

Diplomarbeit

**Änderungen des Redoxzustandes von humanem
Serumalbumin durch eine Radiotherapie bei
Patienten mit Prostatakarzinom**

eingereicht von

Maximilian Lirscher

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am/an der

Institut für physiologische Chemie

Universitätsklinik für Strahlentherapie - Radioonkologie

unter der Anleitung von

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

OA Dr. med. univ. Richard Partl

Graz, am 12.05.2017

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 12.05.2017

Maximilian Lirscher eh

Danksagungen

Zu allererst möchte ich mich bei meinen Betreuern Prof. Mag. Dr. Karl Öttl und OA Dr. Richard Partl bedanken. Sie haben es mir ermöglicht diese Diplomarbeit zu verfassen. Ich wurde hervorragend von ihnen betreut und konnte jederzeit auf ihre tatkräftige Unterstützung zählen. Ein weiterer Dank gilt Frau Doris Payerl und Frau Sandra Lemesch die mich mit ihrem Know-How bei den Laborarbeiten und Auswertungen unterstützt haben.

Ein großer Dank geht an meine Familie, meine Eltern Max und Regina, meine Schwester Victoria und meine Großmutter Elfriede. Ihr habt mich mit eurer Liebe, Unterstützung, Ausdauer, Motivation und Zuversicht das ganze Leben begleitet und geprägt und zu dem Menschen gemacht der ich heute bin.

Danke Laura für deine Liebe und Unterstützung. Ob Höhen oder Tiefen, du hast immer die richtigen Worte für mich. Ich freue mich auf viele weitere so wunderbare Jahre mit dir.

Danke Klemens, Joachim, Wolfi, Stefan, Patrick und Marga. Mit euch war die Studienzeit eine der schönsten Zeiten. Auf viele weitere Jahre Freundschaft.

Zusammenfassung

Fragestellung:

Bisher wurde in verschiedenen Studien der Zusammenhang zwischen oxidativen Stress und dem Redox-Zustand von humanem Serumalbumin nachgewiesen. Prostatakarzinompatienten werden einer Radiotherapie unterzogen, die oxidativen Stress im Tumorgewebe auslöst und diesen zur Therapie bzw. Zerstörung des Krebses nutzt. Diese Studie untersucht, ob der oxidative Stress rein auf das Tumorgewebe begrenzt ist oder ob auch eine systemische Wirkung auf den Körper nachgewiesen werden kann. Zur Untersuchung einer systemischen Wirkung der Radiotherapie wird der Redox-Zustand des Cystein-34 des humanen Serumalbumins herangezogen. Ziel dieser Studie ist es, mögliche Veränderungen des Albumins in Zukunft als Biomarker für oxidativen Stress im Körper zu verwenden.

Methode:

In Summe qualifizierten sich 15 Prostatapatienten für die Studie. Den Patienten wurden zu 4 Zeiten (unmittelbar vor Beginn der Therapie, nach der ersten Bestrahlung, 24 Stunden nach der ersten Bestrahlung, nach der letzten Bestrahlung) während ihrer Radiotherapie Blutproben entnommen. Nach Aufbereitung der Blutproben, wurden diese mittels High-Performance Liquid Chromatographie ausgewertet. Die Analyse der Daten erfolgte mittels den Softwares PeakFit und SPSS Statistics.

Ergebnis:

Die zu Beginn der Studie angenommene Verschiebung des Redox-Zustandes des Albumins in Richtung oxidierte Form ist nicht eingetreten. Jedoch zeigt sich zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme eine Verschiebung in Richtung der reduzierten Form des Albumins. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche signifikante Verminderung des HNA1 und eine deutliche Erhöhung des HMA Levels. Zu den anderen Zeitpunkten konnte keine signifikante Änderung gemessen werden. Die genaue Ursache für die Verschiebung in Richtung reduzierter Form konnte aufgrund der Datenlage nicht identifiziert werden. Eine mögliche Erklärung ist eine Überkompensation des oxidativen Stresses mit Antioxidantien welche aber durch weitere Untersuchungen mit anderen Messabständen geprüft werden müsste.

Abstract

Background:

Former studies showed that there is a coherence between oxidative stress and the redox state of human serum albumin. One treatment for prostate cancer is the radiotherapy. The radiotherapy uses the effect of oxidative stress on a local basis on cancer cells, to harm and destroy them. This study is concerned with the question if the oxidative stress of the radiotherapy will have any effects to the whole body. In this case cysteine-34 with its free thiol group is used as a marker for the redox state of the human serum albumin. If the study shows any effects on the cystein-34, in future, albumin could be used as a biomarker for oxidative stress.

Methods:

15 patients have been included into this study. The blood samples for measuring the redox state of the albumin were taken at 4 different times (immediately before the therapy start, immediately after the first radiation session, 24 hours after the first session, after the last session). The blood samples got processed and afterwards measured with the high-performance liquid chromatography. The resulting data was analysed with PeakFit and SPSS Statistics

Results:

The hypothesis from the beginning, stating an estimated raise of the oxidized fraction, could not be confirmed. Instead, the third blood samples showed an increasing level of the reduced fraction of the albumin. The analysis confirmed a significant lower level of the HNA1 and a higher level of the HMA fraction. The other samples didn't indicate any significant changes. The reason for the shift to the reduced albumin section is unknown. One theory is an overcompensating reaction of the body with antioxidants to the oxidative stress but this theory has to be proved with further studies with shorter periods of measurement.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	iv
Abstract.....	v
Inhaltsverzeichnis	vi
Glossar und Abkürzungen	viii
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xii
1 Grundlagen	13
1.1 Allgemeines über humanes Albumin	13
1.1.1 Aufbau des humanen Albumins	13
1.1.2 Die Aminosäure Cystein	14
1.1.2.1 Allgemeines zu Aminosäuren.....	14
1.1.2.2 Cystein	15
1.2 Oxidativer Stress	15
1.2.1 Oxidation und Reduktion von Albumin.....	16
1.2.1.1 Oxidation und Reduktion im Allgemeinen	16
1.2.1.2 Reversible oxidierte Form von Albumin.....	16
1.2.1.3 Irreversible oxidierte Form von Albumin.....	17
1.3 Die Prostata.....	18
1.3.1 Allgemeines über die Prostata	18
1.3.2 Funktion der Prostata.....	19
1.3.3 Das Prostatakarzinom.....	20
1.4 Die Radiotherapie.....	23
1.4.1 Physikalische Grundlagen der Strahlung.....	23
1.4.2 Funktionsprinzip eines Linearbeschleunigers	24
1.4.3 Wechselwirkung der Strahlung mit Materie	25
1.4.4 Planung und Durchführung der Bestrahlung.....	26
2 Aufbau der Studie	29
2.1 Thesen und Kriterien	29
2.2 Probanden	30
2.3 Materialgewinnung	31
2.4 Methode.....	33
2.5 Auswertung.....	35

3	Ergebnisse – Resultate	37
4	Interpretation und Diskussion.....	48
5	Literaturverzeichnis	52
6	Anhang.....	56
6.1	Bildanhang.....	56
6.2	Patientenrohdaten	60
6.3	Dokumente	65

Glossar und Abkürzungen

ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	Analysis of Variance
AST	Aspartat-Aminotransferase
CT	Computertomographie
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribonucleinacid)
GSH	Gluthation
GSSG	Gluthation-Disulfid
HbA1c	Glykohämoglobin
HCT	Hämatokrit
HGB	Hämoglobin
HMA	Humanes Mercaptalbumin
HNA1	Humanes Non-Mercaptalbumin-1
HNA2	Humanes Non-Mercaptalbumin-2
LDH	Laktatdehydrogenase
MCH	Mittleres korpuskulare Hämoglobingehalt
MCHC	Mittleres korpuskulare Hämoglobinkonzentration
MCV	Mittleres korpuskulare Volumen (Erythrozyten)
MR	Magnetresonanz
PLT	Thrombozyten
PSA	Prostata spezifisches Antigen
pTNM	TNM Klassifikation von Pathologen durchgeführt
RBC	Erythrozytenanzahl
ROS	Reaktive Sauerstoff Spezies
UA	Harnsäure
UREA UV	Harnstoff
WBC	Leukozytenanzahl

