

Diplomarbeit

**Der Redoxzustand des Albumins bei PatientInnen
mit akuter myeloischer Leukämie**

eingereicht von

Armin Hoffmann

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Physiologische Chemie

Unter der Anleitung von

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. rer. nat. Karl Öttl

und

Univ.-Prof. Dr. med. univ. Heinz Sill

Graz, am 02.11.2015

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 02.11.2015

Armin Hoffmann eh.

Danksagung

Für die Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projektes möchte ich mich beim Institut für Physiologische Chemie und der Klinischen Abteilung für Hämatologie bedanken. Insbesondere bei Professor Karl Öttl, bei Professor Heinz Sill und Sybille Hofer, MSc bedanken.

Ebenso bei Doris Payerl, Azra Saric und Martina Brtnik für die wichtigen Anleitungen im Labor. Danke auch an Privatdozent Seth Hallström für die Möglichkeit der MDA Messung und seine Anleitungen.

Weiters möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützungen während des Studiums und dessen Abschluss herzlichst bedanken.

Zum Schluss sind nach alle Freunde zu nennen, die mir auch mit Rat und Tat zur Seite standen.

Inhaltsverzeichnis

Kurzzusammenfassung.....	5
Abstract.....	5
Allgemeine Grundlagen.....	6
Aufbau und Funktionen des Albumins.....	6
Die Aminosäure Cystein.....	6
Grundlagen des oxidativen Stress.....	8
Was ist oxidativer Stress.....	8
Wie entsteht oxidativer Stress.....	9
Oxidative Modifikationen des Cysteins.....	11
Malondialdehyd (MDA).....	12
Welche Folgen hat oxidativer Stress.....	12
Grundlagen zur akuten myeloischen Leukämie.....	14
Was ist akute myeloische Leukämie.....	14
Oxidativer Stress und AML.....	15
Aufbau der Studie.....	17
Thesen und Konzept der Studie.....	17
Ziele.....	18
Material und Methoden.....	18
Probenvorbereitung.....	20
Bestimmung der Albuminoxidation.....	21
Bestimmung von Malondialdehyd.....	22
Statistische Auswertung.....	23
Ergebnisse der Studie.....	24
Ergebnisse.....	24
Diskussion.....	36
Abschließende Interpretation.....	40
Anhang.....	42
Bildanhang.....	42
Rohdaten.....	49

Kurzzusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit oxidativen Veränderungen des Albumins, hier im speziellen des Cysteinrestes der 34. Aminosäure, und dem Vorkommen von Malondialdehyd bei PatientInnen mit akuter myeloischer Leukämie (AML). Es soll geklärt werden, ob Personen mit AML vermehrt Zeichen des oxidativen Stresses im peripheren venösem Blut aufweisen. Hierzu wurde ein prospektives Studiendesign nach dem Konzept einer Kohortenstudie gewählt, um der niedrigen Prävalenz der AML gerecht zu werden.

Um die so gewonnenen Daten besser interpretieren zu können wurden die mit zusätzlichen klinischen Labordaten verknüpft. Somit lassen sich statistische Zusammenhänge besser verstehen und einschätzen.

Es zeigt sich, dass sich ein positiver Zusammenhang zwischen der AML und den hier verwendeten Parametern für den oxidativen Stress signifikant verneint werden kann. Damit wird der durch die Literatur gestützte Hypothese des vermehrten oxidativen Stresses bei PatientInnen mit AML widersprochen.

Abstract

This thesis is about oxidative modifications of Albumin, in particular of the 34. Cystein residue, as well as the concentration of Malondialdehyde in peripheral venous blood in patients with acute myeloid leukemia (AML). We try to answer the question of elevated oxidative stress in these patients. In order to achieve this, we used the method of a cohort study, because the prevalence of AML is low. To interpret the data, we accumulate our data sets with clinical laboratory values.

In the end it shows up, that there is significant evidence to falsify a connection between AML and oxidative stress.

Allgemeine Grundlagen

Aufbau und Funktionen des Albumins

Albumin ist ein Protein, das in unterschiedlichen Körperflüssigkeiten vorkommt und dort diverse Funktionen übernimmt. Es kommt unter anderem im Blut[1], Liquor cerebrospinalis[1], Glaskörper, Harn[1], Fruchtwasser und Aszites vor.

Albumin ist das, in molaren Anteilen betrachtet, häufigste Protein des humanen Blutplasmas und Serums und ebenso das wichtigste Transportprotein.[1] Es hat ein Gewicht von 66 438,41 Dalton (Da)[1][2] und besteht aus 585 bis 609 Aminosäuren[3]. Das Protein ist im Genom auf Chromosom 4 Locus q13.3[4] oder q11 - q13[3] lokalisiert.

Albumin wird im erwachsenen Menschen nur in der Leber produziert und über verschiedenste Wege abgebaut. Für den Abbau sind die Nieren, die Leber, die inneren Organe (vor allem Gastrointestinaltrakt und Milz), sowie Muskelgewebe und Haut verantwortlich. [2]

Albumin übernimmt im Blut vielfältige Funktionen. Unter anderem ist es essentiell für die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Drucks, Bindung und Transport von Metaboliten, Metallionen, Bilirubin, freien Fettsäuren, Phospholipiden, Aminosäuren, Hormonen und Medikamenten. [1] Ebenso hat es eine antioxidative Wirkung. [1]

In der Proteinsequenz von Albumin kommt 35 mal die Aminosäure Cystein (CYS) vor. 34 dieser Cysteinreste sind mittels einer Disulfidbrücke untereinander gepaart. Nur der Cysteinrest der 34. Aminosäure (CYS34) besitzt eine endständige Thiolgruppe (-SH), die durch verschiedenste Verbindungen verändert werden kann.[5]

Die Aminosäure Cystein

Unter den 20 proteinogenen Aminosäuren enthalten nur Methionin und Cystein ein Schwefelatom. Alle anderen Aminosäuren dieser Gruppe bestehen ausschließlich aus den Elementen Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Wasser-

stoff. Die Aminosäure Cystein ist für oxidative Veränderung viel interessanter als Methionin, weil hier das Schwefelatom endständig ist und nicht durch eine -CH₃ Gruppe abgeschirmt wird. Auch hat das Schwefelatom von Methionin die Oxidationszahl 0, wodurch es für Substitutionsreaktionen wesentlich schlechter geeignet ist. (siehe Abbildung 1)

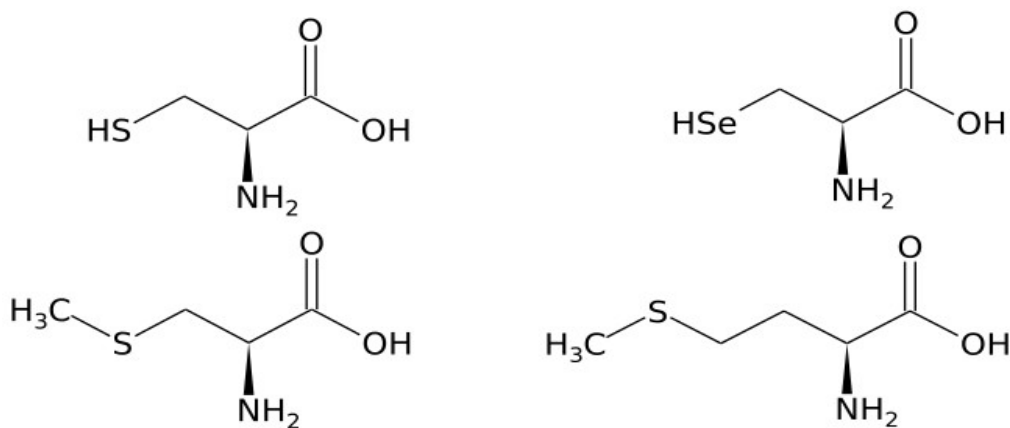


Abbildung 1: oben links: Cystein; oben rechts: Selenocystein; unten links: Homocystein; unten rechts: Methionin

Von der Aminosäure Cystein existieren verschiedene Abkömmlinge. So kommt Seleno-Cystein vor, bei dem der Schwefel durch das Element Selen substituiert wurde. Dies ist möglich, weil Selen in der gleichen Hauptgruppe steht wie Schwefel und somit über die gleiche Anzahl von Valenzelektronen verfügt. Dadurch sind Selen und Schwefel chemisch sehr ähnlich. Ein weiterer Abkömmling von Cystein ist die Aminosäure Homocystein, die frei oder als posttranslationale Modifikation in Proteinen vorkommt.[6] Hierbei handelt es sich um eine oxidative Modifikation, da durch die Substitution des Wasserstoffes der -SH Gruppe mit einer -CH₃ Gruppe die Oxidationszahl des Schwefels von -1 auf 0 zunimmt.[6]

Für Cystein besteht noch eine andere, physiologisch sehr wichtige, Form der oxidativen Modifikation: die Disulfidbrückenbindung. Hierbei kommt es zu einer Kondensation zweier -SH Gruppen zu einer -S-S- Bindung. Diese ist unter anderem aufgrund der neutralen Ladung (Oxidationszahl 0) der beiden Schwefelatome sehr stabil.

Grundlagen des oxidativen Stress

Was ist oxidativer Stress

Oxidativer Stress fasst alle nicht physiologisch regulierten oxidativen Veränderungen an allen Arten von Biomolekülen zusammen.[7] Hier von klar zu unterscheiden sind regulierte oxidative Prozesse wie sie zum Beispiel in der Signaltransduktion[8], ATP-Bereitstellung [9][7] oder in der Immunabwehr[10] vorkommen. Gleichwohl können diese Prozesse auch als Quelle für oxidativen Stress dienen.[7]

Ein wesentliches Merkmal für oxidativen Stress ist ein Ungleichgewicht zwischen der Produktion von ROS und antioxidativ wirkenden Verbindungen oder Enzymen. Hier für gibt es zwei Möglichkeiten: zum einen eine erhöhte ROS-Produktion und zum anderen eine verminderte Produktion beziehungsweise Aufnahme antioxidativ wirkender Verbindungen und Enzyme. [11]

Oxidative Veränderungen sind alle chemischen Reaktionen die eine Redox-Reaktion beinhalten, also eine Elektronenabgabe und eine Elektronenaufnahme. Wichtig ist, dass Sauerstoff nicht der einzig mögliche Reaktionspartner ist, allerdings sehr häufig beteiligt ist. [12]

Es gibt eine Vielzahl von Molekülen die oxidative Modifikationen verursachen oder übermitteln können. Für biochemische Prozesse sind hierbei vor allem die Folgenden zu nennen: Wasserstoffperoxid (H_2O_2), diverse Radikale des Sauerstoffs, wie zum Beispiel das Hydroxylradikal ($HO\cdot$), das Superoxidradikal ($O_2\cdot^-$), das protonierte Superoxidradikal ($HOO\cdot$) und nicht gebundener Sauerstoff (O_2) in wässriger Lösung. [7]

Radikale haben die besondere Eigenschaft, dass sie mindestens ein nicht-paarig gebundenes, also einfaches, Elektron besitzen und somit mit vielen, an sonst stabilen, Verbindungen eine Reaktion eingehen können.[13] Beachtenswert ist, dass ein Endprodukt einer solchen radikalischen Reaktion ebenfalls ein Radikal sein muss, wenn eine ungerade Anzahl an radikalischen Elektronen beteiligt ist. Dies liegt darin begründet, dass das ungepaarte Elektron nur mit ei-

nem anderen ungepaarten Elektron eine Paarung eingehen kann. [13] Auf diese Art und Weise kann die radikalische Eigenschaft einer Verbindung über viele Reaktionen hinweg weitergegeben werden.

Wie entsteht oxidativer Stress

Alle jene chemischen Verbindungen die oxidative Veränderungen im Körper verursachen, können auf sehr unterschiedliche Art und Weise entstehen. Hierbei spielen Prozesse, in denen oxidierende Verbindungen physiologisch und kontrolliert genutzt werden eine wichtige Rolle. So können Superoxidradikale aus dem Cytochrom-P₄₅₀ Stoffwechsel entstehen. [7] Bei diesen Prozess wird ein Sauerstoffmolekül reduziert, indem ihm ein Elektron spontan von einem Chinon-Molekül übertragen wird.[14]

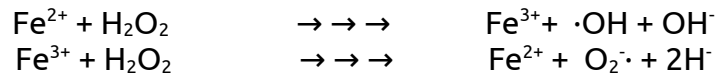
Granulozyten sind in der Lage Wasserstoffperoxid zu bilden, indem zwei Superoxidradikale (O₂[·]) und zwei Protonen in einer disproportionierenden Reaktion umgesetzt werden. Das Enzym Superoxiddismutas (SOD) katalysiert diese Reaktion: [14][15]



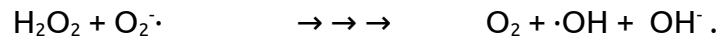
Die Reaktion der SOD kann aber auch dazu genutzt werden, Superoxidradikale in weniger langlebigeres und damit weniger gefährliches Wasserstoffperoxid umzuwandeln. Die SOD kann somit auch als ein Enzym angesehen werden, welches oxidativen Stress vermindert. Auf diese Ambivalenz von Mechanismen des oxidativen Stresses wird in späteren Kapiteln genauer eingegangen.

Wie oben schon erwähnt wird die radikalische Eigenschaft einer Verbindung in einer Reaktion weiter gegeben, wenn eine ungerade Anzahl ungepaarter Elektronen beteiligt ist. Auf diese Art und Weise entstehen ganze Netzwerke aus verschiedensten Reaktionen in denen immer wieder radikalische Verbindungen entstehen und verbraucht werden.

Zwei sehr wichtige Reaktionen die in diesem Rahmen stattfinden sind die Fenton-Reaktion [16] (es werden für die Übersichtlichkeit mehrere Reaktionen summiert)



und die Haber-Weiss-Reaktion [16]



Wie man eindeutig sieht sind beide Reaktionen nicht klar voneinander trennbar, da sie viele Überschneidungen in den Ausgangsstoffen und Endprodukten haben. Ebenfalls sehr wichtig ist, dass die Fenton-Reaktion durch Übergangsmetallionen katalysiert wird. Hierbei ist es nicht entscheidend, ob es sich um Eisenionen handelt. Es ist alleinig wichtig, ob es ein korrespondierendes Ionenpaar mit einer Oxidationsstufe Unterschied gibt, dass die Funktion des Elektronentransporters übernehmen kann. Dies trifft auf eine ganze Reihe von Übergangsmetallionen zu.

Wie oben schon angedeutet spielen Übergangsmetallionen bei Redox-Reaktionen in physiologischer Umgebung eine entscheidende Rolle als Katalysatoren. Allen voran ist natürlich das Ionenpaar $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ zu nennen, da es mengenmäßig im menschlichen Körper sehr häufig ist.

Als zusätzliche Quelle für Sauerstoffradikale, insbesondere Superoxidradikale, ist die NADPH-Oxidase (NOX) zu nennen. [17][18] Diese Familie von Enzymen katalysiert die Reduktion von freiem O_2 zu Superoxid ($\text{O}_2\cdot^-$) unter dem Verbrauch von NADPH als Elektronenquelle. [17] Sie kommen in den verschiedensten Zellen von Säugetieren in unterschiedlichen Zellkompartimenten vor und übernehmen dabei verschiedenste Aufgaben[17]. Dazu gehören Zellen der Immunabwehr, regulatorische Funktionen in der Entwicklung des Innenohrs[19], die Funktion der Schilddrüse[20] und viele andere. [17]

Eine wichtige Quelle für intrazelluläre ROS stellen die Mitochondrien dar. [15] Schätzungsweise wird ein Prozent des in den Mitochondrien umgesetzten Sauerstoffs in ROS (vor allem Superoxid) umgewandelt. [21] Die so entstandenen ROS können sich in ihrer Wirkung und Funktion unterscheiden. Ausschlaggebend hierfür ist vor allem ihr Entstehungsort (Komplex I, II oder III). Vor allem Komplex III-ROS nehmen regulatorischen Einfluss auf die Zelle. [15][22]

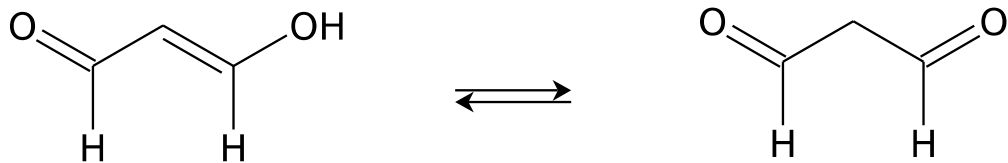


Abbildung 2: Tautomere Grenzstrukturen von MDA

Oxidative Modifikationen des Cysteins

Wie einleitend schon erwähnt, kann die freie Thiolgruppe des Cysteinrestes 34 oxidiert werden. Dies ist durch verschiedene Verbindungen und unterschiedliche Umgebungsbedingungen möglich. (siehe Seite 8 ff). Durch die für diese Arbeit verwendete Methode der High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) können drei verschiedene Gruppen von oxidativen Zuständen des Cysteinrestes unterschieden werden. Auf diese Trennung wird in späteren Kapiteln (siehe Seite 18) genauer eingegangen.

