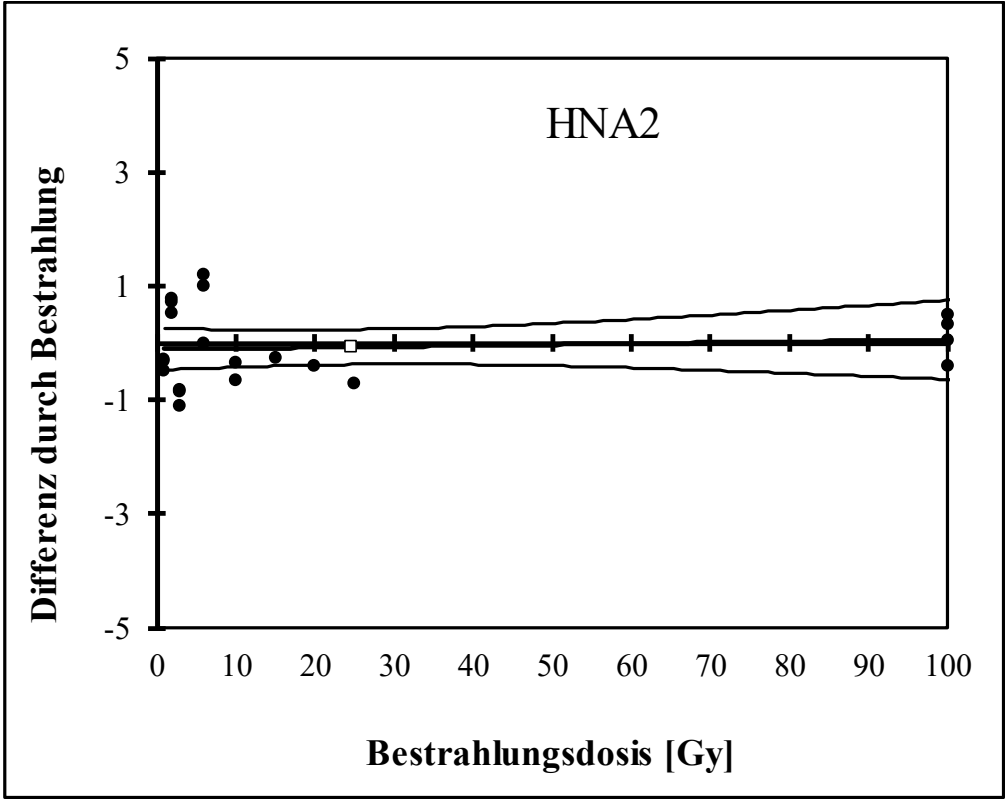


Abbildung. 24: lineare Regression von HNA2.

Die Veränderungen von HMA und HNA1 waren bei Strahlendosen von 1-6 Gy am stärksten (siehe Abbildung 16/17). Diese Veränderungen waren bei höheren Dosen sogar kleiner. Bei höheren Strahlendosen entstehen mehr ROS. Folglich müssten Veränderungen bei höheren Dosen verstärkt auftreten. Die Ergebnisse sprechen jedoch klar dagegen.

Des Weiteren wird in der Arbeit von Cho Y und Song K (2000) gezeigt, dass für signifikante Änderungen der Albumin-Struktur sehr viel höhere Dosen verwendet werden müssen. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich zwar nur bedingt damit vergleichen, denn es wurden nicht die einzelnen Albuminfraktionen untersucht, sondern deren Proteinstruktur. Trotzdem lässt sich aus dieser Arbeit der Schluss ziehen, dass für Veränderungen wohl weit höhere Dosen zu verwenden sind. Die in dieser Arbeit verwendeten Dosen orientierten sich jedoch an den in der Strahlentherapie zum Einsatz kommenden Bestrahlungsschemata. Diese sind auf etwa 70 Gy limitiert und eine starke Erhöhung über dieses Limit wäre der Intention der Arbeit zuwidergelaufen.