Abkürzungen von Einheiten

Da	Dalton
g	Gramm
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
μg	Microgramm
ng	Nanogramm
pg	Picogramm
Gy	Gray
h	Stunden
L	Liter
dL	Deziliter
mL	Milliliter
μL	Microliter
fL	Femtoliter
m	Meter
mm	Millimeter
μm	Micrometer
nm	Nanometer
M	Mol pro Liter
MeV	Megaelektronenvolt
min	Minuten
Pkg/d	Packungen pro Tag
U/L	Units pro Liter
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur von Albumin mit hervorgehobenen Cystein34. (7)	14
Abbildung 2: Struktur von L-Cystein bei physiologischem pH-Wert. (9)	15
Abbildung 3: Oxidation von Cystein-34 mit einer Disulfidbrücke (oxidiertes Albumin) (15,16)	17
Abbildung 4: Oxidationsweg von der Thiolgruppe zur Sulfonsäure(17).....	18
Abbildung 5: Irreversible oxidiertes Albumin mit a) Cysteinsulfinsäure und b) Cysteinsulfonsäure (15,17).....	18
Abbildung 6: Prinzipieller Aufbau eines Linearbeschleunigers (29).....	25
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Bestrahlungsvolumina (36).....	27
Abbildung 8: Planung der Bestrahlung eines Prostatakarzinoms (36)	29
Abbildung 9: Chromatogramm nach einer HPLC am Beispiel des Proband 19 ..	34
Abbildung 10: PeakFIT Ausschnitt: In drei Gauss'sche Glockenkurven gefittetes Chromatogramm am Beispiel von Proband 19 zum Zeitpunkt nach der letzten Bestrahlung.....	35
Abbildung 11: Verlauf des HMA. Die Graphen stellen die individuellen Verläufe der einzelnen Probanden dar, Zeitpunkte der Blutentnahmen: a. vor der ersten Bestrahlung, b. nach der ersten Bestrahlung, c. 24 h nach der ersten Bestrahlung, d. nach der letzten Bestrahlung	37
Abbildung 12: Boxplot des HMA Verlaufs, Zeitpunkte der Blutentnahme: a. vor der ersten Bestrahlung, b. nach der ersten Bestrahlung, c. 24 h nach der ersten Bestrahlung, d. nach der letzten Bestrahlung, * kennzeichnen die signifikanten Änderungen (genauere Beschreibung im Ergebnisteil)	38
Abbildung 13: Verlauf des HNA1. Die Graphen stellen die individuellen Verläufe der einzelnen Probanden dar, Zeitpunkte der Blutentnahmen: a. vor der ersten Bestrahlung, b. nach der ersten Bestrahlung, c. 24 h nach der ersten Bestrahlung, d. nach der letzten Bestrahlung	39
Abbildung 14: Boxplot des HNA1 Verlaufs, Zeitpunkte der Blutentnahme: a. vor der ersten Bestrahlung, b. nach der ersten Bestrahlung, c. 24 h nach der ersten Bestrahlung, d. nach der letzten Bestrahlung, * kennzeichnen die signifikante Änderungen (genauere Beschreibung im Ergebnisteil)	39
Abbildung 15: Verlauf des HNA2. Die Graphen stellen die individuellen Verläufe der einzelnen Probanden dar, Zeitpunkte der Blutentnahmen: a. vor der ersten	

Bestrahlung, b. nach der ersten Bestrahlung, c. 24 h nach der ersten Bestrahlung, d. nach der letzten Bestrahlung	40
Abbildung 16: Boxplot des HNA2 Verlaufs, Zeitpunkte der Blutentnahmen: a. vor der ersten Bestrahlung, b. nach der ersten Bestrahlung, c. 24 h nach der ersten Bestrahlung, d. nach der letzten Bestrahlung.....	41
Abbildung 17: Histogramm des HNA2 vor der ersten Bestrahlung.....	42
Abbildung 18: Die HMA Konzentration vor der ersten Bestrahlung korreliert mit dem Albumin der Laboruntersuchung mit einem Koeffizienten von 0,12 mit einer p- Wert von 0,69.	56
Abbildung 19: Die HMA Konzentration der ersten Bestrahlung korreliert mit dem Gleason-Score mit einem Koeffizienten von -0,15 und einem p-Wert von 0,59.	56
Abbildung 20: Die HMA Konzentration der ersten Bestrahlung korreliert mit dem Alter der Probanden mit einem Koeffizienten von -0,25 und einem p-Wert von 0,38.....	57
Abbildung 21: Die HMA Konzentration der ersten Bestrahlung korreliert mit dem GGT der Probanden mit einem Koeffizienten von -0,04 und einem p-Wert von 0,88.....	57
Abbildung 22: Die HMA Konzentration der ersten Bestrahlung korreliert mit dem ALT der Probanden mit einem Koeffizienten von 0,31 und einem p-Wert von 0,26.	58
Abbildung 23: Die HMA Konzentration der ersten Bestrahlung korreliert mit dem AST der Probanden mit einem Koeffizienten von 0,11 und einem p-Wert von 0,71.	58
Abbildung 24: Die HMA Konzentrationsdifferenz zwischen der Probe nach der ersten und 24 h nach der ersten Bestrahlung korreliert mit dem Albumin (abgenommen vor der Bestrahlungstherapie) der Probanden mit einem Koeffizienten von 0,18 und einem p-Wert von 0,51.....	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterteilung der Prostata in Zonen nach McNeal (19).....	19
Tabelle 2: Beschreibung des Gleason-Grading (18).....	21
Tabelle 3: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (24)	22
Tabelle 4: Probandentabelle	31
Tabelle 5: p-Werte nach Shapiro-Wilk-Test der Albuminfraktionen	42
Tabelle 6: Ergebnisse der paarweisen Vergleiche um den Zeitpunkt der HMA Änderung zu identifizieren.	44
Tabelle 7: Ergebnisse der paarweisen Vergleiche um den Zeitpunkt der HNA1 Änderung zu identifizieren.	45
Tabelle 8: Ergebnisse der paarweisen Vergleiche um den Zeitpunkt der HNA2 Änderung zu identifizieren.	46
Tabelle 9: Auflistung der durchgeführten Korrelationsüberprüfungen. Abnahmezeitpunkt (a) vor der ersten Bestrahlung (b) nach der ersten Bestrahlung (c) 24 h nach der ersten Bestrahlung.	47
Tabelle 10: Rohdaten der gemessenen Albuminfraktionen in Prozentanteilen zum gesamten Serumalbumin. Abnahmezeitpunkte: (a) vor der ersten Bestrahlung (b) nach der ersten Bestrahlung (c) 24 h nach der ersten Bestrahlung (d) nach der letzten Bestrahlung	60
Tabelle 11: Routinelaborparameter vor der ersten Bestrahlung (1/2). Die fehlenden Parameter befinden sich in Tabelle 12 auf der nächsten Seite. Einheiten: 1) U/L 2) g/dL 3) mg/dL.....	61
Tabelle 12: Routinelaborparameter vor der ersten Bestrahlung (2/2). Einheiten: 1) U/L 2) G/dL 3) mg/dL 4) mg/L 5) % 6) $\times 10^3$ /mL 7) $\times 10^6$ /mL 8) fL 9) pg	62
Tabelle 13: Routinelaborparameter nach der letzten Bestrahlung (1/2). Die fehlenden Parameter befinden sich in Tabelle 14 auf der nächsten Seite. Einheiten: 1) U/L 2) g/dL 3) mg/dL.....	63
Tabelle 14: Routinelaborparameter vor der ersten Bestrahlung (2/2). Einheiten: 1) U/L 2) g/dL 3) mg/dL 4) mg/L 5) % 6) $\times 10^3$ /mL 7) $\times 10^6$ /mL 8) fL 9) pg	64