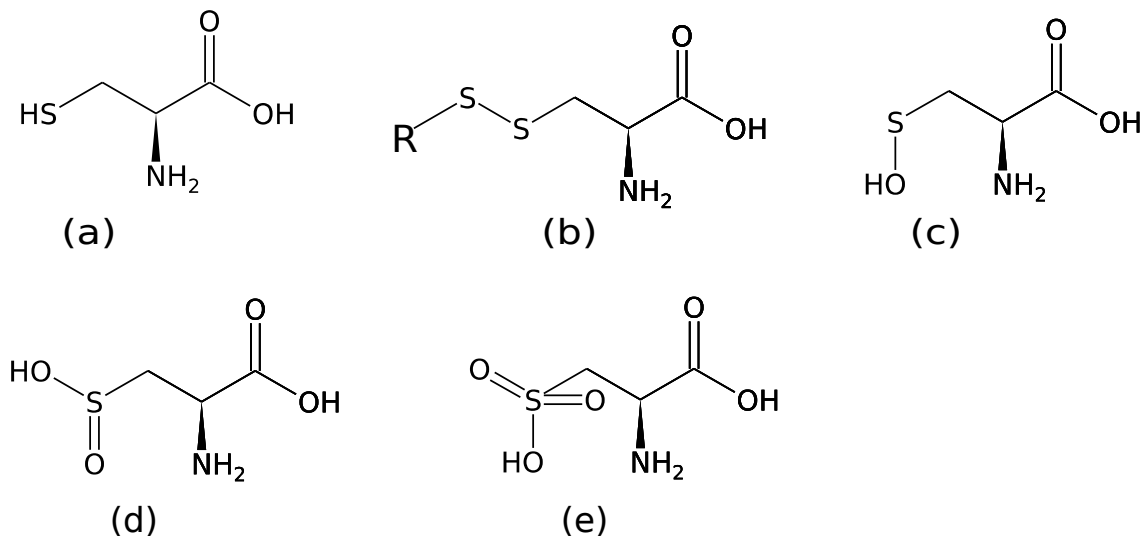


Abbildung 3: Oxidative Modifikationen des Cysteinrestes. (a) Cystein ohne Modifikation, (b) Disulfidbrückenbindung zu einem beliebigen Rest, (c) Sulfensäure, (d) Sulfinsäure, (e) Sulfonsäure

Abbildung 3 zeigt die Strukturen der häufigsten oxidativen Modifikationen des Cysteins. Vor allem die Disulfidbrückenbindung (b) hat physiologisch eine wichtige Bedeutung bei der Ausbildung der Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen.

Oxidative Veränderungen von CYS 34 in humanem Serumalbumin stellen einen Marker für oxidativen Stress dar. Es konnte gezeigt werden, dass dies bei ver-

schiedenen Erkrankungen der Fall ist; als Beispiel ist hier das akute nach chronischem Leberversagen (acute-on-chronic liver failure [ACLF]) zu nennen. [23]

Malondialdehyd (MDA)

Die Verbindung Malondialdehyd (MDA) (Strukturformeln in Abbildung 2) entsteht bei der Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren und stellt somit einen Marker für die Lipidperoxidation dar. [16] Hier bietet MDA den Vorteil, dass durch ein Radikal, in Folge einer Kettenreaktion, mehrere Moleküle MDA entstehen können, wodurch sich die Sensitivität gegenüber ROS erhöht.

Für die Entstehung von MDA gibt es mehrere Ansätze, denen gemein ist, dass die mehrfach ungesättigten Fettsäuren aus der Zellmembran stammen. [11]

Als weiterer Parameter sind Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen (TBARS) zu nennen. Diese sind, wie der Name schon andeutet, unspezifisch und werden deshalb nicht mehr verwendet. Die Messung erfolgt durch eine farbverändernde Reaktion mit Thiobarbitursäure und einer photometrischen Messung bei 530-540 nm. [16] [11] MDA kann als prototypische Verbindung aus der Gruppe der TBARS angesehen werden. Der Referenzbereich wird wie folgt angegeben:

Frauen: 1,05 bis 1,76 $\mu\text{mol/L}$

Männer: 1,10 bis 1,95 $\mu\text{mol/L}$. [16]

Welche Folgen hat oxidativer Stress

Die Interpretation erhöhter intra- und extrazellulärer Konzentrationen verschiedenster oxidativ modifizierter Verbindung ist noch nicht eindeutig geklärt. Für eine bessere Übersicht werden die intrazellulären und extrazellulären ROS-Konzentrationen separat diskutiert.

Erhöhte intrazelluläre Konzentrationen von ROS können onkogen wirken, indem sie DNA-Basen oxidieren [24][25] oder in die Zellregulation eingreifen. Als Beispiel ist der Einfluss von Wasserstoffperoxid auf den PI3K-Weg zu nennen. Dieser wird aktiviert, und damit das Zellüberleben gefördert, indem Wasserstoffperoxid PTEN an Cys 124 oxidiert und somit inaktiviert. [26] An diesem Punkt

zeigen sich nicht nur die sehr unterschiedlichen Wirkungen von ROS, sondern auch, dass eine klare Trennung von oxidativem Stress und erhöhten ROS-Konzentrationen im Rahmen von regulierten Mechanismen nicht immer möglich ist.

Andererseits stehen dieselben, oben genannten Verbindungen in Zusammenhang mit Zelltod. Zum einen über Apoptose, indem sie die mitochondriale Apoptosekaskade aktivieren. [27] Zum anderen durch Blockade des Zellzykluses und weitere indirekte Mechanismen wie zum Beispiel p53 oder AP-1. [28]

Welche dieser gegensätzlichen Wirkungen eintritt, ist von der Konzentration und dem Ort abhängig. [15] Da viele ROS, allen voran das Superoxid-Radikal, aber auch fast alle reaktiven Stickstoffspezies (RNS), eine extrem kurze Halbwertszeit haben, entspricht bei diesen der Bildungsort in etwa auch dem Wirkungsort. Hiervon klar auszunehmen ist Wasserstoffperoxid, das als ROS als sehr stabil und langlebig gelten kann und die Fähigkeit besitzt membrangängig zu sein. [15] Wasserstoffperoxid kann somit in andere Zellkompartimente wandern oder die Zelle auch verlassen. Somit stellt Wasserstoffperoxid eine Quelle für extrazellulären oxidativen Stress dar.

Diese Studie befasst sich mit der Messung von extrazellulären Produkten des oxidativen Stress, weshalb auf diesen im folgenden näher eingegangen werden soll. Extra- und intrazelluläre ROS Konzentrationen können sehr unterschiedlich sein. Dies hängt von der durchschnittlich sehr geringen Diffusionsstrecke einzelner ROS Moleküle ab, weshalb von extrazellulären Konzentrationen nicht generell auf interne geschlossen werden kann.

Oxidative Veränderungen von Albumin können als Marker des Extrazellulären oxidativen Stress angesehen werden, da humanes Serumalbumin nicht intrazellulär vorkommt. HMA und HNA 1 interagieren im Serum mit Thiol-Verbindungen, wobei die jeweiligen Anteile dies nur kurzzeitig widerspiegeln. [29] Dies gilt jedoch nicht für MDA. Wie zuvor beschrieben ist die wichtigste Quelle von MDA die Peroxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren von Zellmembran. Dies lässt keinen sicheren Rückschluss auf eine extrazelluläre oder intrazelluläre Entstehung zu. [16]

Grundlagen zur akuten myeloischen Leukämie

Was ist akute myeloische Leukämie

Unter Akuter Myeloischer Leukämie (AML) versteht man eine maligne neoplastische Erkrankung des roten Knochenmarks ausgehend von einer entarteten myeloischen Stammzelle,[30] deren Tochterzellen durch übermäßige, unkontrollierte Proliferation zu einer Verdrängung des gesunden Knochenmarks führen. [31]

Die Gruppe der Leukämien kann in zwei große Untergruppen eingeteilt werden. Zum einen die lymphatischen Leukämien, die ihren Ursprung in den Vorläuferzellen der B- und T-Lymphozyten nehmen und zum anderen in die myeloischen Leukämien, die aus Vorläuferzellen der myeloischen Zellen (Erythrozyten, Granulozyten, Megakaryozyten und somit Thrombozyten) entstehen.

Für verschiedene Subgruppen der Leukämien sind mehrere oder einzelne genetische Veränderungen bekannt, die gehäuft oder exklusiv auftreten und zum Teil mit unterschiedlichen therapeutischen und prognostischen Konsequenzen verbunden sind. Das klassische Beispiel ist hier das BCR-ABL-Fusionsgen in Form des Philadelphiachromosoms [t(9;22)] bei chronischer myeloischer Leukämie (CML).[30]

Die Diagnose der AML wird nach den French-American-British (FAB) Kriterien und jenen der Weltgesundheitsorganisation (WHO) gestellt und eingeteilt.[32]

Nach der Überarbeitung der WHO-Kriterien von 2008 wird nun zwischen 8 Subtypen unterschieden (nach [32]):

1. Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities
2. Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes
3. Therapy-related myeloid neoplasms
4. Acute myeloid leukemia, not otherwise specified (NOS)
5. Myeloid sarcoma

6. Myeloid proliferation related to Down syndrome
7. Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm
8. Acute leukemias of ambiguous lineage

Vor allem der erste Subtyp wird aufgrund genetischer Veränderungen in weitere Subgruppen unterteilt. Hier sind vor allem Inversionen und Fusionen von Chromosomenabschnitten zu nennen. Gesondert hervorzuheben ist die Mutation von FMS-related tyrosine kinase 3 (FLT3), die in vielen Subtypen vorkommt, aber für keinen von diesen obligat ist. FLT3 Mutationen sind jedoch prognostisch relevant und stellen Treibermutationen für weitere Veränderungen dar. [33]

Im Gegensatz zur WHO-Klassifikation, die vor allem auf zytogenetischen und molekulargenetischen Merkmalen beruht, basiert die FAB-Klassifikation der AML auf morphologischen und zytochemischen Kriterien.[34] Durch deren Verwendung können wiederum 8 Subtypen, M0 bis M7, unterschieden werden:[30]

1. M0 Akute undifferenzierte myeloische Leukämie
2. M1 Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung
3. M2 Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung
4. M3 Akute Promyelozytenleukämie
5. M4 Akute myelomonozytäre Leukämie
6. M5 Akute monozytäre Leukämie
7. M6 Akute erythrozytäre Leukämie
8. M7 Akute megakaryozytäre Leukämie.

Einzelne FAB-Subtypen weisen gehäuft bestimmte genomische Veränderungen auf, die jedoch für die Diagnose nicht entscheidend sind.

Oxidativer Stress und AML

Die bisherige Datenlage zu einem Zusammenhang von oxidativem Stress und AML ist klein. Die Datenlage zu oxidativem Stress bei Patienten mit anderen malignen Erkrankungen ist hingegen sehr umfangreich.

Viele Studien zum Thema oxidativer Stress und AML befassen sich mit intrazellulären oxidativen Modifikationen, deren Häufigkeit und Verteilung in verschiedenen Erkrankungsstadien, sowie deren möglichen regulatorischen Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel. Ein Großteil dieser Studien nähert sich dieser Frage mit einem auf Zellkultur basierendem Ansatz.

Da die Umgebungsbedingungen für Zellen in Zellkultur jenen in vivo im besten Fall sehr ähnlich, jedoch nicht gleich sein können, besteht immer nur eine eingeschränkte Vergleichbarkeit zwischen Experimenten mit Zellen in Zellkultur und in-vivo Studien.

Die Bedeutung erhöhter Konzentrationen primär intrazellulärer ROS, die nicht per se mit oxidativem Stress gleichzusetzen sind, ist nicht eindeutig geklärt. Zum einen scheinen erhöhte intrazelluläre ROS Konzentration auf einen erhöhten Stress der Zelle(n) hinzudeuten. So gibt es einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und einer verminderten genetischen Stabilität.[25][24] Als Folge können oxidativer Stress und die damit verkommenden Veränderungen der DNA als onkogen und förderlich für Mutationen angesehen werden. Zum anderen sind ROS auch ein Zeichen einer vermehrten Aktivität des Immunsystems.[24] In diesem Fall sind erhöhte ROS Konzentrationen antionkogen zu werten. Somit kann ein Eingreifen in oxidativen Stress zu verschiedenen Effekten führen. Es ist bekannt, dass durch Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Arsentrioxid (ATO), die intrazellulären Konzentrationen von ROS ansteigen. [35] [27] Auch kann oxidativer Stress direkt Apoptose induzieren[25]

Es sind vergleichsweise sehr wenige in-vivo Studien zum Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und AML zu finden. Unter diesen ist die Arbeit von Zhou et al. [36] hier gesondert hervorzuheben, weil sich die dort verwendeten Methoden der Laborbestimmungen mit den in dieser Arbeit verwendeten ähnlich sind. Interessant an dieser Arbeit ist, dass sich hier kein ganz einheitliches Bild über die Art und Weise, sowie das Maß an oxidativem Stress bei den untersuchten PatientInnen zeigt.

Aufbau der Studie

Thesen und Konzept der Studie

Die vorliegende Studie befasst sich mit der Fragestellung, ob PatientInnen mit AML vermehrt oxidativem Stress ausgesetzt sind. Als Marker wird primär der Redoxzustand des Albumins verwendet.

Für diese Fragestellung wurde ein prospektives Studiendesign nach dem Konzept der Kohortenstudie gewählt. Dieser Studienaufbau trägt dem Problem der geringen Inzidenz und Prävalenz der AML Rechnung. Auch kann mit diesem Aufbau der oxidative Stress in verschiedenen Phasen der AML verglichen werden. Dazu wurden die PatientInnen gemäß ihrer Diagnose in drei Gruppen eingeteilt. Gruppe eins umfasst alle PatientInnen zum Zeitpunkt ihrer Erstdiagnose, Gruppe zwei umfasst alle PatientInnen bei denen eine Remission erreicht werden konnte. Da die Remissionsraten bei AML sehr hoch sind, ist zu erwarten, dass diese beiden Gruppen eine ungefähr gleiche Größe aufweisen. Die Gruppe drei umfasst alle PatientInnen, die ein Rezidiv erlitten haben. Diese Gruppe ist die kleinste der drei PatientInnengruppen, da bei weitem nicht alle PatientInnen ein Rezidiv erleiden.

Um eine gute statistische Vergleichbarkeit der erhobenen Daten zu erhalten, wurden die Personen der Kontrollgruppe zu denen der Gruppe der Ersterkrankten („Primum“) in Bezug auf die Faktoren Alter und Geschlecht gematcht. Für die Abweichung des Alters wurde eine Differenz von maximal 5 Jahren akzeptiert.

Die Personen der Kontrollgruppe erfüllen die gleichen Einschlusskriterien wie die AML PatientInnen. Diese sind: Infektfreiheit, normal anzunehmende Nieren- sowie Leberfunktion.

Die Personen verteilen sich wie folgt auf die Gruppen:

Gruppe	Anzahl	Altersstruktur
Kontrolle	n = 14	Ø= 57,3 a ; σ=16,2
Erstdiagnose	n = 38	Ø= 59,6 a ; σ=13,94
Remission	n = 27	Ø= 53,5 a ; σ=8,7
Rezidiv	n = 16	Ø=59,7 a ; σ=10,6

Tabelle 1 zeigt die Anzahl der Personen in den jeweiligen Gruppen, sowie deren Alterstruktur mit Mittelwert (Ø; in Jahren) und die Standardabweichung (σ)

Ziele

Es soll gezeigt werden, dass PatientInnen abhängig von der Progredienz der AML eine höheres Maß an oxidativ veränderten Molekülen / oxidativem Stress aufweisen als hämatologisch gesunde, infektfreie, gleich alte Kontrollpersonen.

Unter den vielen bekannten, und im sehr unterschiedlichem Maße etablierten, Parametern gehören auch die für diese Studie ausgewählten: der oxidative Zustand des Cysteinrestes 34 von Albumin und Malondialdehyd.