Die Versuche mit UV-Strahlung zeigten, dass UV-Strahlung (254 nm) eine qualitativ messbare Wirkung auf die Albuminfraktionen hatte. Die starke Wirkung der UV-C Strahlung auf Albumin könnte einerseits durch direkte Schädigung am Albumin-Molekül entstehen, andererseits in der Erzeugung von reaktiven Spezies, ausgehend von dem in der Lösung vorhandenen Sauerstoffes, zu suchen sein. UV-C kann O_2 in zwei Atome O spalten. Dieser atomare Sauerstoff könnte für die Schädigung des Albumins verantwortlich sein.

Des Weiteren zeigte sich in den durchgeführten Versuchen die Wirksamkeit von Vitamin C, die Veränderung von Albumin zumindest für eine gewisse Zeitspanne zu verhindern. Aus diesem Grund lässt sich Ascorbinsäure ein eindeutiger Schutzfaktor für Proteine unter UV-Strahlung zuschreiben. Die Fähigkeit von Ascorbinsäure, die Veränderung zu verhindern, kann mehrere Gründe haben. Zum einen liegt das Maximum des Absorptionsspektrums (Abbildung. 25) von Vitamin C für UV-Strahlung (260 nm) nahe der verwendeten Wellenlänge von 254 nm. Auch erwiesen ist, dass Ascorbinsäure neben Alpha-Tocopherol ein wichtiger Scavenger von ROS ist. Die hohe Dichte in der Epidermis etwa lässt darauf schließen, dass sie an dem Ort konzentriert ist, an dem UV-Strahlung am ehesten Schaden anrichten könnte (26).

Die Fähigkeit von Ascorbinsäure als topischer Schutz vor UV-Strahlung wurde in Versuchen bewiesen und ist ein weiterer Punkt, der die schützenden Eigenschaften von Vitamin C gegen UV-Strahlung hervorhebt. Prophylaktische Gabe von Vitamin C reduzierte sowohl den Schaden durch UVA als auch durch UVB. Des Weiteren lässt sich in der Arbeit ein Grund

für den Wirkungsverlust der schützenden Eigenschaften finden. Vitamin C scheint selbst anfällig für UV-Schaden zu sein (28).