1 Grundlagen

1.1 Allgemeines über humanes Albumin

Das menschliche Blut setzt sich aus verschiedensten Bestandteilen zusammen. Es besteht aus einem zellulären Anteil, den roten und weißen Blutkörperchen und dem Blutplasma. Das Verhältnis von zellulärem Anteil zu Blutplasma wird durch den Hämatokrit angegeben. Im Blutplasma befindet sich eine große Anzahl an Proteinen. Mit einer Konzentration von 70 Gramm Plasmaprotein/Liter ist das Blutplasma des Menschen eine hochkonzentrierte Proteinlösung. Albumin stellt mit einer Konzentration von 45 Gramm Plasmaprotein/Liter (52-62 % der Plasmaproteine) (1) den größten Anteil der Plasmaproteine dar. (2) Albumin ist ein gut wasserlösliches Protein und befindet sich auch in anderen Körperflüssigkeiten. Es kommt physiologisch in Liquor, Lymphe, Urin sowie pathologisch in Ödemen, Transsudat und Exsudat vor. (1) Die Aufgaben von Albumin sind vielseitig. Albumin regelt den Kolloid-osmotischen-Druck in den Blutgefäßen und übernimmt den Transport von verschiedenen Stoffen wie Metaboliten, Metallionen, Bilirubin, freie Fettsäuren, Phospholipiden, Aminosäuren, Hormonen und Medikamenten. Ebenso hat Albumin eine anti-oxidative Wirkung und dient als Substrat für die Bereitstellung von Aminosäuren. (3) Albumin wird in der Leber synthetisiert. Täglich werden etwa 150-250 mg/kg Körpergewicht synthetisiert. Das entspricht bei einem Mann mit 75 kg einer täglichen Synthese von 11,2-18,75 g. Für diese Menge werden 12-20 % der hepatischen Proteinsynthesekapazität benötigt. (4)

1.1.1 Aufbau des humanen Albumins

Das Gewicht von Albumin beträgt in etwa 66,4 kDa (66.438,41 Da) und es besteht aus einem Peptidstrang. Dieser Peptidstrang bildet sich aus einer aneinander Kettung von 585 Aminosäuren. Es handelt sich dabei um 20 verschiedene Aminosäuren, die in ihrer Anzahl verschieden oft in den Peptidstrang eingebaut sind. Die am häufigsten enthaltenen Aminosäuren sind Glutaminsäure und Alanin mit einem Vorkommen von jeweils 62 Stück. Die am wenigsten enthaltene Aminosäure ist Thryptophan. Sie kommt nur einmal im Peptidstrang vor. (5) Eine weitere in Albumin enthaltene Aminosäure ist Cystein. Cystein ist in Albumin 35mal enthalten, wobei 34 Cysteinreste miteinander eine Disulfid-Brückenbindung

eingehen. Durch diese Brückenbindung bildet sich die Sekundärstruktur des Proteins aus, die ein Gebilde aus Doppelschleifen darstellt. Humanalbumin hat 9 dieser Schleifen, die sich in 3 Domänen wiederholen. (6) Cystein-34, welches in der Domäne 1 zu finden ist (7) und bei keiner Disulfid-Brückenbildung beteiligt ist, wird in dieser Studie genau untersucht, da es der Ort der chemischen Veränderung bei oxidativen Stress ist.

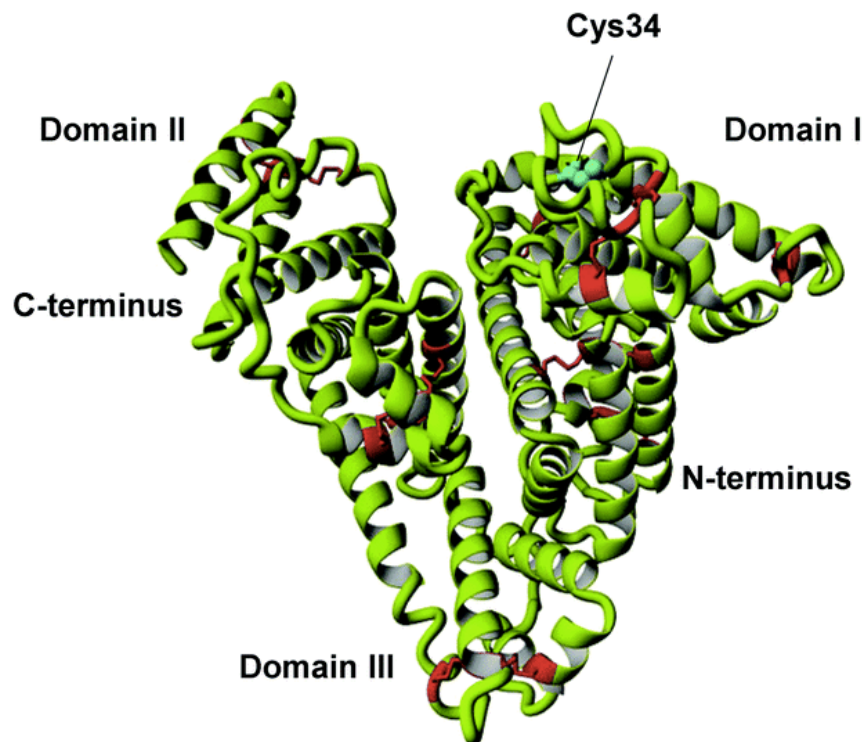


Abbildung 1: Struktur von Albumin mit hervorgehobenen Cystein-34. (7)

1.1.2 Die Aminosäure Cystein

1.1.2.1 Allgemeines zu Aminosäuren

Bei Aminosäuren handelt es sich um Moleküle, die für den menschlichen Körper von enormer Bedeutung sind. Es wird zwischen proteinogenen und nicht proteinogenen Aminosäuren unterschieden. Aus den proteinogenen Aminosäuren entstehen die Proteine (wie z.B. Albumin), die als Baustoffe für Zellen und als Enzyme für biochemische Reaktionen dienen. Aminosäuren sind durch ihre zwei spezifischen Gruppen, die am α -C Atom gebunden sind, gekennzeichnet. Eine Gruppe ist die Carboxylgruppe, die andere ist die Aminogruppe. Bei physiologischen pH liegt die Carboxylgruppe in Form eines Anions ($-\text{COO}^-$) und

die Aminogruppe in Form eines Kations ($-\text{NH}_3^+$) vor. (8) Um welche Aminosäure es sich handelt, wird durch den Rest der am α -C Atom gebunden ist festgelegt. (9)

1.1.2.2 Cystein

Cystein zählt zu den 20 bekannten proteinogenen Aminosäuren. Durch den Cysteinrest mit der Thiolgruppe ($-\text{SH}$) ist Cystein eine neutrale jedoch hydrophile (polare) Aminosäure. (9) Cystein ist eine nicht essentielle Aminosäure, was bedeutet, dass der menschliche Körper sie eigenständig synthetisieren kann. (8)

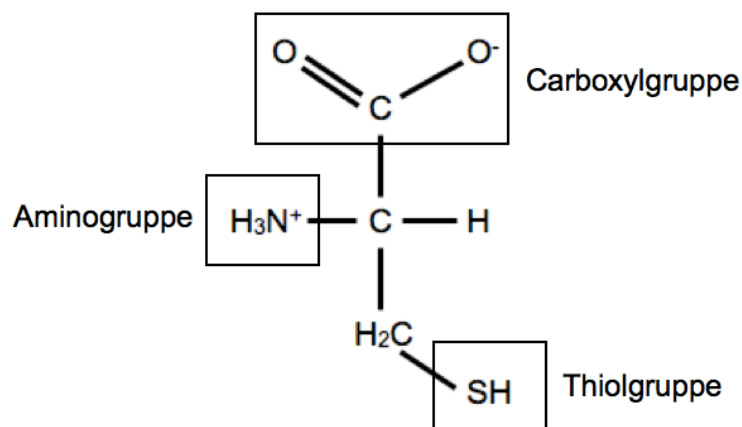


Abbildung 2: Struktur von L-Cystein bei physiologischem pH-Wert. (9)

1.2 Oxidativer Stress

Die Anfänge des oxidativen Stresses haben ihren Ursprung in der Entwicklung des Menschen. Die aerobe Energiegewinnung ist der anaeroben weit überlegen und so kam es, dass der Mensch zum Leben Sauerstoff benötigt. Obwohl bei dieser Entwicklung der Vorteil weit überwiegt, gibt es auch Nachteile. Durch die sauerstoffabhängigen Redoxreaktionen werden neben der Energiegewinnung reaktive Sauerstoffspezies frei. Diese reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind im Stande mit nahezu allen Biomolekülen zu reagieren und diese zu schädigen. Der Körper besitzt Abwehrmechanismen um die ROS zu binden und unschädlich zu machen. Kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen schützenden