Material und Methoden

Da oxidativer Stress an vielen verschiedenen Orten im Körper stattfindet, gibt es eine ganze Reihe verschiedener, mehr oder weniger etablierter, Labormarker.[16] In dieser Studie werden folgende Marker verwendet:

1. oxidative Modifikationen des Cysteinrestes 34 des Albumins
2. Malondialdehyd (MDA) als Marker für die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren[16]

Die oxidative Modifikation des Cysteinrestes 34 erlaubt es, humanes Serumalbumin in drei separate Gruppen einzuteilen[37]:

1. humanes Mercapto-Albumin (HMA)
2. humanes non-Mercapto-Albumin 1 (HNA1)
3. humanes non-Mercapto-Albumin 2 (HNA2).

Die drei Gruppen ergeben sich gemäß der Analytik mittels HPLC. Zwischen diesen Gruppen gibt es aufgrund der chemischen Einteilung keine Überschneidungen, da die oxidativen Modifikationen den Albumingruppen eindeutig zugeordnet sind. (siehe Tabelle 2)

Albuminfraktion	Modifikation(en) der Merkaptangruppe
HMA	Thiolgruppe (reduzierter Grundzustand)
HNA 1	Sulfensäure, Disulfidgruppe
HNA 2	Sulfinsäure, Sulfonsäure

Tabelle 2: Zuordnung der Modifikationen der Merkaptangruppe an CYS 34 zu ihren Albuminfraktionen, wie sie in der HPLC ersichtlich sind. Vergleiche dazu Abbildung 3 auf Seite 11.

Die Auftrennung dieser Gruppen erfolgt über eine Gradientenelution der Albuminfraktionen durch unterschiedliche Konzentrationen an Ethanol im Laufmittel und dem entsprechend über die Zeit. Als Ausgabe der HPLC entsteht ein Graph, der die Signalintensität im Zeitverlauf zeigt, wobei die Höhe der Maxima die Konzentration in der jeweiligen Probe widerspiegelt.[37]

Die statistische Auswertung der Daten erfolgt als Prozentangabe, deren Bezugswert die Summe der Konzentrationen von HMA, HNA1 und HNA2 in der Probe ist.

Um weitere und bessere Aussagen treffen zu können, wurden Laborwerte der Routinediagnostik in die statistische Auswertung miteinbezogen. Hierfür wurden die Parameter Creatinin, C-reaktives Protein (CRP), Asparagin-Aminotransferase (AST), Alanin-Aminotransferase (ALT), Leukozytenzahl und der Blastenanteil im peripheren venösem Blut ausgewählt. Die Referenzbereiche und Einheiten sind in Tabelle 3 ersichtlich.

Parameter	Einheit	Referenzbereich
Creatinin	mg/dL	bis 1,2
CRP	mg/L	bis 5
AST bei 37 °C	U/L	♀ bis 35; ♂ bis 50
ALT bei 37 °C	U/L	♀ bis 35; ♂ bis 50
Leukozytenzahl	Giga/L	3,5 bis 10

Tabelle 3: Es werden die in dieser Studie verwendeten Routinelaborwerte, sowie deren Einheit und der Referenzbereich dargestellt.[38]

Probenvorbereitung

Alle Proben stammen von PatientInnen der Klinischen Abteilung für Hämatologie am Landeskrankenhaus Universitätsklinikum Graz. Im Rahmen einer Routineblutabnahme wurde den informierten und aufgeklärten PatientInnen eine zusätzliche Blutprobe abgenommen. Die Zustimmung und Aufklärung erfolgte nach den Kriterien der Deklaration von Helsinki und der Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz (Nummer 24-139 ex 11/12).

Die Auswahl der PatientInnen erfolgte anhand der Diagnose der AML. Diese wurde durch die Klinische Abteilung für Hämatologie anhand der zuvor beschriebenen allgemeinen Klassifikationskriterien gestellt. Ausschlusskriterien stellen andere maligne Neoplasien, Infektionen, Insuffizienzen von Niere oder Leber, sowie kurz-postoperative Zustände dar.

Zur Abnahme wurde das Einmalblutentnahmesystem Vacuette® der Firma Greiner bio-one (Bad Haller Straße 32, Kremsmünster, Österreich) verwendet. Um eine Gerinnung der Blutprobe zu verhindern wurde ein Zusatz von Ethylen-diamintetraacetat (EDTA) verwendet (Vacuette®, K3EDTA, Greiner bio-one). Es wurden jeweils circa 9 mL Vollblut abgenommen.

Nach der Abnahme wurde die Probe gekühlt (4 bis 7 °C) und innerhalb von 2 Stunden bei 2500 Umdrehungen pro Minute (1430 RCF) über 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und in 4 Teilen zu je 500 µL geteilt. Die Proben wurden danach bei -70°C gelagert und nur zur Weiterverarbeitung auf Raumtemperatur erwärmt und durch eine Schüttelplatte durchmischt.

Die maximale Lagerungszeit der Proben bis zur Messung betrug ein Jahr. Für diesen Zeitraum ist bei Lagerungsbedingungen von -70°C experimentell bestätigt, dass sich die Eigenschaften der Proben in Bezug auf die hier untersuchten Eigenschaften nicht wesentlich verändern.

Bestimmung der Albuminoxidation

Die Bestimmung der Albuminoxidation erfolgt mittels HPLC nach einem Protokoll von Era et al.[37]. Die Probenvorbereitung verlief wie folgt. Zuerst wird die gefroren gelagerte Probe auf Raumtemperatur erwärmt und durchmischt. Anschließend werden 10 µL des Serums mit 990 µL Probenpuffer (3,4498 g NaH₂PO₄, 4,3825 g NaCl auf 250 ml Wasser; pH=6,87 mit NaOH eingestellt) verdünnt. Die Lösung wird durch einen Filter mit einer durchschnittlichen Maschenweite von 0,45 µm filtriert.

Die so verdünnt Probe wird mittels HPLC aufgetrennt (Autosampler: Shimadzu SIL-20 AC HT; Pumpe: Elite LaChrome; Säulenofen: Shimadzu CTO-10 AC UP; Detektor: Hitachi F1050 Fluorescence Spectrometer). Es wird eine Ionenaustauschersäule (Asahipak ES-502n 7C) ein einer Temperatur von 35 ± 0,02°C benutzt.

Als Laufmittel wird ein Puffer auf Basis von destilliertem, entgastem und filtriertem Wasser mit 0,05 M Natrium-Acetat und 0,4 M Natriumsulfat bei einem pH-Wert von 4,8 bei einer Flussrate von 1,0 ml/min verwendet. Um die Eluation zu steuern wird ein Gradient (0 bis 10 %) von Ethanol nach folgendem Schema benutzt [37]:

0 bis 5 Min	0%
5 bis 9 Min	0 bis 1 %; linear steigend
9 bis 13 Min	1 bis 3 %, linear steigend
13 bis 17 Min	3 bis 10 %; linear steigend.

Die Detektion erfolgt mit einem Fotodetektor nach dem Prinzip der Fluoreszenzchromatographie mit einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 340 nm. Zur Auswertung und Steuerung dient die Software Ezchome Elite von Shimadzu.

Bestimmung von Malondialdehyd

Die Bestimmung der MDA-Konzentration im EDTA-Plasma erfolgt nach einem Prinzip von Pilz et al. [39]. Dabei wird ein Derivat mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) gebildet und mittels HPLC getrennt.

Für die Hydrolyse von an Proteine gebundenes MDA werden 0,125 mL EDTA-Plasma mit 25 µL Natriumhydroxidlösung (6 mol/L) für 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. Anschließend werden die Proteine mit 62,5 µL 35 %iger (V/V) Perchlorsäure gefällt und für 2 Minuten bei 14000 g abzentrifugiert. 125 µL des Überstandes werden mit 12,5 µL DNPH-Lösung für 10 Minuten inkubiert.

Die so aufbereiteten Proben, eine Standardreihe (Konzentrationen von 0,625 bis 10 nmol/L) und Leerwerte, werden nun der HPLC zugeführt (Injektionsvolumen jeweils 40 µL).

Für den MDA Standard werden zuerst 25 µL 1,1,3,3-Tetramethoxypropan (TMP) mit 100 µL doppelt destillierten Wasser zu einer Ausgangslösung von 1 mmol/L verdünnt. Eine weitere Hydrolyse findet bei Raumtemperatur über 2 Stunden unter Zugabe von 10 mL 1%iger Schwefelsäure zu 200 µL TMP Ausgangslösung statt.[40] Der MDA Ausgangsstandard hat nun eine Konzentration von 20 nmol/L und wird mit 1 %iger Schwefelsäure weiter verdünnt.

Die DNPH-Derivate werden auf einer 5 µm ODS hypersil Säule (150x4,6 mm) getrennt, als Vorsäule dient eine 5 µm ODS hypersil Säule (10x4,6 mm). Das Laufmittel besteht aus 0,2 %iger (V/V) Essigsäure in doppelt destilliertem Wasser mit 50 % Acetonitril (V/V). Die HPLC-Trennung wird durchgeführt mit einem L-2200 Autosampler, einer L-2130 HTA Pumpe und einem L-2450 Dioden Array Detektor (alle: VWR Hitachi Vienna, Österreich). Die Detektorsignale (bei einer Absorption von 310 nm) wurden mit der Software EZchrom Elite (VWR) aufgenommen und ausgewertet.

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten, sowie deren graphische Darstellung, erfolgte mit dem Programm R in Version 3.0.2 für das Betriebssystem Ubuntu 14.04.1 LTS.

Die graphische Darstellung der Daten erfolgt als Boxplots, wobei die Linie in der Box den Mittelwert wiedergibt, die graue Box jeweils die erste Standardabweichung und die Ausläufer alle Werte einschließen. Extrem abweichende Werte werden als einzelne Datenpunkte gezeigt. Als dazugehöriger Test für das Signifikanzniveau wurde ein Welch-t-Test gewählt. Dieser ist geeignet für unabhängige Stichproben mit ungleicher Varianz und gibt den hier vorliegenden Fall somit wieder. P-Werte von unter 0,05 werden als signifikant und unter 0,01 als hoch signifikant angesehen.

Des Weiteren werden Daten als Histogramm gezeigt, um die Verteilung überblicken zu können. Der Shapiro-Wilk-Test wurde als Test auf Normalverteilung verwendet, weil er auch bei kleineren n valide Daten liefert. Ein W -Wert von 0 verneint sicher eine Normalverteilung, wobei ein W von 1 einer vollständigen Normalverteilung entspricht.

Zur Korrelationsanalyse wurde ein Pearson-Korrelationstest verwendet. Der somit erhaltene Pearson-Korrelationskoeffizient gibt die Bindung der beiden Parameter aneinander wieder. Bei einem Wert von 1 kann von einer positiven Korrelation, bei -1 von einer negativen Korrelation ausgegangen werden. Ein Koeffizient von 0 verneint eine Beziehung der Werte zueinander. Als graphische Darstellung wurde eine zwei-Achsen Abbildung gewählt.

Ergebnisse der Studie

Ergebnisse

Im Folgenden sollen nun die Ergebnisse der oben angeführten Messungen gezeigt werden, ebenso wie deren statische Auswertung. Dabei soll die Grundlage für die darauf folgende Interpretation und Diskussion der Ergebnisse geschaffen werden, um die Frage zu beantworten, ob Personen mit AML, abhängig von ihrem Erkrankungsstadium, vermehrten oxidativen Stress aufweisen.

Dazu wurden die Proben der PatientInnen den Gruppen „Primum“, „Remission“ oder „Rezidiv“, entsprechend ihres Verlaufes, zugeteilt.

Die Abbildungen 4, 5, 6 und 7 zeigen die für diese Studie erhobenen Daten zu den Werten HMA, HNA 1, HNA 2, sowie MDA als Boxplots. Die Rohdaten sind im Anhang ersichtlich.

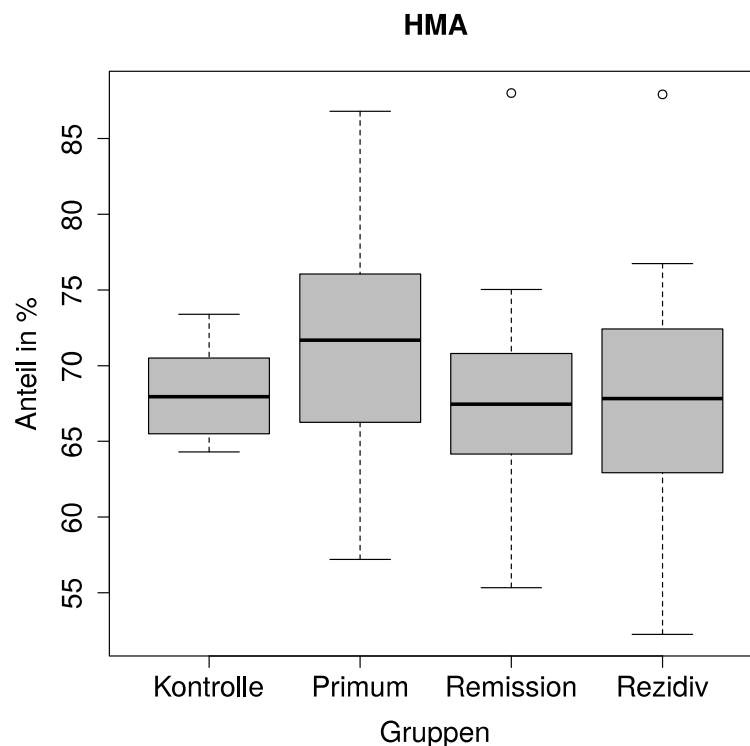


Abbildung 4: Boxplot der HMA-Anteile in den 4 Studiengruppen. Es zeigen sich nur geringe Unterschiede in den Mittelwerten zwischen der Kontrollgruppe und den Gruppen Remission und Rezidiv. Der Unterschied zwischen Kontrolle und Primum ist signifikant mit einem p-Wert von 0,027. Auffällig ist der deutliche Unterschied in den Standardabweichungen.

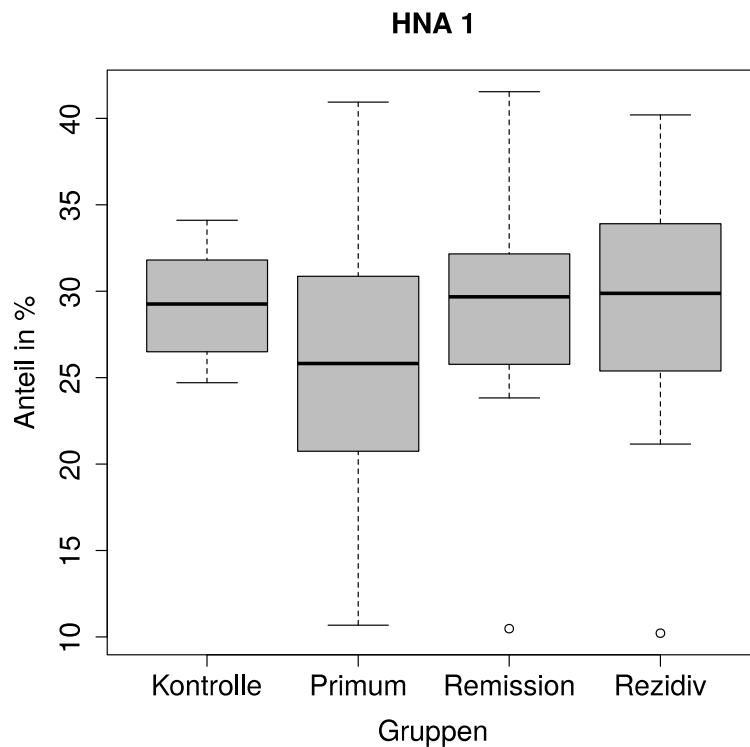


Abbildung 5: Boxplot der HNA 1-Anteile über die 4 Studiengruppen. Die stark erhöhte Standardabweichung in der Primärgruppe sticht hervor, ebenso der Unterschied in den Mittelwerten der Primärgruppe auf der einen und den drei anderen Gruppen auf der anderen Seite. Der p -Wert ist signifikant mit 0,013.