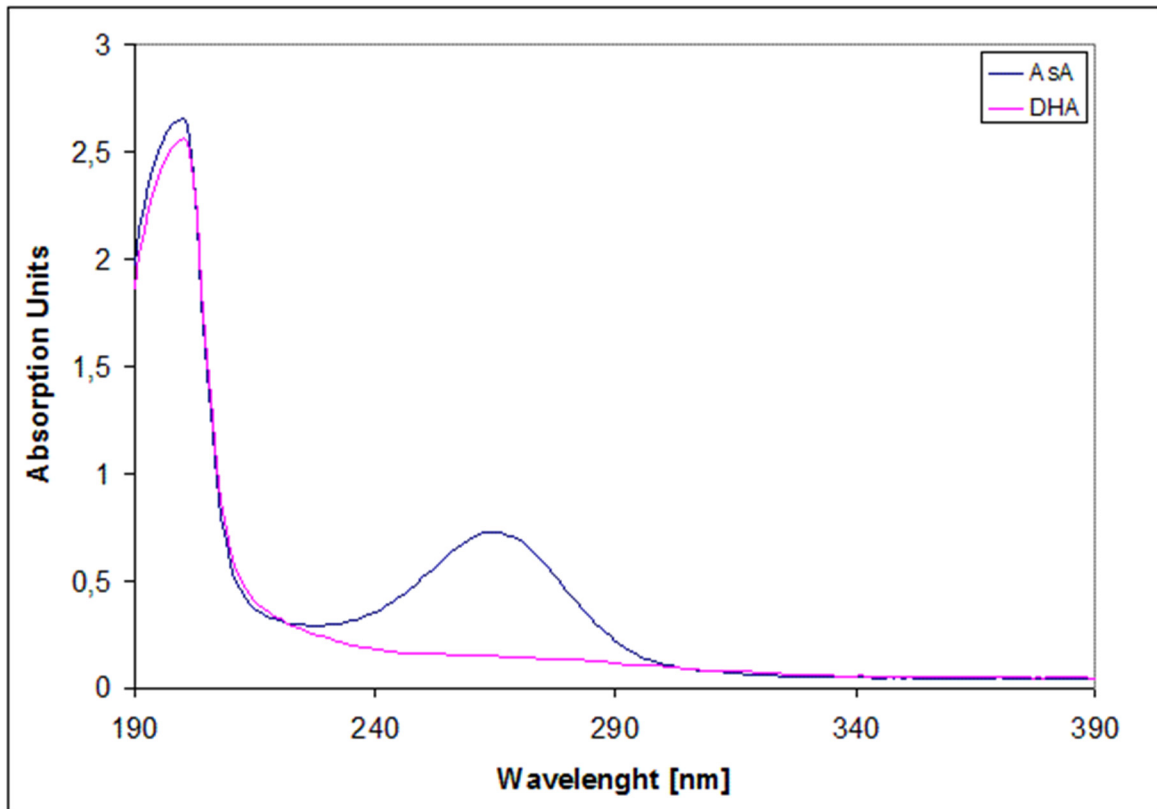


Abbildung 25: Absorption Spektrum von Ascorbinsäure in blau (27).

Ein Kritikpunkt, der berücksichtigt werden muss, ist die fehlende Untersuchung der durch UV-Strahlung entstehenden Verbindungen. Die Intention war, den Redox-Zustand von Albumin anhand Cys-34 zu untersuchen. Durch UV-Strahlung kam es jedoch zu offensichtlich wesentlich schwerwiegenderen Veränderungen am Albumin, wodurch es mit der angewandten HPLC-Methode nicht mehr nachweisbar war.

Mittels Gelelektrophorese könnten Bruchstücke zwar nachgewiesen, aber nicht identifiziert werden. Detailliertere Untersuchungen, z.B. mit Massenspektrometrie, hätten jedoch den Umfang dieser Arbeit gesprengt.

Die Messungen mit dem Litesizer waren zumindest ein Ansatz in der Differenzierung der entstehenden Moleküle. Größere Aggregate, die bei der Bestrahlung durch UV-Licht entstanden wären und das Wanderverhalten der Moleküle in der HPLC verändert hätten, wären nachweisbar gewesen. Diese Messungen zeigten selbst nach 2 Stunden Bestrahlungszeit keine Veränderung der Partikelgröße.

Zusammenfassend lässt sich über die Versuche mit ionisierender Strahlung folgendes sagen: Die Versuche wurden in vitro mit den Dosen durchgeführt, die ein Patient in einer einzelnen Bestrahlungssitzung appliziert werden. Des Weiteren wurde die Proben auch mit der Strahlungsdosis eines gesamten Behandlungszyklus bestrahlt. Bei keinem der Versuche kam es zu einer signifikanten Veränderung des Albumins. Natürlich lassen sich diese in vitro durchgeführten Versuche nicht direkt auf den Versuch in vivo übertragen.

Die Versuche mit UV-Strahlung wurden mit Albumin und Ascorbinsäure in Konzentrationen durchgeführt, die denen im menschlichen Glaskörper entsprechen. In Vorversuchen mit UV-B Strahlung zeigte sich keine Veränderung, bei UV-C Strahlung zeigte sich eine starke Veränderung der Albumin-Moleküle. Das vorhandene Vitamin C konnte diese Veränderung zum größten Teil verhindern.