Antioxidantien und schädigenden ROS, ist oxidativer Stress die Folge. (10) Zu den Körper schädigenden ROS gehören:

- Superoxid-Radikal $O_2^{\cdot-}$
- Wasserstoffperoxid H_2O_2
- Hydroxylradikal OH^{\cdot}

(10,11) Thiolgruppen dienen hervorragend als Reduktionsmittel. Darum spielt Cystein in den Redoxreaktionen eine große Rolle. Cystein mit seiner Thiolgruppe ist in Gluthation enthalten, welches im Zellinneren die Aufgabe des Antioxidans übernimmt. (11) Im Extrazellulärraum ist Cystein am häufigsten in Albumin gebunden und somit bildet Albumin den größten Reaktionspartner für die ROS. (12)

Die Thiolgruppe wird auch Mercaptogruppe genannt. Somit spricht man bei humanem Serumalbumin mit der Thiolgruppe beim Cystein-34 von humanem Mercaptalbumin (HMA). (13)

1.2.1 Oxidation und Reduktion von Albumin

1.2.1.1 Oxidation und Reduktion im Allgemeinen

Bei der Oxidation und Reduktion dreht sich alles um die Aufnahme und die Abgabe von Elektronen. Bei der Oxidation werden Elektronen von einem Reaktionspartner auf den anderen Partner abgegeben. Bei der Reduktion werden Elektronen von einem Reaktionspartner aufgenommen. Freie Elektronen sind nicht beständig. Somit muss, damit eine Oxidation durchgeführt werden kann, der Reaktionspartner reduziert werden. D.h. ein Reaktionspartner muss Elektronen aufnehmen, damit der andere Reaktionspartner Elektronen abgeben kann. Diese Art von chemischer Reaktion wird Redoxreaktion genannt. (14)

1.2.1.2 Reversible oxidierte Form von Albumin

Bei der reversibel oxidierten Form des humanen Serumalbumins spricht man von humanem Non-Mercaptalbumin-1. In dieser oxidierten Form kann das Albumin durch Reduktion wieder in seine Ausgangsform gebracht werden. Das Cystein-34 wird von den reaktiven Sauerstoffradikalen oxidiert, reagiert mit Cystin bzw.

GSSG-Molekül oder bildet anschließend mit Homocystein, Gluthation oder einem weiteren Cystein eine Disulfidbrücke.

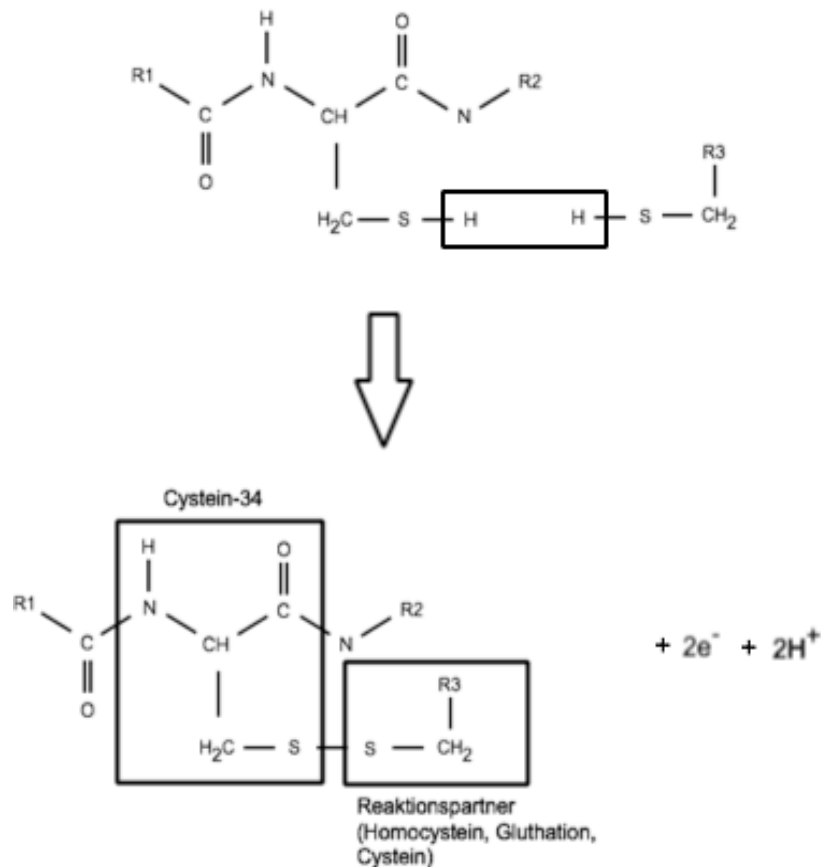


Abbildung 3: Oxidation von Cystein-34 mit einer Disulfidbrücke (oxidiertes Albumin)(15,16)

Die mit R1 und R2 dargestellten Reste in Abbildung 3 bilden mit dem gekennzeichneten Cystein-34 das gesamte Molekül des Albumins. R3 stellt den Rest des durch die Disulfidbrücke gebundenen Moleküls dar. R3 kann der Rest von Homocystein, Gluthation (GSH) oder der eines weiteren Cysteins sein. (13)

1.2.1.3 Irreversible oxidierte Form von Albumin

Bei der irreversiblen oxidierten Form des humanen Serumalbumins spricht man von humanem Non-Mercaptalbumin-2. Diese Oxidationsform wird durch starke Oxidationsmittel erreicht. (15) Wurde das Albumin in dieses Stadium oxidiert, kann es nicht mehr in seine Ausgangsform gebracht werden. In der folgenden Abbildung 4 wird die Oxidation von der Thiolgruppe zur Sulfonsäure beschrieben.

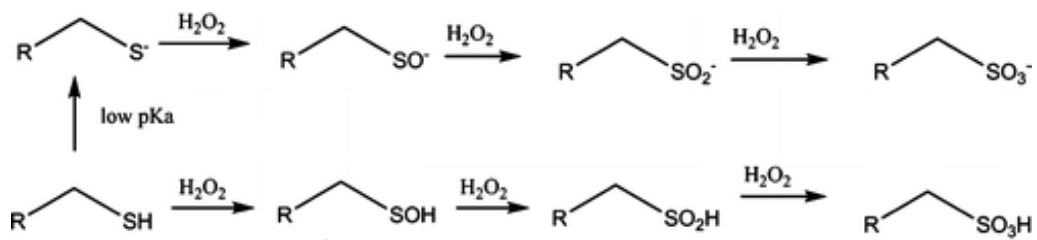


Abbildung 4: Oxidationsweg von der Thiolgruppe zur Sulfonsäure(17)

Die Thiolgruppe wird mithilfe von Wasserstoffperoxid zur Sulfengruppe oxidiert. Anschließend entsteht durch weitere Oxidation mit Wasserstoffperoxid Sulfinsäure. Durch den letzten Oxidationsschritt entsteht Sulfonsäure. Aufgrund der Instabilität von Sulfinsäure ist diese für diese Studie nicht relevant. (17)

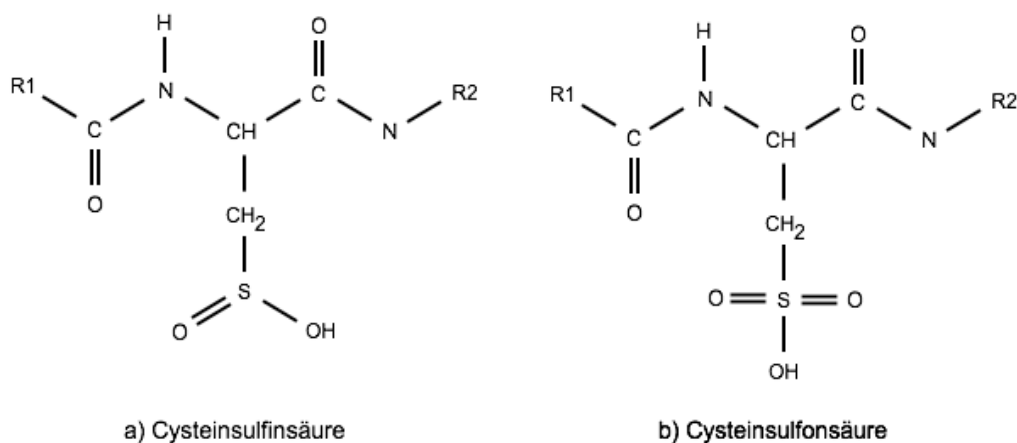


Abbildung 5: Irreversible oxidiertes Albumin mit a) Cysteinsulfinsäure und b) Cysteinsulfonsäure (15,17)