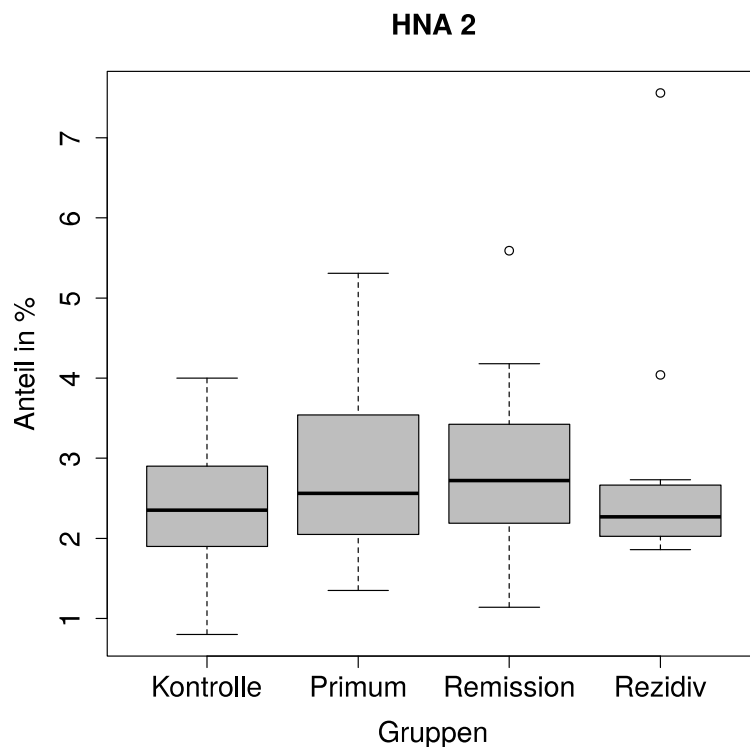


Abbildung 6: Boxplot der HNA 2-Anteile über die 4 Studiengruppen. Die Mittelwerte, wie auch die Standardabweichungen, liegen sehr eng bei einander.

Abbildung 4 stellt die Konzentrationen von HMA in den vier Gruppen (Kontrolle, Primum, Remission und Rezidiv) dar. Es ist nur ein geringer Unterschied in den Durchschnittswerten der drei Gruppen Kontrolle, Remission und Rezidiv, aber ein starker Unterschied in den Standardabweichungen zu erkennen. Es ist vor allem hervorzuheben, dass die Primärgruppe einen Anteil an HMA hat, der über den aller anderen Gruppen hinausgeht. Dieser Unterschied ist signifikant mit einem p-Wert von 0,027. In Bezug hierauf ist ein Vergleich mit Abbildung 5 interessant. Es zeigt sich, ebenso wie in Abbildung 4, nur ein geringer Unterschied in den Mittelwerten, dafür aber ein ausgeprägter Unterschied in den Standardabweichungen. Reziprok zu Abbildung 4 ist der Mittelwert des HNA 1 Anteils (Abbildung 5) in der Primärgruppe vermindert. Auch dieser Unterschied ist signifikant mit einem p-Wert von 0,013. Die Gruppen Remission, Rezidiv und Kontrolle unterscheiden sich nur gering von einander.

Abbildung 6 stellt die HNA 2 Anteile in den vier Gruppen dar. Dabei zeigt sich, dass sich die Mittelwerte der einzelnen Gruppen und die Standardabweichungen nur gering unterscheiden. Keiner der Unterschiede ist signifikant.

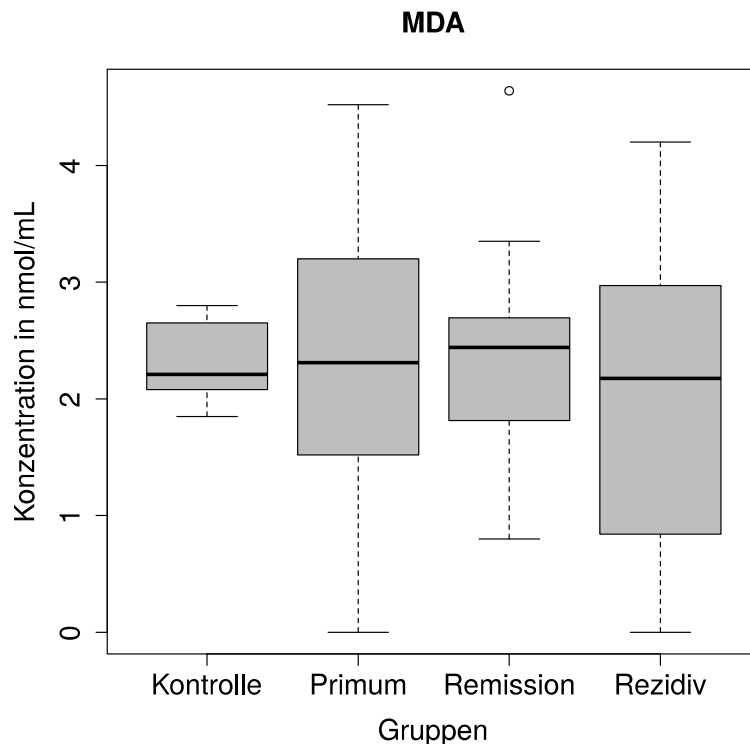


Abbildung 7: Boxplot der MDA-Konzentrationen über die vier Studiengruppen; auffällig sind wieder die starken Unterschiede in den Standardabweichungen.

Abbildung 7 enthält die Boxplots zu den MDA Konzentrationen in den vier Gruppen. Auch hier gilt wieder, dass die Standardabweichung der Kontrollgruppe mit deutlichem Abstand am kleinsten, und die der Primärgruppe am größten ist. Auf diesen Umstand wird im Verlauf noch genauer eingegangen (siehe dazu Abbildung 8).

Im Vergleich der vier hier angeführten Boxplots zeigt sich, dass sich die Gruppen Remission und Rezidiv in Bezug auf alle vier Werte nur gering unterscheiden. Im Gegensatz steht die Gruppe der primär Erkrankten, die bei allen Werten die höchste Streuung zeigt und sich auch im Mittelwert am meisten abhebt. Die Kontrollgruppe zeigt interessanterweise immer die geringste Streuung und die gleichmäßigste Verteilung (außer bei MDA). Der W-Wert für den Test auf Normalverteilung beträgt 0,93 (Übersicht in Tabelle 4). Somit kann auch für diese Datengruppe von einer Normalverteilung ausgegangen werden.

Gesondert zu erwähnen ist Abbildung 8. Diese stellt das Histogramm der MDA-Konzentrationen in der Gruppe der primär Erkrankten dar. Dieses Diagramm wird präsentiert, weil alle anderen Datengruppen (HMA, HNA1 und HNA 2,

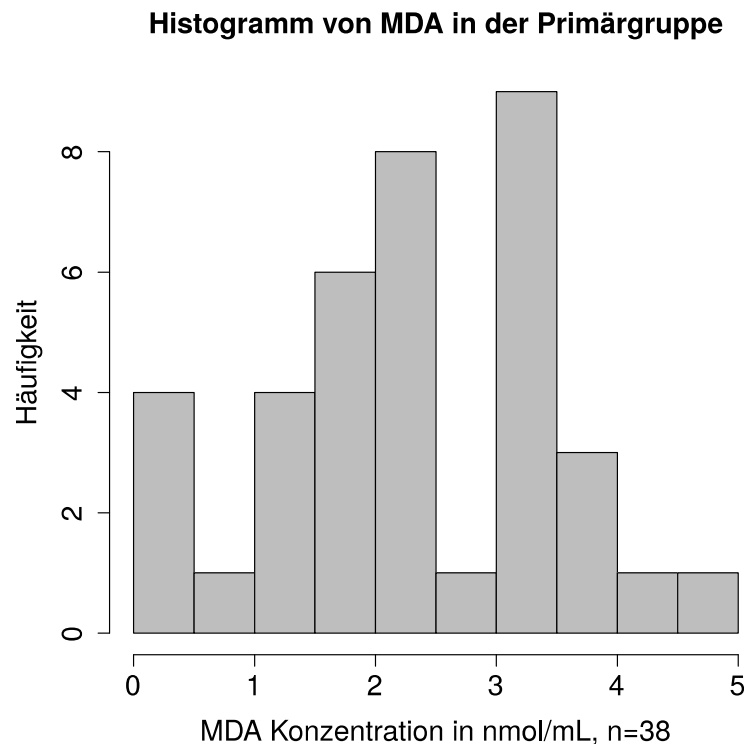


Abbildung 8: Histogramm von MDA in der Primärgruppe; es zeigt sich eine Doppelgipfligkeit mit einem Minimum zwischen den beiden Gruppen von 2,5 bis 3 nmol/mL.

MDA in den drei Verlaufsgruppen, sowie in der Kontrollgruppe) sich im Histogramm im Sinne einer Normalverteilung darstellen. Tabelle 4 bietet eine Übersicht über die Verteilungswahrscheinlichkeiten, auf die später noch genauer eingegangen wird. Auch ist diese Ansicht interessant, weil der Wertebereich in der Primärgruppe bei MDA besonders groß ist.

Es zeigt sich vor allem graphisch, dass die Daten keiner Normalverteilung entsprechen, sondern eine Doppelgipfligkeit aufweisen. Im weiteren werden nun die beiden Primärsubgruppen (PSG) 1 (MDA unter 3 nmol/mL) und 2 (MDA über 3 nmol/mL) unterschieden. Die Daten verteilen sich wie folgt:

Gesamte Primärgruppe:	n=38
Primärsubgruppe 1:	n=24
Primärsubgruppe 2:	n=14

Der W-Wert für diesen Datensatz des Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung beträgt 0,96, der p-Wert 0,2 (vergleiche dazu Tabelle 4). Trotz dieses Ergebnisses kann von einer Abweichung von einer Normalverteilung ausgegangen werden, weil zum einen der p-Wert mit 0,2 eher gering ist, und zum anderen die sehr knappe Überlagerung zweier Subgruppen bei einem n von 38 durch den Shapiro-Wilk-Test nicht endgültig wiedergegeben werden kann. Die graphische Darstellung als Histogramm unterstreicht diesen Eindruck. Das Minimum zwischen diesen beiden Subgruppen liegt im Bereich von 2,5 bis 3,5 nmol/mL MDA.

Die Abbildungen 9, 10 und Fehler: Referenz nicht gefunden stellen die Anteile an HMA, HNA 1 und HNA 2 in der Kontrollgruppe, der gesamten Primärgruppe, sowie in den beiden Primärsubgruppen (PSG) 1 und 2 dar. Abbildung 9 zeigt die HMA Anteile. Hierbei ist auffällig, dass sich die Primärsubgruppe 1 kaum von der gesamten Primärgruppe zu unterscheiden scheint, jedoch deutlich Unterschiede zu der Kontrollgruppe, sowie zur Primärsubgruppe 2 darstellen. Der Unterschied zwischen der Primärsubgruppe 1 und der Kontrollgruppe ist signifikant mit einem p-Wert von 0,0446.

Abbildung 10 stellt die Anteile von HNA 1 dar und zeigt das gleiche Muster, wie der Vergleich über die gesamten Gruppen: HNA 1 ist erniedrigt, wenn HMA er-

hört ist. Der Pearson-Korrelationskoeffizient von -0,99 zwischen den HMA Anteilen und den HNA 1 Anteilen in der gesamten Primärgruppe bestätigt dies. Auch hier unterscheidet sich die Primärsubgruppe 1 wieder signifikant mit einem p-Wert von 0,029 von der Kontrollgruppe. Der Unterschied zur Primärsubgruppe 2 ist wiederum nicht signifikant.

Abbildung 11 zeigt die HNA 2 Verteilung in den Primärsubgruppen. Wie in der gesamten Gruppe auch, sind die Unterschiede in den HNA 2 Anteilen nicht signifikant. Die Mittelwerte der Gruppen sind alle recht ähnlich, einzig der Anteil in der Primärsubgruppe 2 ist erhöht. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant mit einem p-Wert von 0,072. Dieser eher knappe Wert ist vermutlich der durch die Aufspaltung entstandenen zu kleinen Fallzahl geschuldet (n=14).

Wie Tabelle 4 zeigt, kann für die Signifikanzanalysen ein t-Test verwendet werden, da die jeweiligen Datensätze, mit Ausnahme von den HNA 2 Anteilen in der Rezidivgruppe, normalverteilt sind.

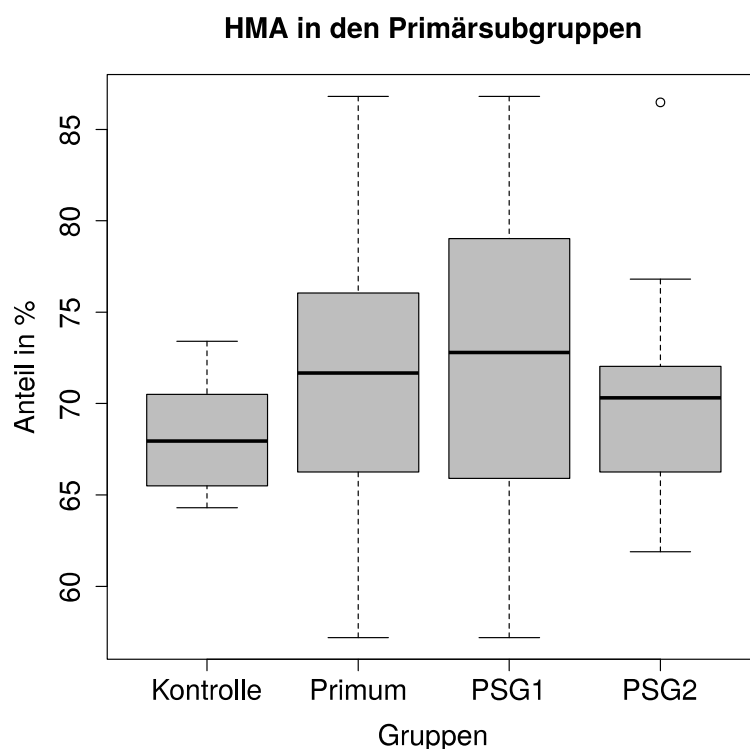


Abbildung 9: Boxplot der HMA Anteile in den Primärsubgruppen, sowie in der gesamten Primärgruppe und in der Kontrollgruppe. Der Unterschied zwischen PSG 1 und der Kontrolle ist signifikant mit einem p-Wert von 0,0446. Der Unterschied zwischen PSG 2 und Kontrollgruppe ist nicht signifikant (p-Wert: 0,24).
PSG=Primärsubgruppe

HNA 1 in den Primärsubgruppen

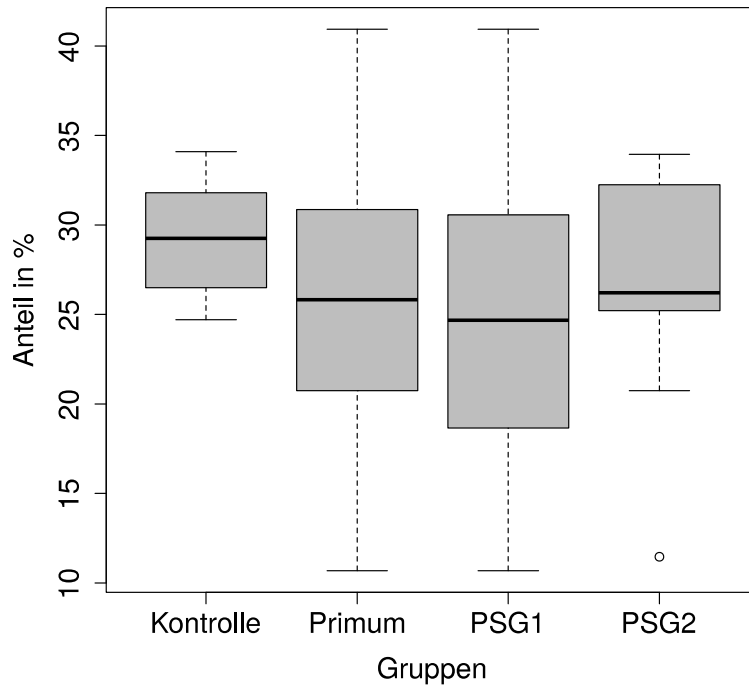


Abbildung 10: Boxplot der HNA 1 Anteile in den Primärsubgruppen, sowie in der gesamten Primärgruppe und in der Kontrollgruppe. Der Unterschied zwischen PSG 1 und der Kontrolle ist signifikant mit einem p -Wert von 0,029. Der Unterschied zwischen PSG 2 und Kontrollgruppe ist nicht signifikant (p -Wert: 0,127). PSG=Primärsubgruppe

HNA 2 in den Primärsubgruppen

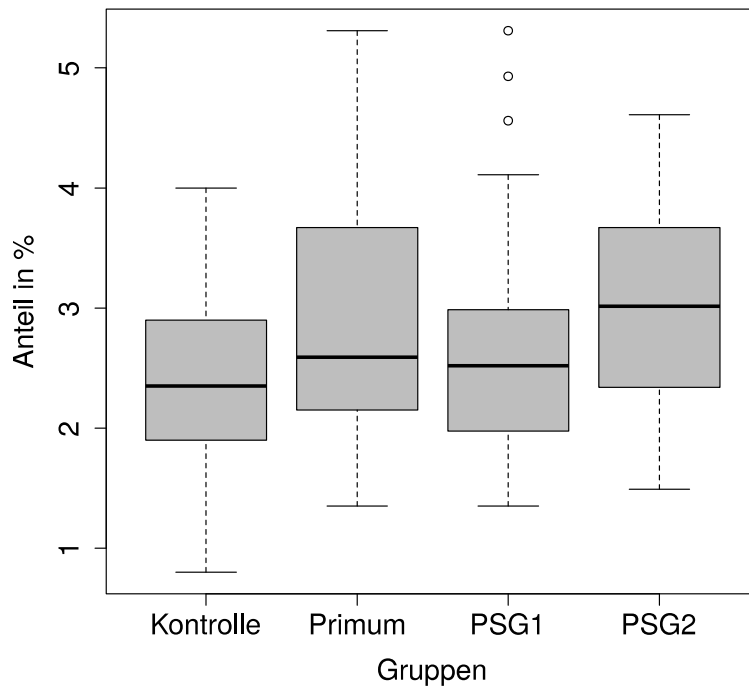


Abbildung 11: Boxplot der HNA 2 Anteile in den Primärsubgruppen, sowie in der gesamten Primärgruppe und in der Kontrollgruppe. PSG=Primärsubgruppe

Diese wurde mit einem Shapiro-Wilk-Test überprüft, da er sich auch für kleine n eignet. Ein W-Wert von 1 entspricht einer Normalverteilung, ein W-Wert von 0 verneint diese sicher. Der grau hinterlegte Wert („Rezidiv“/„HNA 2“) zeigt als einziger eine deutliche Abweichung von einer Normalverteilung an. Das Histogramm hierzu findet sich im Bildanhang unter der Nummer 27 auf Seite 48.