5. Literaturverzeichnis

- (1) Jelkmann W. Blut. In: Schmidt, Lang, Heckmann, editor. Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie. 31. Auflage. Heidelberg: Springer; 2010.p.478-480.
- (2) Müller-Newen G. Petrides PE. Blut-Bestandteil und Blutplasma. In: Heinrich PC, Müller M, Graeve L, editor. Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag; 2014. p.858-861.
- (3) Peters Jr T. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications.: Academic press; 1995.
- (4) Horn F., et al., editors. Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 5. Auflage. Thieme Verlag; 2012.p.518-519.
- (5) Evans T. Review article: albumin as a drug—biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(s5):6-11.
- (6) Oettl K, Stauber RE. Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol* 2007;151(5):580-590.
- (7) Quinlan GJ, Martin GS, Evans TW. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* 2005;41(6):1211-1219.
- (8) Curry, S. et al. *Nat. Struct. Biol.*(1998) 5: 751-753;PDB-ID: 1BJ5.
- (9) Maier P, Hartmann L, Wenz F, Herskind C. Cellular Pathways in Response to Ionizing Radiation and Their Targetability for Tumor Radiosensitization. *Int J Mol Sci* 2016 January 14;17(1):. doi:10.3390/ijms17010102.
- (10) Chen,H.H.W, Kuo,M.T. Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges.*Oncotarget*, 2017.

- (11) Schulz,N.; Chaachouay,H.; Nytko,K.J.; Weyland,M.S.; Roos,M.; Fuchslin,R.M.; Guscetti,F.; Scheidegger,S.; Rohrer Bley,C. Dynamic In Vivo Profiling of DNA Damage and Repair after Radiotherapy Using Canine Patients as a Model. *Int.J.Mol.Sci.*, 2017, 18, 6, 10.3390/ijms18061176.
- (12) Cho Y, Song K. Effect of γ -irradiation on the molecular properties of Bovine Serum Albumin and β -Lcatoglobulin. *BMB Reports* 2000;33(2):133-137.
- (13) Sauer R. Beschleuniger. In: Sauer R, editor. *Radiologie.3., völlig überarbeitete Auflage.* München: Urban & Fischer; 2006. p. 340-342.
- (14) Buschmann M. Evaluation and implementation of a grid-based Boltzmann equation solver for dose calculation in clinical radiation therapy treatment planning. *Graz University of Technology.* 2014(März). p. 33-37.
- (15) Sinha RP, Häder D. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochemical & Photobiological Sciences* 2002;1(4):225-236.
- (16) PoljÅ;ak B, Fink R. The Protective Role of Antioxidants in the Defence against ROS/RNS-Mediated Environmental Pollution. *Oxid Med Cell Longev* 2014;2014:10.1155/2014/671539.
- (17) Carr AC, Frei B. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am J Clin Nutr* 1999 June 01;69(6):1086-1107.
- (18) Khassaf M, McArdle A, Esanu C, Vasilaki A, McArdle F, Griffiths R, et al. Effect of vitamin C supplements on antioxidant defence and stress proteins in human lymphocytes and skeletal muscle. *J Physiol (Lond)* 2003;549(2):645-652.
- (19) Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, a-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 1993;300(2):535-543.

(20) Sato T, Kinoshita M, Yamamoto T, Ito M, Nishida T, Takeuchi M, et al. Treatment of Irradiated Mice with High-Dose Ascorbic Acid Reduced Lethality. PLoS One 2015 February 04;10(2):. doi:10.1371/journal.pone.0117020.

(21) Anton Paar.Litesizer500. available at:

<http://www.anton-paar.com/?eID=documentsDownload&document=57052&L=1>

accessed:13:51, 16.6.2017

(22) Sartor M. Dynamic light scattering. University of California, San Diego 2003:2-21.

(23) Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt für diese Diplomarbeit von Anton Paar GmbH durch Dr. Christopher Fradler (Head of Particle Characterization).