1.3 Die Prostata

1.3.1 Allgemeines über die Prostata

Die Prostata, auch Vorsteherdrüse genannt, gehört zu den männlichen Geschlechtsorganen. Sie wird in der 12. fetalen Woche aus der primitiven Urethra gebildet. Beim jungen Mann beträgt das Gewicht der Prostata ca. 20-30 g. Für das Wachstum der Prostata ist hauptsächlich das Hormon Testosteron zuständig. Mit steigendem Alter steigt meist das Gewicht der Prostata. Fast jeder Mann ab dem 70. Lebensjahr ist von der benignen Prostatahyperplasie betroffen. (18) Die

Prostata liegt zwischen Harnblase und Diaphragma urogenitale (= vorderer Beckenboden). (19) Oberflächlich besitzt die Vorsteherdrüse eine Kapsel aus straffem Bindegewebe. Das Innere des Organs besteht aus 30-50 verzweigten tubulo-alveolären Prostatadrüsen und einem Stroma, welches ca. mengenmäßig ein Viertel bis ein Drittel des Organs ausmacht. (20) Im Inneren der Prostata münden die Ducti ejaculatori in die Pars prostatica urethrae der Urethra. (19) Man unterscheidet den linken und den rechten Prostatalappen, die durch die Harnröhre getrennt werden. Durch embryologische und funktionelle Unterschiede wurde das Gewebe der Prostata in Zonen unterteilt. (18) In der Klinik ist die Gliederung nach McNeal am geläufigsten.

Zonen	Beschreibung
Periphere Zone	Entspricht ca. 70% der Organmasse und liegt im hinteren seitlichen und kaudalen Bereich.
Zentrale Zone	Entspricht ca. 25% der Organmasse und liegt als keilförmiger Abschnitt kranial zwischen peripherer und Periurethralzone. Diese Zone wird vom Ductus ejaculatoris durchzogen.
Periurethralzone	Diese Zone liegt manschettenartig um die Urethra und umschließt diese. Zu dieser Zone zählen ebenso die Glandulae urethrales.
Transitionszone	Hierbei handelt es sich um 2 Bereiche, die seitlich von der Urethra zwischen Periurethralzone und peripherer Zone liegen.
Anteriore drüsenfreie Zone	Besteht aus fibromuskulärem Stroma und liegt wie der Name sagt im vorderen Bereich der Prostata.

Tabelle 1: Unterteilung der Prostata in Zonen nach McNeal (19)

1.3.2 Funktion der Prostata

Die Funktion der Prostata dient der Fortpflanzung. Das dünnflüssige Sekret, welches die Drüse ausscheidet, entspricht 30% dem Ejakulat Volumen. In dem Sekret sind Stoffe wie das Prostata-spezifische Antigen (kurz PSA) und die saure Phosphatase enthalten. PSA wirkt als Protease und dient dazu, die Spermien aus

dem Koagulum zu befreien damit sie ihre volle Beweglichkeit erlangen können. Beim Prostata-Karzinom ist ein erhöhter PSA und Phosphatase Wert im Blut zu messen. (19)

1.3.3 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist ab dem 70. Lebensjahr das häufigste Karzinom des Mannes. Die Inzidenz der Erkrankung hängt stark von der ethnischen Gruppierung ab. (18,21) International erkranken 40-60 Weiße, 100-200 Afroamerikaner und nur 2 Asiaten pro 100 000 Einwohner. Obwohl das Prostatakarzinom das häufigste Karzinom des Mannes ist, liegt die Erkrankung bezüglich Mortalität aber nur an dritter Stelle. (21)

Der Hauptrisikofaktor für das Prostatakarzinom ist „das Alter“. Autoptische Untersuchungen an der Prostata von 90-jährigen Männern ergab eine Karzinomhäufigkeit von 70-100 %. (18) Ein Sprichwort der Skandinavier und Briten lautet: *„Man stirbt nicht am Prostatakarzinom, sondern mit Prostatakarzinom“*. Genetische Risikofaktoren spielen ebenfalls eine Rolle. Ist der Vater oder der Bruder erkrankt, besteht ein 2faches Risiko an einem Prostatakarzinom zu erkranken. Sind mehrere Verwandte erkrankt, besteht ein 5faches Risiko. (21)

Morphologisch entsteht das Prostatakarzinom meist in der peripheren Zone der Prostata. Von dort aus wächst das Karzinom Richtung Zentrum des Organs und/oder durchbricht die Kapsel und breitet sich im periprostatichen Fett- und Bindegewebe aus. Eine Infiltration der Samenblase ist im Weiteren die Folge. Aufgrund des Ursprungs in der androgen-sensiblen peripheren Zone begünstigt Testosteron das Tumorwachstum. Östrogen wirkt im Gegensatz Karzinom protektiv. (18)

In 95 % der Fälle handelt es sich bei dem Prostatakarzinom um ein Adenokarzinom. Die histologischen Veränderungen variieren stark mit der Größe des Tumors. Kleine Tumore haben meist eine uniforme Struktur und bestehen aus hoch differenzierten neoplastischen Drüsenzellen. Je größer das Karzinom, umso pluriformer und undifferenzierter erscheint es. Aufgrund der unterschiedlichen Differenzierungen der einzelnen Tumorzellen innerhalb des Tumors wurde zur

prognostischen Bewertung das Grading nach Gleason eingeführt. Dieses Grading beurteilt, anstatt den zytologischen Merkmalen, das Wachstumsmuster des Tumors.

Gleason-Grade	Beschreibung
Gleason 1	Hochdifferenziertes Adenokarzinom, gestörte Drüsenarchitektur
Gleason 2	Kleinere Drüsen, kleine Nukleolen, sonst keine zytologischen Atypien
Gleason 3	Mäßig differenziert, ungleichmäßig strukturierte Drüsen, diffus infiltrierend, deutlich nukleäre Atypien, große Nukleolen
Gleason 4	Fusion kleiner Drüsen, kribriiformes Muster
Gleason 5	Anaplastisches Karzinom, wächst in soliden Strängen oder komedoartig, Zellen polymorph, basophiles Zytoplasma, viele Mitosen

Tabelle 2: Beschreibung des Gleason-Grading (18)

Aus diesen Gleason-Graden wird durch Addition der Gleason-Score berechnet. Bei Stanzbiopsien wird das am häufigsten vorkommende histologische Wachstumsmuster und das am schlechtesten differenzierte Wachstumsmuster miteinander addiert. Ist bei einem Patienten der am häufigsten vorkommende Tumoranteil z.B. Gleason 2 und der höchste Gleasongrad z.B. Gleason 4, ergibt sich daraus ein Gleason-Score von 2+4=6. (22)

Bei Prostatektomiepräparaten werden hingegen die beiden häufigsten Gleason-Grade miteinander summiert.(23)

Eine Einteilung zur Beurteilung der Ausdehnung des Prostatakarzinoms ist die TNM-Klassifikation. Die TNM-Klassifikation bewertet den Tumor nach 3 Kriterien. T steht für die Ausdehnung des Tumors, N für die befallenen Lymphknoten und M für die Metastasen. Das p bedeutet, der Tumor wurde pathologisch untersucht und klassifiziert. Ein Beispiel der Klassifikation ist pT1bN1M0. (24) Die genaue Aufschlüsselung wird in Tabelle 3 beschrieben.