	HMA	HNA 1	HNA 2	MDA
Kontrolle	0,96	0,95	0,98	0,93
Primum	0,98	0,98	0,93	0,96
Remission	0,92	0,91	0,97	0,95
Rezidiv	0,97	0,94	0,55	0,94

Tabelle 4: Es werden die W-Werte nach dem Shapiro-Wilk-Test wieder gegeben. Bei einem Wert von 1 sind die zu Grunde liegenden Daten komplett normalverteilt, bei 0 gibt es hingegen keinen Anhalt für eine Normalverteilung.

Zu den oben gerade beschriebenen experimentell ermittelten Daten der Albuminoxidation und der MDA Konzentration, gibt es noch klinische Routinedaten, die vom gleichen Abnahmezeitpunkt wie die anderen stammen. Hierbei wurden die Routinewerte CRP, Creatinin, ALT, AST, Leukozyten und Blastenanteil herangezogen. Damit soll unter anderem geklärt werden, ob die jeweiligen PatientInnen an einer Infektion erkrankt sind, oder eine Insuffizienz, beziehungsweise Schädigung von Nieren oder Leber zeigen. Die Abbildungen 12, 13, 14 und 15 stellen diese Werte jeweils für die einzelnen Gruppen als Boxplots dar.

Die Abbildung 12 stellt die CRP Konzentrationen in den drei Gruppen „Primum“, „Remissions“ und „Rezidiv“ dar. Ersichtlich ist dabei, dass die PatientInnen der Primärgruppe signifikant mehr CRP aufweisen als die der Remissionsgruppe (p-Wert: 0,0016 nach dem Welch T-Test), aber ähnlich viel wie jene der Rezidivgruppe (p-Wert: 0,34).

Abbildung 13 zeigt ein dazu korrespondierendes Bild. Auch hier zeigt die Primärgruppe signifikant mehr Leukozyten (p-Wert: 0,00067), allerdings spielt hier die AML selber mit einer gesteigerten Leukozytenzahl und einem Vorkommen vom Blasten im peripheren Blut eine deutliche Rolle. Primärgruppe und Rezidivgruppe unterscheiden sich hinsichtlich der Leukozytenkonzentrationen nicht signifikant bei einem p-Wert von 0,42.

CRP in den Gruppen

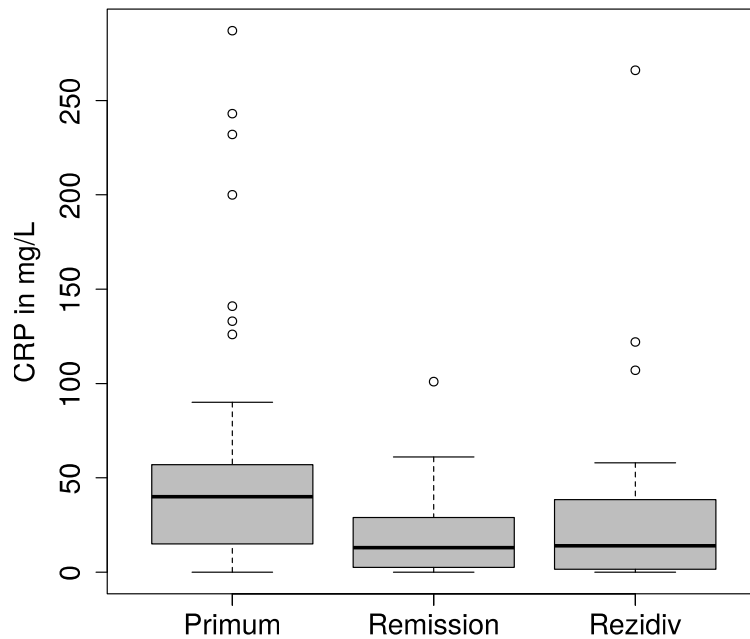


Abbildung 12: Boxplot der CRP Konzentration (in mg/L im Vollblut) in den drei PatientInnengruppen. Die Gruppe Primum zeigt signifikant eine höhere CRP-Konzentraion gegenüber der Remissionsgruppe mit einem p-Wert von 0,0016.

Leukozyten in den Gruppen

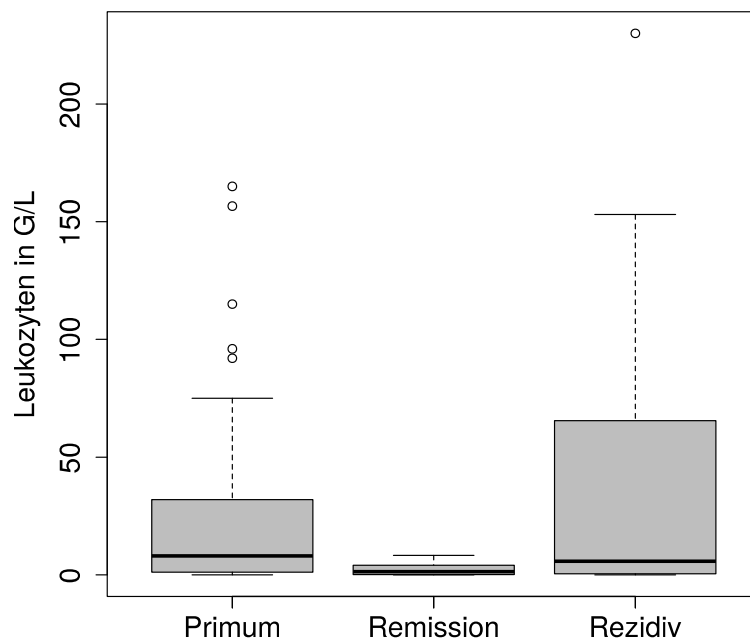


Abbildung 13 zeigt die Konzentration von Leukozyten in Giga/L in den drei PatientInnengruppen. Die Konzentration an Leukozyten ist in der Remissionsgruppe am geringsten. Dies liegt an der nicht mehr nachweisbaren AML, die für die Remission erreicht werden muss.

AST in den Gruppen

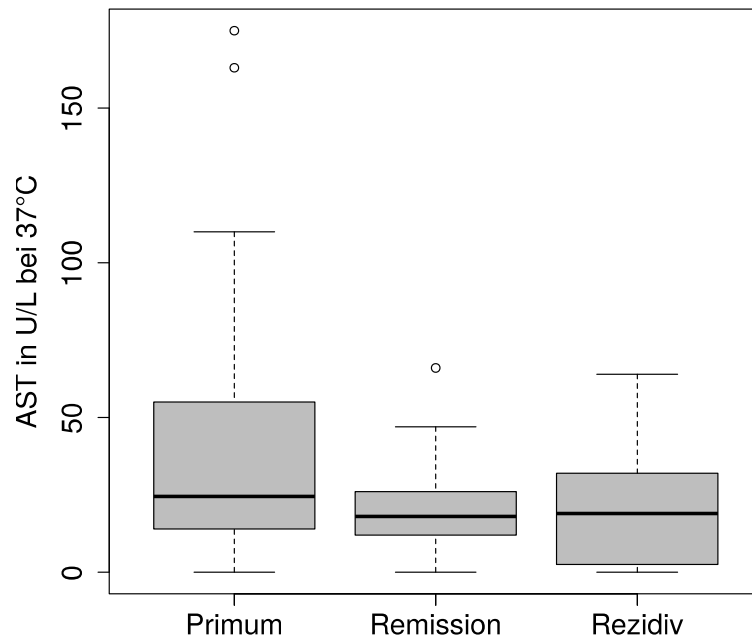


Abbildung 14: Boxplot der AST Konzentrationen in den drei PatientInnengruppen. Die Gruppen unterscheiden sich kaum, es gibt jedoch eine starke Korrelation mit den ALT Konzentrationen. Siehe dazu Tabelle 5.

ALT in den Gruppen

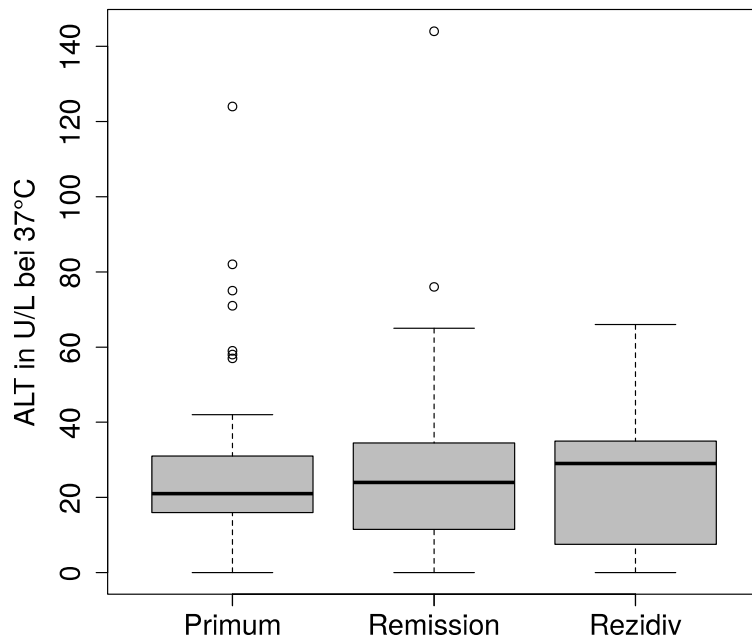


Abbildung 15: Boxplot der ALT Konzentrationen in den drei PatientInnengruppen. Die Gruppen unterscheiden sich nicht; die Werte korrelieren jedoch stark mit den AST Konzentrationen. Siehe dazu Tabelle 5.

Die Abbildungen 14 und 15 zeigen die Boxplots von ALT, beziehungsweise von AST in den drei PatientInnengruppen. Die Abbildungen werden zusammen genannt, weil sie zum einen zwei Werte darstellen die funktionell viel gemeinsam haben, und zum anderen auch statistisch eng zusammenhängen. Dies zeigen vor allem die Korrelationskoeffizienten von ALT und AST für die drei PatientInnengruppen von 0,79 („Primum“), 0,85 („Remission“) und 0,83 („Rezidiv“).

An dieser Stelle kann auch auf Tabelle 5 verwiesen werden, die diese und weitere Korrelationskoeffizienten mit entsprechenden p-Werten (in Klammern) darstellt, sowie auf den Bildanhang (ab Seite 42) und hierfür im Speziellen auf die Abbildungen 21, 22 und 23 für den Zusammenhang von ALT und AST.

Tabelle 5 zeigt Pearson-Korrelationskoeffizienten für ausgewählte Paare. Neben der schon erwähnten Kombination aus AST und ALT gibt es eine ganze Reihe weiterer interessanter Korrelationspartner. Zum einen ist hier CRP und HNA 2 in der Remissionsgruppe zu nennen, die mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,56 verbunden sind und auch im dazugehörigen Plot einen Zusammenhang zeigen (siehe dazu Abbildung 16 des Bildanhangs); dieser Eindruck wird von einem p-Wert von 0,002 unterstützt.

Auch ist interessant, dass CRP und MDA in den Gruppen „Primum“ und „Rezidiv“ Zusammenhänge zeigen. Die Korrelationskoeffizienten betragen hier -0,22 und 0,28. Die Plots (siehe Bildanhang Nummer 17 und 18) zeigen jedoch keinen Zusammenhang; die jeweiligen p-Werte sind auch größer 0,1. Ein kausaler Zusammenhang würde auch den entgegengesetzten Koeffizienten widersprechen und ist demzufolge abzulehnen.

Die Korrelation von Leukozytenzahl und Blastenanteil ist zu erwarten und zeigt sich in den Gruppen „Primum“ (0,37) und „Rezidiv“ (0,8), nicht jedoch in der Remissionsgruppe, weil diese PatientInnen keine Blasten mehr aufweisen.

Auch sind die beiden Paare aus Blasten und HMA, beziehungsweise HNA 1 in der Primärgruppe zu beachten (die Plots hierzu finden sich im Bildanhang unter den Nummern 19 und 20). Diese beiden Werte weisen in die gleiche inhaltliche Richtung, weil sie durch eine negative Korrelation (-0,99) miteinander verbunden sind und die Korrelationen entgegengesetzt sind. Ein echter Zusammen-

hang kann jedoch abgelehnt werden, weil zum einen die Koeffizienten recht niedrig ausfallen und zum anderen die p-Werte mit 0,19 und 0,21 zu groß sind. Auch zeigen die Plots grafisch keinen Zusammenhang.

Korrelationspartner		Primum	Remission	Rezidiv
CRP	Blasten	0,09	-0,03	0,14
	HMA	-0,13	-0,12	0,02
	HNA 1	0,09	0,03	-0,007
	HNA 2	0,3	0,56 (0,002)	-0,09
	MDA	-0,22 (0,18)	0,1	0,28 (0,28)
	Leukozyten	0,06	-0,15	0,22
Blasten	Leukozyten	0,37	*	0,8
	HMA	0,22 (0,19)	*	0,13
	HNA 1	-0,21 (0,21)	*	-0,12
	HNA 2	-0,11	*	-0,1
	MDA	0,1	*	0,3
AST	HMA	-0,18	0,14	0,22
	HNA 1	0,2	-0,16	-0,19
	HNA 2	-0,19	0,1	0,07
	MDA	-0,2	0,1	0,07
	ALT	0,79 (5x10 ⁻⁹)	0,85 (2x10 ⁻⁸)	0,83 (8x10 ⁻⁵)
Creatinin	MDA	-0,22	0,3	0,09
	HMA	0,1	0,12	0,14
	HNA 1	-0,09	-0,16	-0,09
	HNA 2	-0,12	0,15	-0,32

Tabelle 5: zeigt die Korrelationen zwischen ausgewählten Wertepaaren in den Gruppen Primum, Remission und Rezidiv. Es handelt sich um Korrelationskoeffizienten nach dem Pearson-Korrelationstest. Zu grau hinterlegten Feldern finden sich 2D-Plots im Bildanhang. Die Werte in Klammern sind entsprechende p-Werte.

* Personen in der Remissionsgruppe haben im peripheren Blut keine Blasten .

Diskussion

Wie einleitend schon erwähnt, gibt es verschiedenste laborchemische Werte, die als Marker für den oxidativen Stress angesehen werden. Der Redoxzustand des Albumins und die Konzentration von MDA im Plasma sind nur zwei Werte aus diesem Kanon. Somit kann durch diese Studie allein der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und AML nicht vollständig geklärt werden, auch wenn vor allem MDA als gut etablierter Marker angesehen werden kann. Da dieser Arbeit ein extrazellulärer und ein intrazellulärer Parameter für den oxidativen Stress zu Grunde liegt, können jedoch zwei verschiedene Aspekte des gleichen Systems untersucht werden.