(24) Anton Paar.Litesizer500. available at:

<http://www.anton-paar.com/?eID=documentsDownload&document=57259&L=0>

accessed:22:51, 25.8.2017

+

(25) Bolla M, Gonzalez D, Warde P, Dubois JB, Mirimanoff R, Storme G, et al. Improved survival in patients with locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy and goserelin. N Engl J Med 1997;337(5):295-300.

(26) Schuch,A.P., Moreno,N.C., Schuch,N.J., Menck,C.F.M., Garcia,C.C.M., et al. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. Free Radic.Biol.Med., 2017, 107, 110-124.

(27) Wikipedia.Ascorbinsäure.available at:

https://de.wikipedia.org/wiki/Ascorbins%C3%A4ure#/media/File:AsA_absorption.png

accessed:22:15, 18.10.2017

(28) D.Darr, S.Combs, S.Dunston,* T.Manning* and S.Pinnell., et al. Topical vitamin C protects porcine skin from ultraviolet radiation-induced damage. British Journal of Dermatology (1992) 127. 247 - 253.

6. Anhang

Tabelle 4	HMA (a)	HNA 1 (b)	HNA 2 (c)	Gesamt (d)	% HMA (e)	% HNA 1 (f)	% HNA 2 (g)
Albumin Plasma1 vorher	1792	600	47	2438	73	25	2
Albumin Plasma1 1 1Gy	1829	71	37	2582	71	28	1
Albumin Plasma1 2 1Gy	1783	710	41	2534	70	28	2
Albumin Plasma1 3 1Gy	1689	699	39	2428	70	29	2
Albumin Plasma2 vorher	1856	718	46	2621	71	27	2
Albumin Plasma2 1 2Gy	1920	773	68	2761	70	28	2
Albumin Plasma2 2 2Gy	1711	773	31	2514	68	31	1
Albumin Plasma2 3 2Gy	1920	777	27	2724	70	29	1
Albumin Plasma3 vorher	1853	807	68	2728	68	30	3
Albumin Plasma3 1 3Gy	1945	749	45	2739	71	27	2
Albumin Plasma3 2 3Gy	1846	767	37	2650	70	29	1
Albumin Plasma3 3 3Gy	1818	785	45	1597	114	49	3

Tabelle 4: Ergebnisse der Versuche mit gepoolten Plasmaproben (Strahlungsdosis 1-3Gy). a) Peakfläche HMA, b) Peakfläche HNA1, c) Peakfläche HNA2, d) gesamte-Peakfläche(HMA+HNA1+HNA2), e) Anteil HMA [%], f) Anteil HNA1 [%], g) Anteil HNA2 [%].

Tabelle 5	HMA	HNA 1	HNA 2	gesamt	% HMA	% HNA 1	% HNA 2
Albumin Plasma vorher	1748	588	52	2389	73	25	2
Albumin Plasma 6Gy	1910	687	58	2655	72	26	2
Albumin Plasma 6Gy	716	249	34	999	72	25	3
Albumin Plasma 6Gy	1864	651	47	2562	73	25	2
Albumin Plasma 10Gy	1839	658	39	2536	73	26	2
Albumin Plasma 10Gy	2090	666	54	2810	74	24	2
Albumin Plasma 15Gy	1083	363	26	1473	74	25	2
Albumin Plasma 20Gy	1657	618	34	2309	72	27	1
Albumin Plasma 25Gy	1873	669	46	2588	72	26	2

Tabelle 5: Ergebnisse der Plasmaproben mit Strahlendosis 6-25Gy.

Tabelle 6	HMA	HNA 1	HNA 2	gesamt	% HMA	% HNA 1	% HNA 2
Pool vorher	1562	677	49	2288	68	30	2
Pool 100Gy sofort	1767	780	69	2617	68	30	3
Pool 100Gy 1h danach	1728	873	55	2656	65	33	2
Pool 100Gy über Nacht	1559	1030	57	2646	59	39	2
Pool Kontrolle über Nacht unbestrahlt	1472	959	48	2478	59	39	2

Tabelle 6: Plasmaproben mit Strahlendosis 100Gy. Werte wurden nach sofort, nach einer Stunde Inkubationszeit und Inkubationszeit über Nacht erhoben.