pT1	Tumor ist weder tastbar noch per bildgebendem Verfahren sichtbar
pT1a	Tumor in weniger als 5 % des Biopsie-Gewebes
pT1b	Tumor in mehr als 5 % des Biopsie-Gewebes
pT1c	Tumor wurde nach erhöhtem PSA-Wert durch eine Nadelbiopsie diagnostiziert

pT2	Tumor begrenzt auf Prostatakapsel (lokal begrenztes Karzinom)	
pT2a	Tumor in weniger als 50 % eines Seitenlappens	
pT2b	Tumor in mehr als 50 % eines Seitenlappens	
pT2c	Tumor in beiden Seitenlappen	
pT3	Tumor wächst über Prostatakapsel hinaus (lokal fortgeschrittenes Karzinom)	
pT3a	Tumorausbreitung ein- oder beidseitig über Prostatakapsel hinaus, Samenblasen tumorfrei	
pT3b	Tumorausbreitung ein- oder beidseitig über Prostatakapsel hinaus und in Samenblasen	
pT4	Tumorausbreitung in Nachbarstrukturen oder nicht verschiebbar (fixiert)	
Lymphknotenmetastasen (N)		
pN0	keine Metastasen in benachbarten (regionären) Lymphknoten (Beckenlymphknoten)	
pN1	Metastasen in benachbarten Lymphknoten	
Fernmetastasen (M)		
pM0	keine Fernmetastasen nachweisbar	
pM1	Fernmetastasen vorhanden	
pM1a	Metastasen in nicht benachbarten Lymphknoten	
pM1b	Knochenmetastasen	
pM1c	Metastasen in anderen Organen und/oder Strukturen	

Tabelle 3: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms(24)

In der Diagnostik des Prostatakarzinoms spielt der PSA-Wert eine wichtige Rolle. Er wird mittels ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) aus einer Blutprobe bestimmt und gibt meist den ersten Hinweis auf einen suspekten Prozess in der Prostata. Karzinomwahrscheinlichkeiten bei PSA Erhöhungen:

- 2-4 ng/mL → <10 %
- 4-10 ng/mL → 25 %
- >10 ng/mL → 60 %

Nach der PSA Bestimmung erfolgt die transrektale Palpation der Prostata. So kann die Größe, Form, Konsistenz und Abgrenzbarkeit bestimmt werden. Um eine sichere Diagnose stellen zu können muss eine Biopsie und eine histologische Untersuchung des Biopsats erfolgen. (21) Die Therapie hängt vom Stadium des Tumors, der Malignität, der Tumorprogression, der Hormonsensibilität und dem Alter des Patienten ab. Die möglichen Therapieverfahren bestehen aus neoadjuvanter/adjuvanter Hormontherapie, Strahlentherapie und chirurgischer Prostatektomie. Kombinationen dieser Therapien sind üblich. Ziel der Hormontherapie ist es, das Wachstum des Tumors durch Blockierung von

Testosteron zu verhindern. Die Prostatektomie und Radiotherapie dienen der Entfernung bzw. Abtötung der Krebszellen. Prognostisch sind Prostatektomie und Radiotherapie im lokalisierten Stadium gleichwertig. (21)

1.4 Die Radiotherapie

Die Radiotherapie, auch Strahlentherapie oder Radioonkologie genannt, ist ein Bereich in der Medizin, welcher sich als Ziel gesetzt hat, Tumorgewebe mithilfe von ionisierender Strahlung zu zerstören. Die Radioonkologie ist der Tumor Chirurgie sehr ähnlich. Anstatt der Entfernung mit dem Skalpell wird in der Radioonkologie mit ionisierender Strahlung der Tumor zerstört. Durch die Fortschritte in der Bestrahlungstechnik sind die Behandlungserfolge denen der chirurgischen Interventionen ebenbürtig. (25)

1.4.1 Physikalische Grundlagen der Strahlung

Bei der Bestrahlung von Tumorpatienten/Tumorpatientinnen wird ionisierende Strahlung verwendet. Die Besonderheit von ionisierender Strahlung, welche sie von anderen Strahlungsarten wie z.B. Sonnen- oder Wärmestrahlung unterscheidet, ist die Fähigkeit, Atome und Moleküle strukturell zu verändern. Man unterscheidet 2 Arten:

Photonenstrahlung:

Bei der Photonenstrahlung handelt es sich um elektromagnetische Wellenstrahlung ohne Ruhemasse und Ladung. Die elektromagnetische Wellenstrahlung transportiert Energie, die sogenannten Quanten(=Photonen). Diese Energie entsteht durch Quantensprünge. Diese Quantensprünge kommen zustande wenn Licht absorbiert, emittiert oder gestreut wird, wenn ein Elektron auf ein angeregtes Atom stößt, bei Kernzerfällen und Ionisationsvorgängen. Photonenstrahlung zählt zu der indirekt ionisierenden Strahlung. Durch die übertragene Energie wird ein geladenes Teilchen erzeugt, welches durch Stöße seine Energie abgeben kann. Zu dieser Strahlungsart gehören beispielsweise Höhenstrahlung, Röntgenstrahlung, Gammastrahlung und UV-Strahlung.

Korpuskularstrahlung:

Diese Strahlungsart zählt zur direkt ionisierenden Strahlung und besteht aus Teilchen mit Ruhemasse. Bei den Teilchen kann es sich um Elektronen, Protonen, Neutronen, Deuteronen, Alphateilchen, schwere Ionen und Mesonen handeln.

Korpuskularstrahlung entsteht beispielsweise durch Beschleunigung von geladenen Teilchen durch ein elektrisches Feld oder durch die Betastrahlung beim Zerfall von Atomkernen. (26,27)

1.4.2 Funktionsprinzip eines Linearbeschleunigers

Für die radiotherapeutische Behandlung von Patienten/Patientinnen werden an der Universitätsklinik für Strahlentherapie - Radioonkologie Graz Linearbeschleuniger verwendet. (28) Die Bestrahlung des Prostatakarzinoms erfolgt mithilfe ultraharter Röntgenbremsstrahlung. Die Erzeugung verläuft über mehrere Schritte. Zuerst werden mithilfe eines Injektors freie Elektronen in die lineare Beschleunigungsstrecke des Linearbeschleunigers eingeschossen. Die Beschleunigungsstrecke besteht aus Ringkondensatoren, zwischen denen ein hochfrequentes elektrisches Wechselfeld aufgebaut wird. Durch dieses Wechselfeld werden die Elektronen beschleunigt. (29) Es entsteht hochenergetische Korpuskularstrahlung mit Elektronenenergien zwischen 4-50 MeV in Abhängigkeit von der Bauart des Linearbeschleunigers und dem Bedarf. (30) Nach der Beschleunigung werden die hochenergetischen Elektronen durch einen Umlenkungsmagneten auf ein Metall (=Target) geschossen. Durch das Auftreffen der Elektronen auf die Metallatome des Targets entsteht durch den Stoß ultraharte Röntgenbremsstrahlung (Photonenstrahlung) mit Energien von z.B. 6 oder 18 MeV, die für perkutane Bestrahlungen einen günstigen Tiefendosisverlauf aufweisen. (28) Mit dem Kollimator System wird das Strahlenbündel auf die gewünschte Strahlungsfläche begrenzt. (29) An der Universitätsklinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Medizinischen Universität Graz werden derzeit Linearbeschleuniger der Firma Varian® verwendet.