Wie in den Ergebnissen schon ausgeführt, zeigen sich zum Teil signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, die miteinander korrelieren. Diese Unterschiede legen jedoch ein geringeres Maß an oxidativem Stress bei PatientInnen mit AML als bei gesunden Kontrollpersonen nahe. Dieses Ergebnis widerspricht der Ausgangshypothese deutlich.

Dies soll nun im Folgenden belegt werden. Zum einen zeigen die Abbildungen 5 und 6 (für den Redoxzustand des Albumins), sowie 7 (für MDA), dass sich die Gruppen in den Mittelwerten nicht oder nur minimal unterscheiden. Eine Ausnahme bildet hier der Anteil von HNA 1 in der Gruppe der primär Erkrankten (Abbildung 5, „Primum“) und jener von HMA in derselben (Abbildung 4, „Primum“).

Als Begründung kann nicht auf eine statistische Schwankung verwiesen werden, da der p-Wert für den Unterschied bei HNA 1 zwischen Kontrollgruppe und Primärgruppe 0,013 beträgt, und somit als signifikant anzusehen ist.¹ Selbiges gilt korrespondierend für den Anteil von HMA in der Primärgruppe (Pearson-Korrelationskoeffizient: -0,99). Dieser ist deutlich erhöht gegenüber allen anderen Gruppen. Der p-Wert zur Kontrollgruppe beträgt hier 0,027 und ist deswegen ebenso als signifikant zu bezeichnen. Die durch die Literatur gestützte Hy-

1 P-Werte nach dem Welch t-Test für unabhängige Stichproben mit ungleicher Standardabweichung unter 0,05 werden als signifikant angesehen, p-Werte unter 0,01 als hoch signifikant.

pothese des vermehrten intrazellulären und extrazellulären oxidativen Stresses bei AML Erkrankten kann aufgrund dieser Werte somit nicht gestützt werden.

Die dieser Arbeit zu Grunde liegende Hypothese des vermehrten oxidativen Stresses bei AML PatientInnen wird im Wesentlichen aus 2 Gründen gestützt. Zum einen ist dies der Nachweis von vermehrtem oxidativem Stress bei Patienten mit anderen malignen Erkrankungen [41] zum Beispiel bei Mammacarcinom. [42] Zum anderen gibt es eine wachsende Anzahl von Arbeiten, die eine erhöhte intrazelluläre Konzentration von ROS bei Patientengruppen mit AML zeigen konnten. [43][44][36] Der zweite Punkt zeigt jedoch einen wichtigen Unterschied zu den hier vorliegenden Daten auf, da es sich bei der Albuminoxidation eindeutig um einen Parameter für extrazelluläre ROS abhängige Veränderungen handelt.

Vergleicht man die eben erwähnten Abbildungen weiter, dann fällt auf, dass die Standardabweichungen der Kontrollgruppe immer kleiner sind, als die aller anderen Gruppen. Als Erklärungsversuch kann hier angeführt werden, dass es durchaus Einflüsse der AML auf das oxidative System gibt. Dies kann angenommen werden, weil die Standardabweichungen über alle Gruppen und alle Parameter (HMA, HNA 1, HNA 2 und MDA) hinweg zugenommen haben. Die Messungen der Kontrollgruppe und der Gruppe der Erkrankten erfolgten nach dem exakt gleichen Protokoll; dies gilt für die Werte der Albuminoxidation, sowie für die dazu separate Bestimmung der MDA Konzentrationen. Diese Umstände machen eine methodische Ursache sehr unwahrscheinlich.

Des Weiteren zeigt die schon vorher separat beschriebene Abbildung 8 (Seite 27) deutlich, dass die MDA Konzentrationen über die gesamte Primärgruppe nicht normalverteilt sind, sondern sich als zwei getrennte Gruppen präsentieren. Im Weiteren werden nun diese beiden Gruppen miteinander verglichen.² Hierbei sind auch die Abbildungen 9, 10 und Fehler: Referenz nicht gefunden (Seite 29 und folgende) zu nennen. Diese stellen die Anteile an HMA, HNA 1 und 2 in der Kontrollgruppe, der gesamten Primärgruppe, sowie in den beiden Primärsubgruppen (PSG) 1 und 2 dar. Wie im vorherigen Kapitel schon beschrieben, zei-

² Es werden die beiden Primärsubgruppen 1 (MDA unter 3 nmol/mL) und 2 (MDA über 3 nmol/mL) unterschieden.

gen sich hier signifikante Unterschiede trotz der verminderten Fallzahl, vor allem zwischen der Primärsubgruppe 1 (MDA unter 3 nmol/mL) und der Kontrollgruppe in Bezug auf die Anteile HMA und HNA 1.

Zum einen haben Personen der Primärsubgruppe 1 signifikant einen höheren HMA Anteil als Kontrollpersonen ($p=0,0446$), zum anderen haben sie auch signifikant weniger HNA 1 ($p=0,029$). Auch korreliert dieser Zusammenhang invers bei einem Korrelationskoeffizienten von $-0,99$. Sie zeigen also weniger extrazellulären oxidativen Stress. Diese Zusammenhänge können in den MDA Konzentrationen jedoch nicht gezeigt werden.

Dies zeigt, dass sich die PrimärpatientInnen hinsichtlich oxidativer Prozesse unterscheiden. Diese Feststellung passt zu der These, die sich aus den unterschiedlichen Standardabweichungen ergibt. Der Unterschied ist allerdings entgegengesetzt zur Ausgangshypothese: AML Patienten zeigen in dieser Studie signifikant weniger oxidativen Stress als gesunde Kontrollpersonen.

Tabelle 6 zeigt die Korrelationen zwischen MDA und den Werten der Albumin-oxidation für die Primärgruppe, deren beider Subgruppen, sowie der Supergruppe³. Die grau hinterlegten Werte zeigen leicht korrelierende Kombinationen an; die dazu gehörenden Plots finden sich im Bildanhang unter den Nummern 24 25 und 26ab Seite 47. Auffällig ist hierbei, dass es in der gesamten Primärgruppe überhaupt keine Zusammenhänge zu geben scheint und die Korrelationen in den Subgruppen nur schwach ausfallen. Aufgrund der p-Werte und der Plots kann ein Zusammenhang mit der Primärsubgruppe 2 verneint werden; sie betragen lediglich 0,21, beziehungsweise 0,17, auch wenn $n=14$ recht niedrig ist. Für die Kombination von MDA und HNA 2 in der Primärsubgruppe 1 beträgt der p-Wert 0,06 bei einem Koeffizienten von $-0,38$. Dieser Wert spricht im Gegensatz zu den vorherigen für einen schwachen Zusammenhang zwischen diesen Parametern.

3 Die Supergruppe fasst alle PatientInnen und Kontrollpersonen zu einer Gruppe, unabhängig von der Erkrankung oder dem Erkrankungsverlauf, zusammen.

	Primärgruppe	Primärsubgruppe 1	Primärsubgruppe 2	Supergruppe
HMA	-0,07	-0,03	0,35 (0,21)	-0,09
HNA 1	0,08	0,08	-0,39 (0,17)	0,08
HNA 2	-0,05	-0,38 (0,06)	0,1	0,07

Tabelle 6 zeigt die Korrelationen mit der Konzentration von MDA in den jeweiligen Primärsubgruppen und der Supergruppe. In Klammern befindet sich der jeweilige p-Wert; es handelt sich um Korrelationkoeffizienten nach dem Pearson-Korrelationstest. Die Plots zu den grau hinterlegten Kombinationen finden sich im Bildanhang (Nummer 24, 25 und 26ab Seite 47).

Die Daten deuten an, dass es einen Zusammenhang zwischen MDA und HNA 2, also zwischen intra- und extrazellulärem oxidativen Stress, geben könnte. Allerdings wäre dieser Zusammenhang reziprok, was eine hemmende Verbindung dieser beider Systeme nahe legt. Warum sich dieser Zusammenhang in der gesamten Primärgruppe nicht zeigt, bleibt jedoch ebenso unklar. Abschließend kann diese These nicht als valide angesehen werden, weil sie keinerlei Anhaltspunkte für einen Zusammenhang in der Supergruppe zeigen und die vorherigen Zusammenhänge, wenn signifikant, widersprüchlich sind.

In den einzelnen Gruppen, sowie auch in der Supergruppe, zeigt sich kein Zusammenhang zwischen MDA und der Albuminoxidation. Der Umstand, dass verschiedenste Parameter für den oxidativen Stress nicht miteinander korrelieren ist aus anderen Untersuchungen bekannt [36] und zeigt, dass es verschiedene voneinander unabhängige Anteile im System des oxidativen Stresses gibt.

Die in den Ergebnissen erwähnten klinischen Daten dienen auch dazu, Patientinnen aus der statistischen Auswertung wieder auszuschließen, wenn sie pathologische Werte zeigten. Diese Verkleinerung der Gruppen sollte gegebenenfalls eine Präzision der statistischen Aussagen ermöglichen. Die Korrekturen fallen jedoch nur minimal aus, weshalb sich auch nur geringste Unterschiede in der statistischen Auswertung zeigen, die keine neuen Aussagen erlauben.

Abschließende Interpretation

Die in dieser Studie gewonnenen und präsentierten Daten verneinen, zum Teil signifikant, die durch die Literatur gebildete These des vermehrten oxidativen Stresses bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie. Hierbei ist einerseits hervorzuheben, dass die Signifikanz nur für die Primärgruppe erreicht wurde. Dies liegt vermutlich daran, dass sie mit 38 eingeschlossenen PatientInnen die größte Gruppe darstellt. Auf der anderen Seite ist zu nennen, dass die Literaturlage zu oxidativem Stress bei Patienten mit AML durchaus als nicht eindeutig bezeichnet werden kann. Dabei spielen vor allem die verschiedensten Entstehungsprozesse und Einflussfaktoren des oxidativen Stresses eine große Rolle. Auch ist die Frage nach den Folgen und dem Ursprung von oxidativen Veränderungen nicht immer eindeutig zu beantworten.

Anhang

Bildanhang

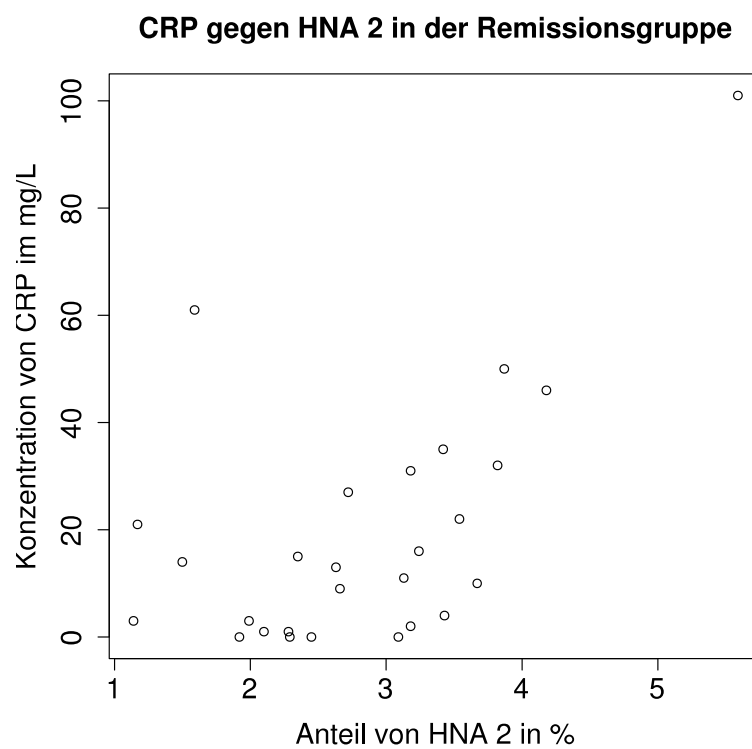


Abbildung 16: Die Werte CRP und HNA 2 korrelieren in der Remissionsgruppe mit einem Pearson Korrelationskoeffizienten von 0,56 bei einem p -Wert von 0,002. Siehe dazu Tabelle 5.

CRP gegen MDA in der Primärgruppe

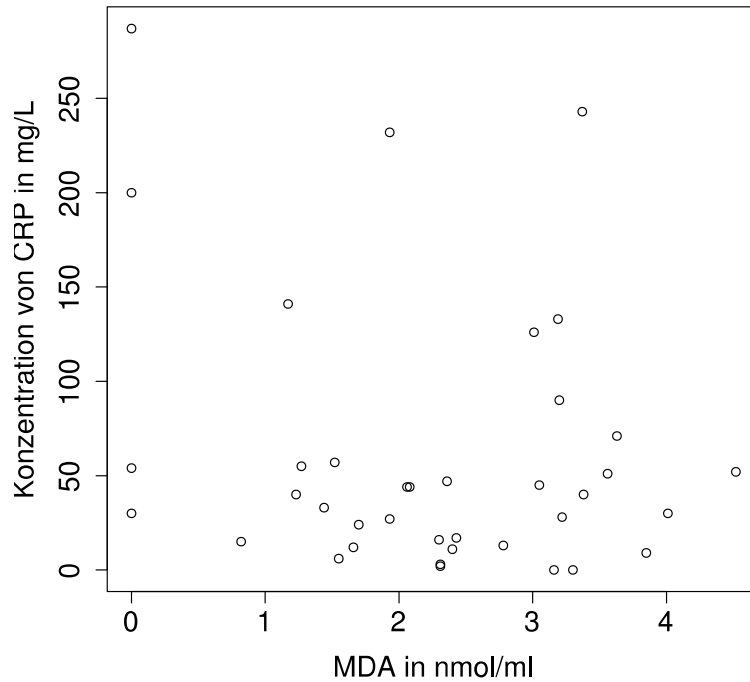


Abbildung 17: Die Konzentration von CRP und die Konzentration von MDA korrelieren in der Primärgruppe zwar mit einem Koeffizienten von $-0,22$, zeigen in der Graphik jedoch keinen Zusammenhang. Der p -Wert beträgt $0,18$.

CRP gegen MDA in der Rezidivgruppe

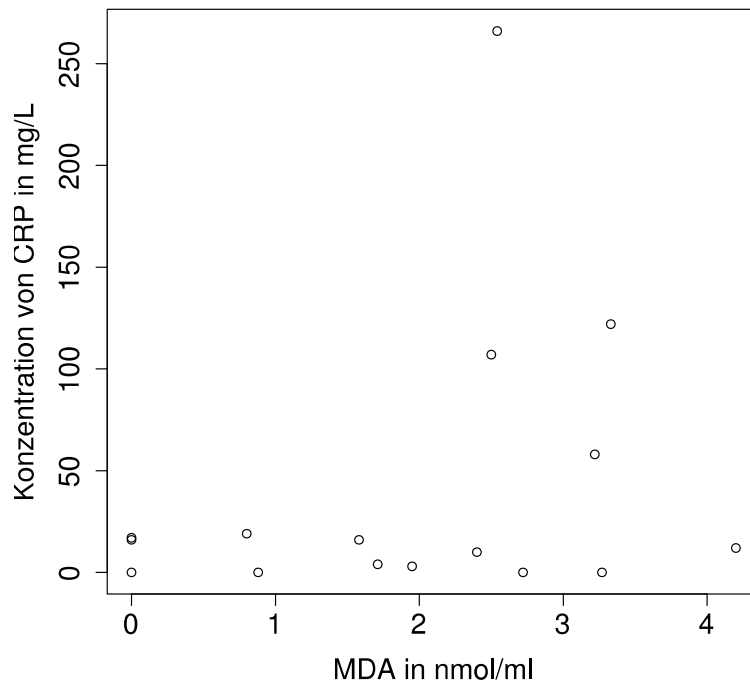


Abbildung 18: Die Konzentration von CRP und die Konzentration von MDA korrelieren in der Rezidivgruppe zwar mit einem Koeffizienten von $0,28$, zeigen in der Grafik jedoch keinen klaren Zusammenhang. Der p -Wert beträgt $0,28$.