Tabelle 7	HMA	HNA 1	HNA 2	gesamt	% HMA	% HNA 1	% HNA 2
Albumin Plasma1 vorher	5830	1971	100	7902	74	25	1
Albumin Plasma2 vorher	7136	1560	135	8831	81	18	2
Albumin Plasma1 100Gy	5218	1822	130	7170	73	25	2
Albumin Plasma1 100Gy	5548	1951	130	7629	73	26	2
Albumin Plasma1 100Gy	5591	1919	127	7637	73	25	2
Albumin Plasma2 100Gy	6103	1480	122	7704	79	19	2
Albumin Plasma2 100Gy	6064	1482	121	7668	79	19	2
Albumin Plasma2 100Gy	5974	1403	112	7490	80	19	1
Albumin Vollblut1 100Gy	5425	1856	112	7393	73	25	2
Albumin Vollblut1 100Gy	5622	1946	136	7704	73	25	2
Albumin Vollblut1 100Gy	5442	1853	124	7418	73	25	2
Albumin Vollblut1 100Gy 1h Ink	5499	1936	142	7577	73	26	2
Albumin Vollblut1 100Gy 1h Ink	5704	1933	132	7769	73	25	2
Albumin Vollblut1 100Gy 1h Ink	7057	2517	178	9752	72	26	2

Tabelle 7: Ergebnisse der Plasmaproben und Vollblut mit Strahlungsdosis 100Gy. Die Versuche mit Vollblut wurden durchgeführt, um festzustellen zu können, ob das Vorhandensein von Blutzellen einen Einfluss auf die Veränderung des Albumins hätte.

Tabelle 8	HMA	HNA1	HNA 2	gesamt	% HMA	% HNA1	% HNA 2
Grifols KON vor Bestrahlung	3385	4708	2776	10868	31	43	26
Grifols 1 25Gy	3702	4669	3127	11498	32	41	27
Grifols 2 25Gy	4131	4810	3124	12066	34	40	26
Grifols 3 25Gy	3930	4743	3010	11684	34	41	26
HMA KON vor Bestrahlung	3869	1151	891	5911	65	19	15
HMA 25Gy	3733	1063	803	5599	67	19	14
HNA1 KON vor Bestrahlung	7863	665	390	8918	88	7	4
HNA1 25Gy	10460	655	172	11286	93	6	2

Tabelle 8: Ergebnisse der reinen Albuminproben (Grifols), HMA und HNA1. Die Versuche mit reinen Albuminproben wurden durchgeführt, um die Wirkung von im Plasma vorhandenen Antioxidantien auszuschließen zu können.

Tabelle 9	HMA	HNA1	HNA2	gesamt	%HMA	%HNA1	%HNA2
Plasma KON	7632	2313	312	10256	74	23	3
Plasma 25Gy	6712	2056	413	9182	73	22	5

Tabelle 9: Ergebnisse des bestrahlten Plasmas der Blutbank.

Tabelle 10	HMA	HNA1	HNA 2	gesamt	% HMA	% HNA1	% HNA 2
Sigma-Albumin vor Bestrahlung	3960	6080	3345	13384	30%	45%	25%
Sigma-Albumin 10min Bestrahlung	3702	4983	3179	11864	31%	42%	27%
Sigma-Albumin 20min Bestrahlung	3679	4712	2908	11299	33%	42%	26%
Sigma-Albumin 30min Bestrahlung	3630	4932	2633	11196	32%	44%	24%
Sigma-Albumin 40min Bestrahlung	3623	3257	3276	10156	36%	32%	32%
Sigma-Albumin 50min Bestrahlung	3915	3615	2090	9620	41%	38%	22%
Sigma-Albumin 60min Bestrahlung	3491	3465	2790	9746	36%	36%	29%
Sigma-Albumin 70min Bestrahlung	3205	4916	1229	9350	34%	53%	13%
Sigma-Albumin 80min Bestrahlung	3030	2911	2166	8106	37%	36%	27%
Sigma-Albumin 90min Bestrahlung	2443	3104	2202	7749	32%	40%	28%
Sigma-Albumin 100min Bestrahlung	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 10: Albumin-Proben (Sigma-Aldrich) bestrahlt über 120min. Ab Minute 100 Abbruch der Auswertung da keine ausreichende Abgrenzung zwischen Kurven mehr möglich war. Werte alle 10min ermittelt.