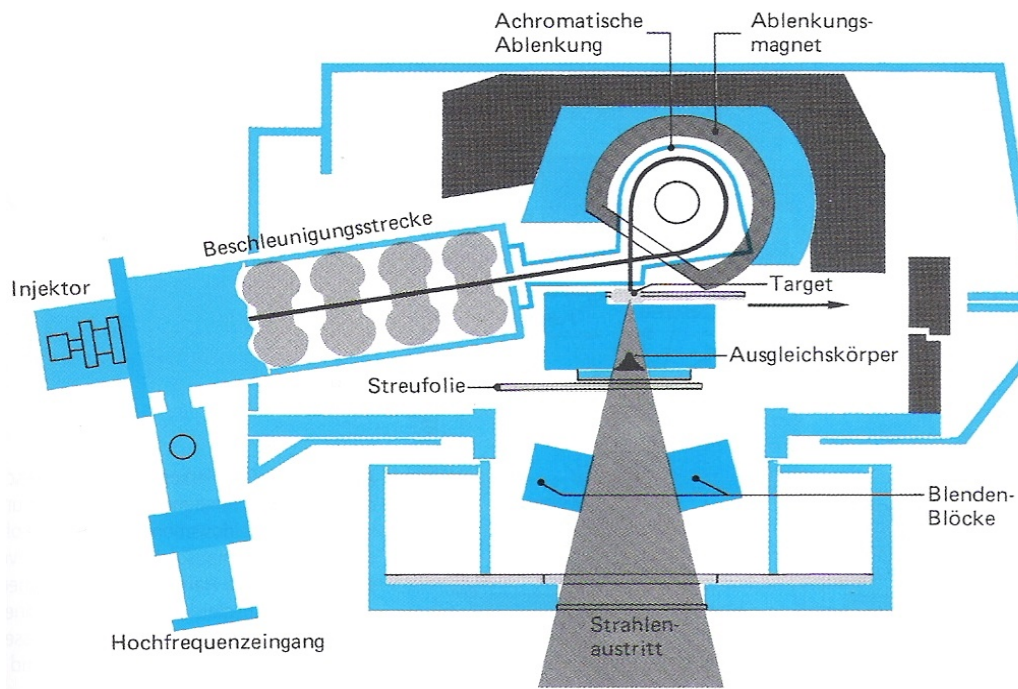


Abbildung 6: Prinzipieller Aufbau eines Linearbeschleunigers (29)

1.4.3 Wechselwirkung der Strahlung mit Materie

Tumorzellen haben die Fähigkeit des programmierten Zelltodes oder die Eigenschaft in die G₀ Phase des Zellzyklus einzutreten verloren. Dadurch teilen sich die entarteten Zellen häufiger und gehen nicht mehr ihrer eigentlichen Funktion nach. Die DNA spielt in diesen Vorgängen eine wichtige Rolle. Aufgrund ihrer hohen Strahlensensibilität ist die DNA der primäre Angriffspunkt der Bestrahlung. (31) Bei der Bestrahlung von Gewebe mit ionisierender Strahlung unterscheidet man zwischen einer direkten und einer indirekten Strahlenwirkung.

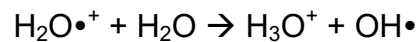
Bei der direkten Strahlenwirkung trifft hochenergetische Photonenstrahlung auf die Biomoleküle der DNA. Atome in stabilen Biomolekülen haben eine gerade Anzahl an Elektronen in ihren Schalen. Durch den Compton-Effekt wird durch die Photonenenergie ein Elektron aus der Atomschale gestoßen. Dadurch wird das betroffene Biomolekül verändert bzw. geschädigt. (27,32)

Bei der indirekten Strahlenwirkung spielt die Oxidation eine große Rolle. Neben der DNA der Tumorzellen werden ebenso die anderen Bausteine der Zellen bestrahlt. Das Zytosol der Zellen besteht zum großen Teil aus Wasser. Durch die Bestrahlung des Wassers können initial zwei Reaktionen beobachtet werden.

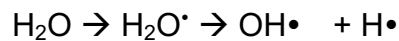
1. Einerseits bilden sich Wasserradikal-Kationen (Ionisation):



Durch weitere Reaktionen der Wasserradikal-Kationen mit Wasser entstehen Hydroxylradikale:



2. Andererseits entstehen auf direktem Weg Hydroxylradikale (Anregung und Spaltung):



Die Hydroxylradikale OH^{\bullet} sind sehr stark reaktiv und schädigen die DNA der Tumorzellen durch Oxidation. Ihnen werden zwei Drittel der von Photonen erzeugten indirekten DNA-Schäden zugeschrieben. Die bei der Ionisation der Wassermoleküle freiwerdenden Elektronen können weitere Ionisationen auslösen. (33)

Durch die direkten und indirekten Mechanismen der Bestrahlung kommt es zu Basenschäden, Einzel- und Doppelstrangbrüchen, DNA-Vernetzungen bzw. Crosslinks und Bulky Lesions (Kombination der Schäden). Physiologische sowie pathologische Zellen im menschlichen Körper besitzen Reparaturmechanismen um fehlerhafte oder beschädigte DNA zu reparieren. Wird die DNA einer Zelle genügend geschädigt, führt dies zum Absterben der Zelle bzw. mitotischem Zelltod. (34)

1.4.4 Planung und Durchführung der Bestrahlung

Im klinischen Alltag erfolgt die Diagnose „Karzinom“ durch die Biopsie der suspekten Prostata. Die Patienten werden von den Urologen/Urologinnen auf die Radioonkologie überwiesen. Vor Start der Behandlung wird über die therapeutische Zielsetzung (palliatives oder kuratives Setting) entschieden. In dieser Studie wurden ausschließlich Patienten mit kurativem Setting eingeschlossen.

Die Prostata ist ein bewegliches Organ. So verändert sich die Lage der Prostata in allen Raumrichtungen durch eine unterschiedliche Füllung der Blase oder des Rektums. Um diese Lageveränderungen zu berücksichtigen und eine genaue und reproduzierbare Bestrahlung des „Targets“ zu gewährleisten, werden vor Therapiebeginn ultraschallgezielt vier ca. 3x1x1 mm große Goldmarker in die Prostata implantiert. Diese Stifte sind sowohl im CT, als auch im MRT und im konventionellen Röntgen gut sichtbar. Aufgrund des Materials bleiben die Goldstifte auch nach der Bestrahlung reizlos im Körper. (35)

Eine Planungs-CT in Bestrahlungsposition bildet die Grundlage für die Konturierung der Bestrahlungsvolumina. Der/die behandelnde Facharzt/Fachärztin für Strahlentherapie - Radioonkologie zeichnet am Computer die zu bestrahlenden Strukturen und definiert die angrenzenden Risikostrukturen. Zur besseren Abgrenzung der Weichgewebe wird zusätzlich zum zuvor durchgeführten CT ein MR-Datensatz fusioniert.

Bei der Konturierung wird zwischen verschiedenen Volumina unterschieden:

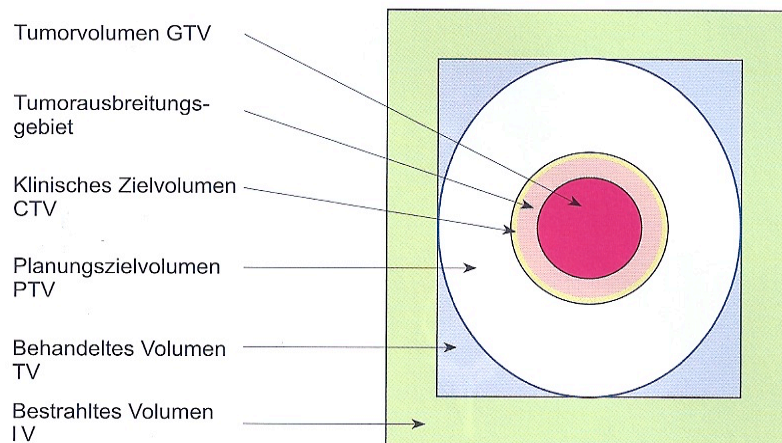


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Bestrahlungsvolumina (36)

- GTV (Gross Tumor Volume):

Dieses Volumen entspricht dem makroskopischen Tumolvolumen

- CTV (Clinical Target Volume):

Ist die subklinische Infiltrationszone am Tumorrund in die wahrscheinlich Tumorzellen eingedrungen sind (jedoch makroskopisch noch nicht nachweisbar)

- PTV (Planning Target Volume):

Dieses Volumen entspricht dem CTV mit einem Sicherheitssaum in allen Raumbenen, um Setup Errors (intrinsische Prostatabewegungen, interfraktionäre Unterschiede der Blasen- und Rektumfüllung, Lagerungsungenauigkeiten, etc.) auszugleichen.

- TV (Treated Volume):

Ergibt sich wenn das Planungszielvolumen von der Isodosenfläche, die ausreichend für das Erreichen des Behandlungserfolges ist, abgedeckt wird. Im Idealfall sollte das TV so groß wie das PTV sein.