Blastenanteil gegen HMA in der Primärgruppe

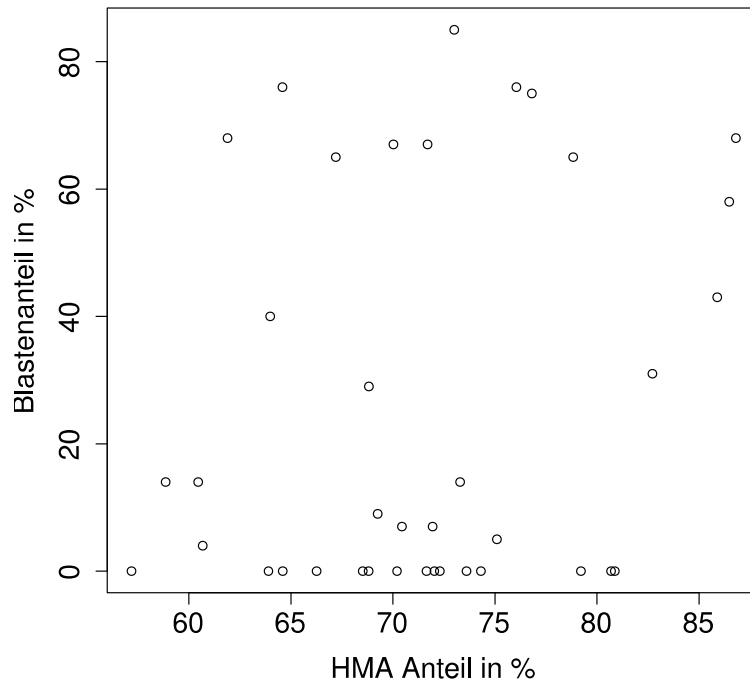


Abbildung 19: Der Blastenanteil und die Konzentration von HMA korrelieren mit einem Koeffizienten von 0,22 in der Primärgruppe. Der p-Wert hierzu beträgt 0,19.

Blastenanteil gegen HNA 1 in der Primärgruppe

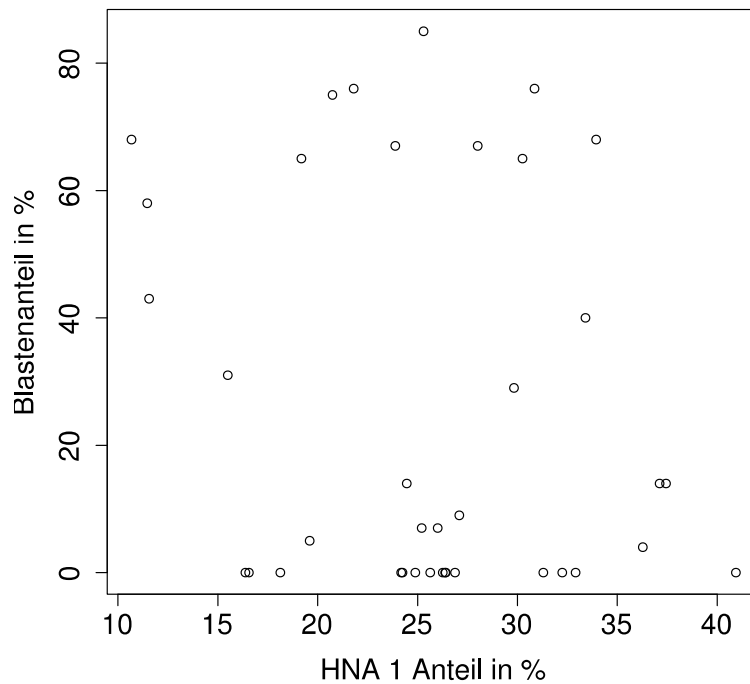


Abbildung 20: Der Blastenanteil und die Konzentration von HNA 1 korrelieren mit einem Koeffizienten von -0,21 in der Primärgruppe. Der p-Wert hierzu beträgt 0,21

AST gegen ALT in der Primärgruppe

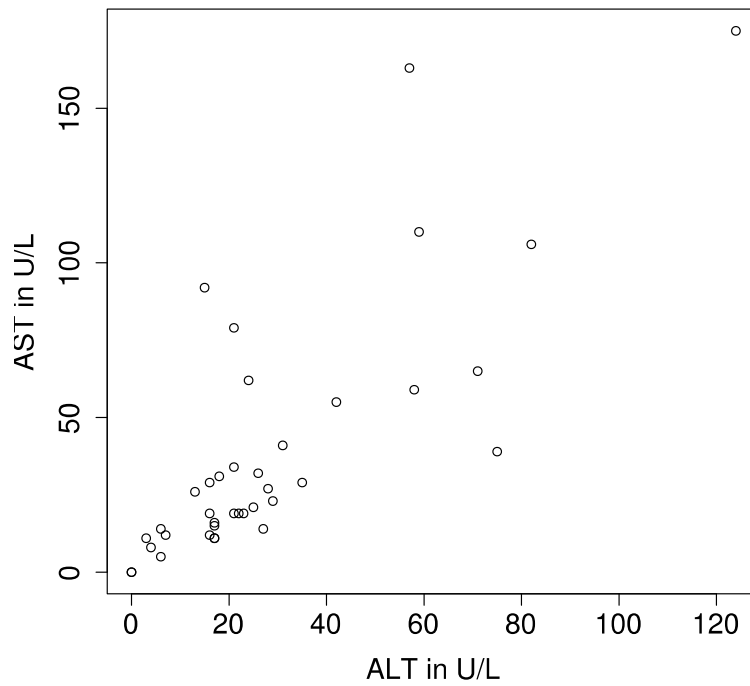


Abbildung 21: AST und ALT korrelieren mit einem Koeffizienten von 0,79 in der Primärgruppe. Der p-Wert beträgt $5,4 \times 10^{-9}$.

AST gegen ALT in der Remissionsgruppe

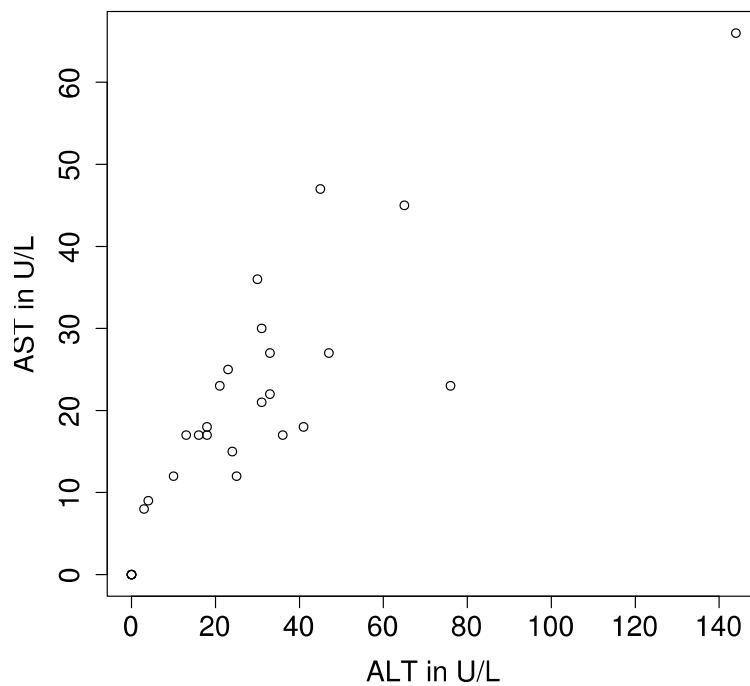


Abbildung 22: AST und ALT korrelieren in der Remissionsgruppe mit einem Koeffizienten von 0,85. Der p-Wert beträgt $1,7 \times 10^{-8}$.

AST gegen ALT in der Rezidivgruppe

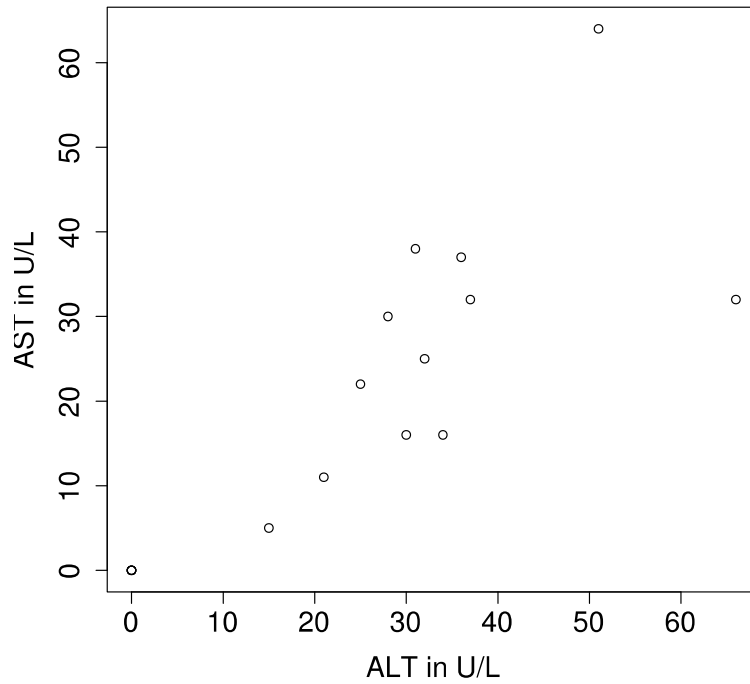


Abbildung 23: AST und ALT korrelieren in der Rezidivgruppe mit einem Koeffizienten von 0,83. Der p-Wert beträgt $7,8 \times 10^{-5}$.

MDA gegen HMA in der PSG 2

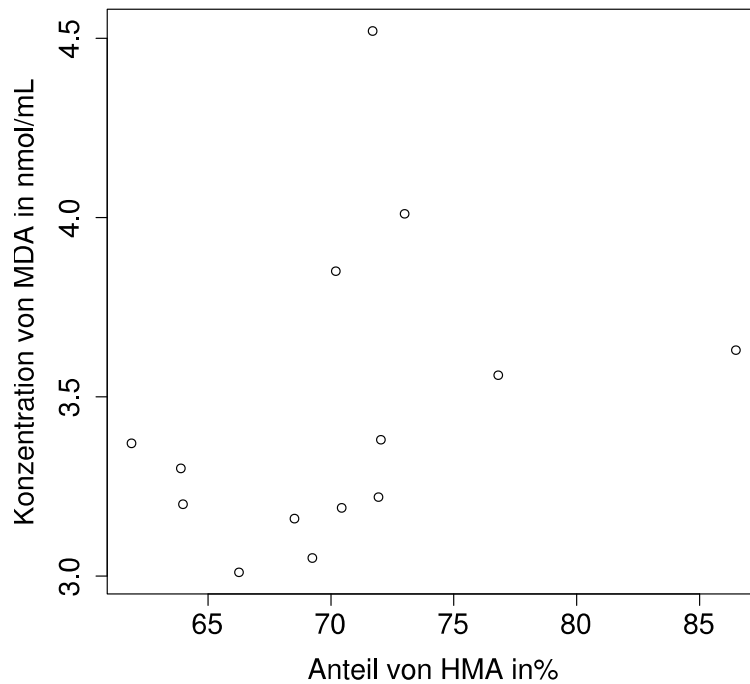


Abbildung 24: Die MDA Konzentration und der HMA Anteil korrelieren mit einem Koeffizienten von 0,35 in der Primärsgruppe 2 (PSG 2), der p-Wert beträgt jedoch 0,21.

MDA gegen HNA 1 in der PSG 2

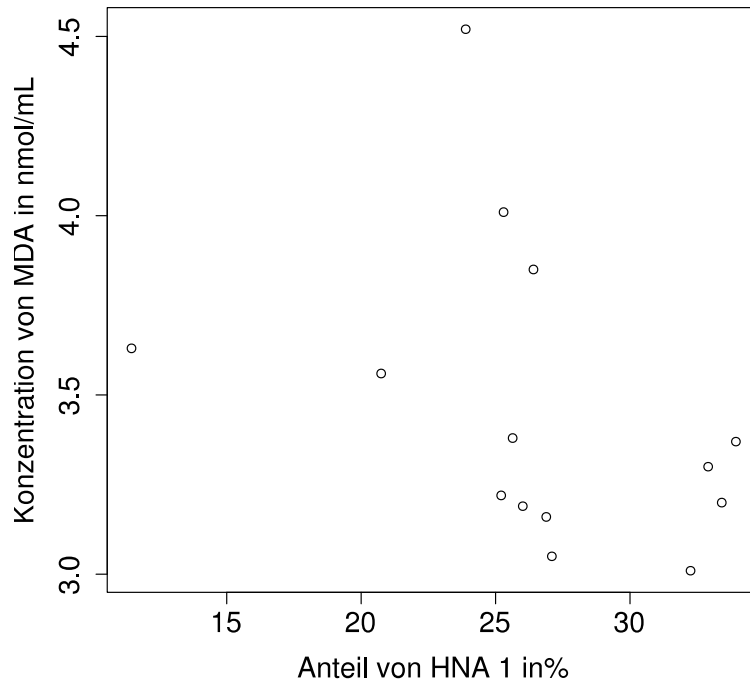


Abbildung 25: Die MDA Konzentration und der HNA 1 Anteil korrelieren mit einem Koeffizienten von $-0,39$ in der Primärsgruppe 2 (PSG 2), der p -Wert beträgt jedoch $0,17$.

MDA gegen HNA 2 in der PSG 1

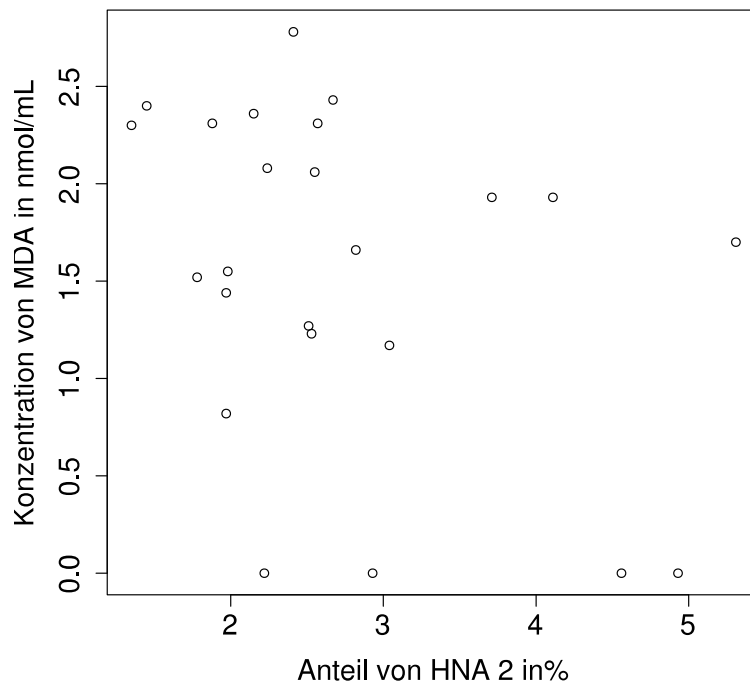


Abbildung 26: Die MDA Konzentration und der Anteil an HNA 2 korrelieren mit einem Koeffizienten von $-0,38$ bei einem p -Wert von $0,06$. Diese Konstellation spricht am ehesten für einen statistischen Zusammenhang.

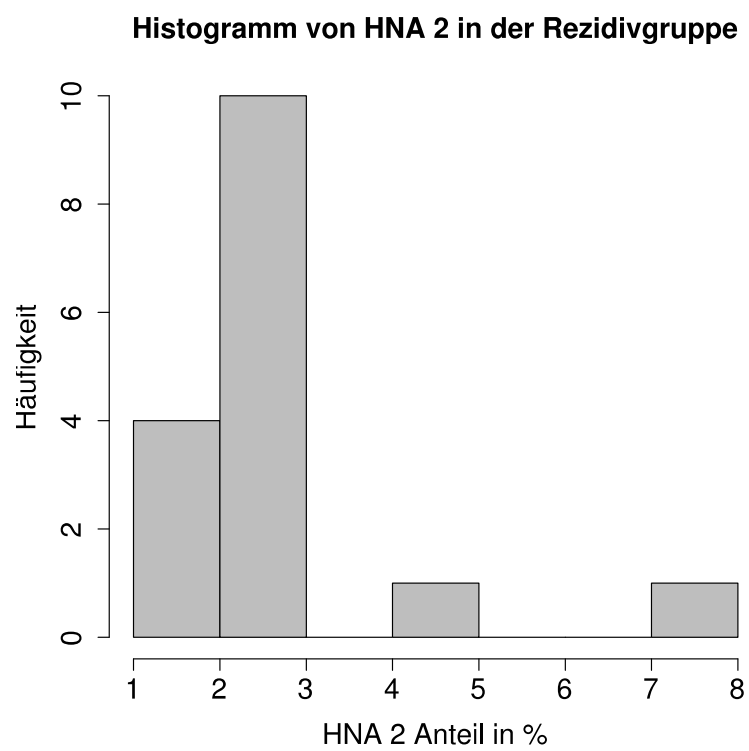


Abbildung 27: Verteilung der HNA 2 Anteile in der Rezidivgruppe.