Tabelle 11	HMA	HNA1	HNA 2	gesamt	% HMA	% HNA1	% HNA 2
Sigma-Albumin+Asc vor Bestrahlung	2476	5540	3650	11666	21%	47%	31%
Sigma-Albumin+Asc 10min Bestrahlung	4279	7296	3493	15069	28%	48%	23%
Sigma-Albumin+Asc 20min Bestrahlung	3987	6489	2992	13469	30%	48%	22%
Sigma-Albumin+Asc 30min Bestrahlung	3941	6982	2846	13769	29%	51%	21%
Sigma-Albumin+Asc 40min Bestrahlung	3921	5964	3694	13578	29%	44%	27%
Sigma-Albumin+Asc 50min Bestrahlung	3952	6388	3061	13400	29%	48%	23%
Sigma-Albumin +Asc 60min Bestrahlung	4140	6478	3181	13799	30%	47%	23%
Sigma-Albumin +Asc 70min Bestrahlung	4326	6633	3491	14450	30%	46%	24%
Sigma-Albumin+Asc 80min Bestrahlung	3677	6368	3050	13095	28%	49%	23%
Sigma-Albumin+Asc 90min Bestrahlung	3906	6427	3189	13522	29%	48%	24%
Sigma-Albumin+Asc 100min Bestrahlung	3885	6022	3288	13195	29%	46%	25%
Sigma-Albumin+Asc 110min Bestrahlung	4077	6117	3582	13775	30%	44%	26%
Sigma-Albumin+Asc 120min Bestrahlung	3963	6412	3325	13701	29%	47%	24%

Tabelle 11: Albumin-Proben (Sigma-Aldrich) +Ascorbinsäure bestrahlt über 120min. Werte alle 10min ermittelt.

Tabelle 12	HMA	Anteil %
HMA vor Bestrahlung	8486	100%
HMA 10min Bestrahlung	6474	76%
HMA 20min Bestrahlung	6028	71%
HMA 30min Bestrahlung	5177	61%
HMA 40min Bestrahlung	4651	55%
HMA 50min Bestrahlung	4747	56%
HMA 60min Bestrahlung	4616	54%

Tabelle 12: HMA bestrahlt über 60min. Werte alle 10min ermittelt.

Tabelle 13	HMA +Asc	Anteil %
HMA+Asc vor Bestrahlung	3753	100%
HMA+Asc 10min Bestrahlung	3752	100%
HMA+Asc 20min Bestrahlung	3627	97%
HMA+Asc 30min Bestrahlung	4059	108%
HMA+Asc 40min Bestrahlung	3962	106%
HMA+Asc 50min Bestrahlung	3581	95%
HMA+Asc 60min Bestrahlung	3720	99%
HMA+Asc 90min Bestrahlung	3558	95%
HMA+Asc 120min Bestrahlung	3481	93%
HMA+Asc 150min Bestrahlung	3572	95%
HMA+Asc 180min Bestrahlung	3539	94%
HMA+Asc 210min Bestrahlung	3524	94%
HMA+Asc 240min Bestrahlung	3321	89%
HMA+Asc 270min Bestrahlung	2934	78%
HMA+Asc 300min Bestrahlung	3305	88%
HMA+Asc Bestrahlung über Nacht	2483	66%

Tabelle 13: HMA+ Ascorbinsäure bestrahlt über 60min, Werte alle 10min. Bis zu Minute 300 Werte alle 30min ermittelt. Bestrahlung über Nacht Wert am nächsten Morgen ermittelt.

Tabelle 14	HNA1	Anteil %
HNA1 vor Bestrahlung	15240	100%
HNA1 10min Bestrahlung 254nm	11410	75%
HNA1 20min Bestrahlung 254nm	10120	66%
HNA1 30min Bestrahlung 254nm	9629	63%
HNA1 40min Bestrahlung 254nm	8317	55%
HNA1 50min Bestrahlung 254nm	7688	50%
HNA1 60min Bestrahlung 254nm	6749	44%

Tabelle 14: HNA1 bestrahlt über 60min. Werte alle 10min ermittelt.

Tabelle 15	HNA1+AS C	Anteil %
HNA1 +ASC vor Bestrahlung	5533	100%
HNA1+ASC 10min Bestrahlung 254nm	5341	97%
HNA1+ASC 20min Bestrahlung 254nm	4835	87%
HNA1+ASC 30min Bestrahlung 254nm	5537	100%
HNA1+ASC 40min Bestrahlung 254nm	5252	95%
HNA1+ASC 50min Bestrahlung 254nm	4917	89%
HNA1+ASC 60min Bestrahlung 254nm	5404	98%
HNA1+ASC 90min Bestrahlung 254nm	4984	90%
HNA1+ASC 120min Bestrahlung 254nm	4492	81%
HNA1+ASC 150min Bestrahlung 254nm	4535	82%
HNA1+ASC 180min Bestrahlung 254nm	4565	83%
HNA1+ASC 210min Bestrahlung 254nm	4221	76%
HNA1+ASC 240min Bestrahlung 254nm	3971	72%
HNA1+ASC 270min Bestrahlung 254nm	3867	70%
HNA1+ASC 300min Bestrahlung 254nm	3741	68%
HNA1 +ASC Bestrahlung über Nacht	3022	55%

Tabelle 15: HNA1+ Ascorbinsäure bestrahlt über 60min, Werte alle 10min. Bis zu Minute 300 Werte alle 30min ermittelt. Bestrahlung über Nacht Wert am nächsten Morgen ermittelt.

Albumin_1-3Gy			
	HMA	HNA1	HNA2
M	70,03	28,27	1,69
SD	1,52	1,53	0,45
VarK	0,02	0,05	0,26
VarK(%)	2,17	5,43	26,42
Albumin_6-25Gy			
	HMA	HNA1	HNA2
M	72,69	25,30	2,01
SD	0,90	0,92	0,57
VarK	0,01	0,04	0,28
VarK(%)	1,24	3,65	28,28
Albumin_100Gy			
	HMA	HNA1	HNA2
M	63,83	33,98	2,19
SD	4,44	4,60	0,27
VarK	0,07	0,14	0,12
VarK(%)	6,96	13,54	12,48
Albumin_100Gy_1h			
Albumin_	HMA	HNA1	HNA2
M	73,06	25,26	1,68
SD	0,45	0,31	0,18
VarK	0,01	0,01	0,10
VarK(%)	0,61	1,23	10,43
Plasmakont_100Gy			
	HMA	HNA1	HNA2
M	79,72	18,74	1,55
SD	0,78	0,76	0,04
VarK	0,01	0,04	0,03
VarK(%)	0,98	4,05	2,72

Tabelle 16: Variationskoeffizienten der Versuche mit ionisierender Strahlung.

HPLC_Kontrolle			
	HMA	HNA1	HNA2
M	78,48	17,71	3,81
SD	0,42	0,35	0,17
VarK	0,01	0,02	0,04
VarK(%)	0,54	1,99	4,00

Tabelle 17 : Variationskoeffizient der HPLC-Kontrollmessung Variationskoeffizienten der Versuche mit ionisierender Strahlung.