Rohdaten

Gruppe	HMA⁴	HNA1	HNA2	MDA⁵	Blasten⁶	Leukozyten⁷	Creatinin⁸	CRP⁹	ALT¹⁰	AST
Primum	80.87	16.56	2.57	2.31	0	0.75	0.84	2	42	55
Primum	86.81	10.68	2.51	1.27	68	156.6	1.89	55	24	62
Primum	86.48	11.46	2.05	3.63	58	46	1.07	71	13	26
Primum	79.21	18.13	2.67	2.43	0	1.2	0.91	17	21	19
Primum	70.44	26.01	3.54	3.19	7	46	0.73	133	26	32
Primum	60.46	37.12	2.41	2.78	14	115	1.71	13	18	31
Primum	68.82	29.83	1.35	2.30	29	9	0.99	16	17	16
Primum	63.90	32.91	3.19	3.30						
Primum	68.52	26.88	4.61	3.16						
Primum	61.89	33.94	4.17	3.37	68	75	1.7	243	124	175
Primum	57.19	40.94	1.88	2.31	0	1.3	1.29	3	35	29
Primum	58.86	37.44	3.71	1.93	14	165	1.2	27	71	65

4 Die Einheit der Werte HMA, HNA 1 und HNA 2 ist Prozent. Der Bezugswert ist die Summe der Absolutwerte aller drei Fraktionen.

5 Die Einheit von MDA ist nmol/mL.

6 Die Einheit ist Prozent. Der Bezugswert ist die gesamte periphere Leukozytenpopulation.

7 Die Einheit ist G/L.

8 Die Einheit ist mg/dL..

9 Die Einheit ist mg/L.

10 Die Einheit von ALT und AST ist U/L gemessen bei 37 °C.

Primum	67.20	30.26	2.53	1.23	65	13	1.07	40	16	19
Primum	73.60	24.18	2.22		0	0.43	0.72	30	22	19
Primum	80.69	16.38	2.93		0	4.6	2.26	287	31	41
Primum	64.59	30.86	4.56		76	26.6	1.15	200	57	163
Primum	60.68	36.28	3.04	1.17	4	0.95	0.77	141	58	59
Primum	73.00	25.30	1.70	4.01	85	32	0.81	30	75	39
Primum	82.72	15.50	1.78	1.52	31	16	1.71	57	15	92
Primum	71.94	25.21	2.84	3.22	7	1.1	0.98	28	17	11
Primum	71.65	26.38	1.97	1.44	0	6.6	1.19	33	23	19
Primum	75.09	19.60	5.31	1.7	5	4.1	0.66	24	7	12
Primum	85.89	11.56	2.55	2.06	43	9	0.93	44	6	14
Primum	74.31	24.24	1.45	2.4	0	0.83	0.46	11	4	8
Primum	76.05	21.80	2.15	2.36	76	0.61	0.58	47	6	5
Primum	76.81	20.74	2.45	3.56	75	32	0.57	51	16	12
Primum	72.03	25.63	2.34	3.38	0	7	1.92	40	16	29
Primum	63.98	33.41	2.61	3.20	40	96	0.82	90	82	106
Primum	71.70	23.89	4.41	4.52	67	23.3	0.89	52	3	11
Primum	64.60	31.30	4.11	1.93	0	21.5	1.16	232	21	79
Primum	66.26	32.25	1.49	3.01	0	6.3	0.67	126	25	21
Primum	69.25	27.09	3.67	3.05	9	17.5	0.89	45	28	27

Primum	68.81	26.26	4.93		0	0.4	0.83	54	29	23
Primum	73.29	24.46	2.24	2.08	14	6.44	0.92	44	17	11
Primum	70.20	26.41	3.39	3.85	0	2.11	1.01	9	17	15
Primum	78.83	19.19	1.98	1.55	65	92	0.72	6	59	110
Primum	72.30	24.88	2.82	1.66	0	0.81	0.6	12	21	34
Primum	70.02	28.01	1.97	0.82	67	33	1.23	15	27	14

Gruppe	HMA	HNA1	HNA2	MDA	Blasten	Leukozyten	Creatinin	CRP	AST	ALT
Remission	66.35	30.22	3.43	2.67	0	0.78	0.86	4	27	33
Remission	67.71	29.66	2.63	1.5	0	0.61	0.64	13	30	31
Remission	63.57	33.98	2.45	2.5	0	0	0	0	0	0
Remission	61.33	34.49	4.18	3.15	0	0.02	0.78	46	23	76
Remission	63.76	33.06	3.18	1.88	0	0.06	0.93	31	12	25
Remission	71.21	25.70	3.09	2.31	0					
Remission	61.65	36.42	1.92	1.10	0					
Remission	66.83	30.88	2.29	2.25	0					
Remission	88.01	10.48	1.50	2.59	0	4.6	0.85	14	27	47
Remission	73.50	24.15	2.35	1.05	0	1.34	0.91	15	17	36
Remission	64.56	32.02	3.42	4.64	0	0.24	1.24	35	15	24
Remission	62.56	31.85	5.59	2.44	0	0.42	0.84	101	18	41

Remission	69.25	29.16	1.59	2.71	0	2	0.87	61	21	31
Remission	68.49	29.52	1.99	2.27	0	8.3	0.84	3	45	65
Remission	65.11	31.71	3.18	3.13	0	0.8	0.67	2	22	33
Remission	71.96	25.75	2.28	2.52	0	2.5	0.9	1	23	21
Remission	70.67	25.79	3.54	2.31	0	1.8	0.94	22	36	30
Remission	55.33	41.54	3.13	2.17	0	0.22	0.66	11	47	45
Remission	75.03	23.83	1.14	2.68	0	5.3	0.7	3	66	144
Remission	67.67	29.67	2.66	3.35	0	3	0.52	9	9	4
Remission	72.11	25.17	2.72	0.80	0	4.6	0.56	27	8	3
Remission	69.21	28.69	2.10	2.74	0	5.7	0.84	1	18	18
Remission	66.54	32.29	1.17	2.61	0	4.07	0.79	21	17	13
Remission	67.46	28.71	3.82	3.32	0	8.1	0.85	32	17	16
Remission	58.28	38.05	3.67	1.75	0	1.5	0.68	10	17	18
Remission	70.93	25.21	3.87	1.62	0	0.04	0.46	50	12	10
Remission	65.94	30.82	3.24	1.11	0	4.1	0.95	16	25	23

Gruppe	HMA	HNA1	HNA2	MDA	Blasten	Leukozyten	Creatinin	CRP	ALT	AST
Rezidiv	52.24	40.20	7.56	3.27						
Rezidiv	61.20	36.08	2.72	1.58	32	23	1.15	16	31	38

Rezidiv	70.65	27.38	1.96	4.2	58	99	0.88	12	34	16
Rezidiv	67.47	29.80	2.73	2.40	18	34	0.82	10	37	32
Rezidiv	68.18	29.94	1.88	2.72						
Rezidiv	87.92	10.22	1.86	1.95	41	8.6	0.85	3	28	30
Rezidiv	64.99	32.89	2.12	1.71	3	2.5	1	4	25	22
Rezidiv	63.48	34.18	2.35		44	1.4	0.96	16	15	5
Rezidiv	64.64	33.14	2.22	0.88						
Rezidiv	76.75	21.19	2.06	2.50	63	41	1.31	107	21	11
Rezidiv	69.55	28.46	1.99	2.54	0	3	0.68	266	66	32
Rezidiv	59.92	37.95	2.13	3.22	83	90	1.18	58	36	37
Rezidiv	62.35	33.61	4.04	3.33	85	230	1.07	122	32	25
Rezidiv	74.20	23.38	2.42							
Rezidiv	76.25	21.15	2.61	0.80	75	153	0.78	19	51	64
Rezidiv	70.01	27.67	2.32		11	0.93	1.14	17	30	16

Gruppe	HMA	HNA1	HNA2	MDA
Kontrolle	65.1	32.9	1.9	2.65
Kontrolle	71.8	25.3	2.9	2.80
Kontrolle	68.1	29.2	2.7	2.68
Kontrolle	73.4	24.7	1.9	2.68

Kontrolle	69.1	30.0	0.8	2.25
Kontrolle	70.1	28.1	1.7	2.35
Kontrolle	67.8	29.3	2.9	1.89
Kontrolle	64.3	34.1	1.5	2.08
Kontrolle	65.0	31.8	3.2	2.11
Kontrolle	65.5	32.3	2.2	2.13
Kontrolle	70.5	25.5	4.0	2.46
Kontrolle	71.0	26.5	2.5	1.85
Kontrolle	67.7	29.0	3.2	1.94
Kontrolle	66.3	31.8	2.0	2.17

Literaturverzeichnis

- 1: L Thomas; Labor und Diagnose; 2005, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, ISBN 3-9805215-5-9, S.926 ff
- 2: Th Peter; All about Albumin; 1996, Academic Press, ISBN 0-12-552110-3, S.
- 3: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAA98797.1>, 2013
- 4: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim?cmd=Search&term=103600&doptcmdl=Detailed&tool=genome.ucsc.edu>, 2014
- 5: Th Peters; All about Albumin; 1996, ACADEMIC PRESS, ISBN , S.16
- 6: L Thomas; Labor und Diagnose; 2005, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, ISBN 3-9805215-5-9, S.586 ff
- 7: G Löffler, P Petrides; Biochemie und Pathobiochemie; 2003, Springer, ISBN 3-540-42295-1, S.550 ff
- 8: P S Hole, R L Darley, A Tonks, Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias?; S. ; Blood; 2011
- 9: G Löffler, P Petrides; Biochemie und Pathobiochemie; 2003, Springer, ISBN 3-540-42295-1, S.520 ff
- 10: G Löffler, P Petrides; Biochemie und Pathobiochemie; 2003, Springer, ISBN 3-540-42295-1, S.981 f
- 11: J Lykkesfeldt, Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking; S. 50-58; Clinica Chimica Acta; 2007
- 12: Ch E Mortimer; Chemie; 1996, Thieme, ISBN 3-13-484306-4, S.225
- 13: Ch E Mortimer; Chemie; 1996, Thieme, ISBN 3-13-484306-4, S.541 f
- 14: D L Nelson, M M Cox; Lehninger Biochemie; 2009, Springer, ISBN 978-3-540-68637-8, S.951 f
- 15: L B Sullivan, N S Chandel , Mitochondrial reactive oxygen species and cancer; S. ; Cancer & Metabolism; 2014
- 16: L Thomas; Labor und Diagnose; 2005, , ISBN 3-9805215-5-9, S.1000 ff
- 17: P S Hole, R L Darley, A Tonks, Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias?; S. ; Blood; 2011
- 18: P Hole, J Zabkiewicz, C Munje, Z Newton, L Pearn, P White, N Marquez, R K Hills, A K Burnett, A Tonks, R Darley, Overproduction of NOX-derived ROS in AML promotes proliferation and is associated with defective oxidative stress signaling; S. 3322-3330; Blood; 2013
- 19: R Paffenholz, R A Berstrom, F Pascutto, et al., Vestibular defects in headtilt mice result from mutations in NOX3, encoding an NADPH oxidase; S. 486-491; Genes Dev; 2004
- 20: H Grasberger, D De, F Miot, J Pohlenz, S Refetoff, Missense mutations of dual oxidase 2(DUOX2) implicated in congenital hypothyroidism have impaired trafficking in cells reconstructed with DUOX2 maturation factor; S. 1408-1421; Mol Endocrinol. ; 2007
- 21: C L Quinlan, J R Treberg, I V Perevoshchikova, A L Orr, M D Brand, Native Rates of Superoxide Production from Multiple Sites in Isolated Mitochondria Measured using Endogenous Reporters; S. 1807-1817; Free Radical Biology & Medicine; 2012
- 22: L A Sena, N S Chandel, Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen

- species.; S. 158-167; *Molecular Cell*; 2012
- 23: K Oettl , V Stadlbauer, F Petter , J Greilberger, C Putz-Bankuti, S Hallström, C Lackner, R E Stauber, Oxidative damage of albumin in advanced liver disease; S. 469-473; *Biochimica et Biophysica Acta*; 2008
- 24: H Wiseman, B Halliwell, Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer; S. 17-29; *Biochemical Journal*; 1996
- 25: U K Udensi, P B Tchounwou, Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment; S. ; *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*; 2014
- 26: S Lee, K Yang, J Kwon, C Lee, W Jeong, S G Rhee, Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂.; S. 20336 –20342; *The Journal of Biological Chemistry*; 2002
- 27: S Kumar, C G Yedjou, P B Tchounwou, RESEARCH Open Access Arsenic trioxide induces oxidative stress, DNA damage, and mitochondrial pathway of apoptosis in human leukemia (HL-60) cells; S. ; *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*; 2014
- 28: U K Udensi and P B Tchounwou, Dual effect of oxidative stress on leukemia cancer induction and treatment; S. ; *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*; 2014
- 29: K Kuwata, S Era, M Sogami, The kinetic studies on the intramolecular SH, S-S exchange reaction of bovine mercaptalbumin.; S. 317-324; *Biochim Biophys Acta*; 1994
- 30: W Siegenthaler, H Blum; *Klinische Pathophysiologie*; 2006, , ISBN 3-13-449609-7, S.463 ff
- 31: W Böcker, H Denk, Ph U Heitz, H Moch; *Pathologie*; 2008, Elsevier, Urban & Fischer, ISBN 9-783437-423826, S.525 ff
- 32: H Doñner, E H Estey, S Amadori, F R Appelbaum, T Buechner, A K Burnett, H ´ Dombret, P Fenaux, D Grimwade, R A Larson, F Lo-Coco, T Naoe, D Niederwieser, G J Ossenkoppele, M A Sanz, J Sierra, M S Tallman, B Loewenberg, C D Bloomfield, Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet; S. 453-474; *Blood*; 2010
- 33: C Thiede, C Steudel, B Mohr, M Schaich, U Scha¨kel, U Platzbecker, M Wermke, M Bornha¨user, M Ritter, A Neubauer, G Ehninger, T Illmer, Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis; S. 4326-4335; *Blood*; 2002
- 34: H J M de Jonge, G Huls, E S J M de Bont, Gene expression profiling in acute myeloid leukaemia; S. 167-176; ; 2011
- 35: X Cai , Y Yu, Y Huang, L Zhang, P-M Jia, Q Zhao, Z Chen, J-H Tong , W Dai and G-Q Chen, Arsenic trioxide-induced mitotic arrest and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells.; S. 1333-1337; *Leukemia*; 2003
- 36: F Zhou, W-G Zhang, Y-C Wei, S Meng, G-G Bai, B-Y Wang, H-Y Yang, W Tian, X Meng, H Zhang, S-P Chen, Involvement of Oxidative Stress in the Relapse of Acute Myeloid Leukemia; S. 15010-15015; *The Journal of Biological Chemistry*; 2010
- 37: S Era, T Hamguchi, M Sogami, K Kuwata, E Suzuki, K Miura, K Kawai, Y

- Kitzazawa, H Okabe, A Noma, S Miyata, Further studies on the resolution of human serum mercapto- and nonmercaptoalbumin and on human serum albumin in the elderly by high-performance liquid chromatographie; S. 435-442; Int. J. Peptide Protein Res.; 1988
- 38: L Thomas; Labor und Diagnose; 2005, TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, ISBN 3-9805215-5-9, S.
- 39: J Pilz, I Meineke, C H Gleiter, Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative; S. 315-325; Journal of Chromatography B; 2000
- 40: H Esterbauer, J Lang, S Zdravec, T F Slater, Detection of malonaldehyde by high-performance liquid chromatography.; S. 319-238; Methods Enzymol; 1984
- 41: H Wiseman, B Halliwell, Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species : role in inflammatory disease and progression to cancer; S. 17-29; Biochem. J; 1996
- 42: GY Liou, P Storz, Reactive oxygen species in cancer; S. 479-496; Free Radical Research; 2010
- 43: F Z Q Shen, F X Claret, Novel roles of reactive oxygen species in the pathogenesis of acute myeloid leukemia; S. 423-429; Journal of Leukocyte Biology; 2013
- 44: A Sallmyr, J Fan, K Datta, K-T Kim, D Grosu, P Shapiro, D Smalland, F Rassool, Internal tandem duplication of FLT3 (FLT3/ITD) induces increased ROS production, DNA damage, and misrepair: implications for poor prognosis in AML; S. 3173-3182; Blood; 2008