- IV (Irradiated Volume):

Gesamtes Volumen, welches bestrahlt wurde. Dazu zählen auch die Volumina, die unvermeidbar und unerwünscht mitbestrahlt werden.

- Risikobereich:

Bei dem Risikobereich handelt es sich um Organe, die ein hohes Risiko an Spätfolgen haben. Diese Organe werden Risikoorgane genannt. Die Bestrahlung dieser Organe sollte vermieden oder die Strahlendosis so gering wie möglich gehalten werden. (36) In Abbildung 8 sind die Risikoorgane Blase und Rektum in orange bzw. rosa eingezeichnet.

Die Bestrahlungsplanung der in die Studie eingeschlossenen Patienten erfolgte mithilfe der inversen dynamischen intensitätsmodulierten Bogenbestrahlungstechnik (VMAT). Je nach Risikoprofil wurden Energiedosen von 72, 76 oder 78 Gray (Gy) appliziert, wobei das Standardschema 2 Gy Tagesdosis mit 5 Fraktionen pro Woche vorsah.

Die Einheit der absorbierten Energie ist die Energiedosis Gray (Gy) und errechnet sich aus dem Quotienten der absorbierten Energie und der Masse, die die Energie aufnimmt.

$$1\text{Gy} = 1 \frac{\text{J}}{\text{kg}} = \frac{\text{Energie}}{\text{Masse}} \quad (37)$$

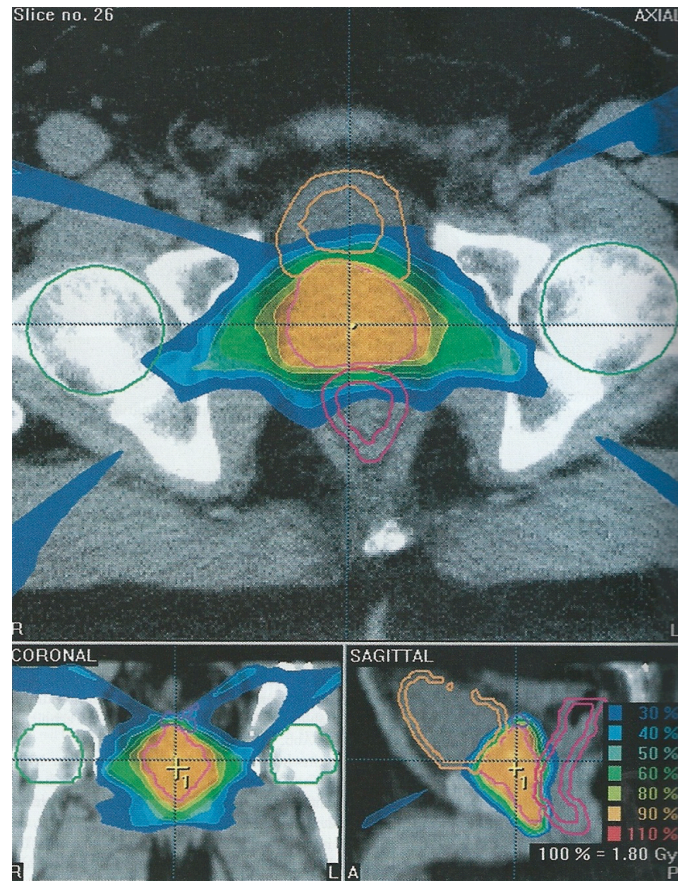


Abbildung 8: Planung der Bestrahlung eines Prostatakarzinoms (36)

2 Aufbau der Studie

2.1 Thesen und Kriterien

Das Ziel dieser Studie war es, zu überprüfen, ob die Radiotherapie des Prostatakarzinoms oxidativen Stress im Körper des Behandelten auslöst. Als Marker für diese Untersuchung wurde der Redoxzustand des humanen Serumalbumins herangezogen.

Bei dieser Studie handelt es sich um eine Pilotstudie. Die H1 Hypothese entspricht einer Veränderung des Redoxzustandes von Albumin in Abhängigkeit zur Bestrahlung der Probanden. Die H0 Hypothese entspricht dem Gleichbleiben des Redoxzustandes zum Ausgangswert.

Aufgrund der Prostataerkrankung behandelt diese Studie ausschließlich Männer. Um die Homogenität der Probandengruppe zu sichern, wurden folgende Einschluss- und Ausschlusskriterien festgelegt. Sie dienen der Elimination von anderen Einflüssen auf das Serumalbumin.

Einschlusskriterien:

- Die Prostatakarzinompatienten müssen im Alter zwischen 60 und 80 Jahre sein.
- Die Prostata bzw. das Prostatakarzinom dürfen nicht im Sinne einer Resektion oder Teilresektion chirurgisch vorbehandelt sein.

Ausschlusskriterien:

- Lebererkrankungen
- Nierenerkrankungen mit einem Creatinin $>1,5$ mg/dL
- Akute Lungenerkrankungen
- Autoimmunerkrankungen
- Akute Infektionen
- Extreme Ernährungsformen
- Starke Raucher mit einem Zigarettenkonsum von >1 Pkg/d

Um diese Kriterien zu überprüfen wurden bei der ersten und letzten Blutabnahme das Blutbild, HbA1c-Wert, die Nieren-, Leber-, und Entzündungswerte überprüft.

2.2 Probanden

Bei den Probanden handelt es sich ausschließlich um Patienten mit einem histologisch verifizierten lokal begrenzten Prostatakarzinom, im Alter zwischen 60 und 80 Jahren. Die Probanden wurden ausschließlich an der Universitätsklinik für Strahlentherapie - Radioonkologie mit kurativer Zielsetzung behandelt. Bei allen Patienten wurde vor der Bestrahlung eine Goldmarker-Implantation für die exakte Bestrahlung durchgeführt. Insgesamt wurden 20 Patienten über die Studie aufgeklärt. Von den aufgeklärten Probanden willigten 19 ein, an der Studie teilzunehmen. Mit ihnen wurde anschließend ein Anamnesegespräch durchgeführt. Leider mussten 2 Patienten aufgrund Terminkollisionen, ein Patient wegen erhöhter Nieren- und Leberwerte und ein weiterer wegen eines unvollständigen Datensatzes von der Auswertung ausgeschlossen werden. Letztendlich nahmen 15 Patienten an der Studie teil. Das Durchschnittsalter der Patienten beträgt 72,6 Jahre.

Probanden-Id.	Alter (Jahre)	PSA-Wert initial (ng/mL)	Gleason-Score	pTNM	Dosierung (Gray)
1	60	5,19	6(3+3)	pT1c	72
2	76	4,00	6(3+3)	pT1c	72
4	69	66,56	6(3+3)	pT1c	78
5	75	0,29	8(4+4)	pT1c	78
6	72	18,20	7(3+4)	pT1c	78
7	74	8,60	7(3+4)	pT1c	78
10	77	126,80	9(4+5)	pT1c	78
11	64	6,70	6(3+3)	pT1c	78
12	75	9,91	9(4+5)	pT1c	78
13	77	8,48	7(3+4)	pT1c	78
15	76	9,00	8(4+4)	pT1c	78
16	76	4,90	8(4+4)	pT1c	78
17	75	1,27	7(3+4)	pT2	76
18	66	16,83	6(3+3)	pT1c	78
19	77	33,00	8(4+4)	pT1c	78

Tabelle 4: Probandentabelle

2.3 Materialgewinnung

Die Messung von humanem Serumalbumin erfolgte aus dem Blutplasma. Die Probanden wurden über die Blutabnahme aus der Vene nach der Deklaration von Helsinki und den Anforderungen der Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz aufgeklärt. (Aktuelles Votum 28-322 ex 15/16) Insgesamt wurden vier Blutabnahmen pro Proband durchgeführt. Um einen Ausgangs- bzw. Vergleichswert für den Redoxzustand des Albumins zu schaffen, wurde die erste Blutabnahme direkt vor der ersten Strahlenexposition der Patienten durchgeführt. Die zweite Blutabnahme erfolgte unmittelbar nach der ersten Strahlenexposition. Die Strahlungs-dosis zu diesem Zeitpunkt betrug 2 Gy. Die dritte Blutabnahme erfolgte unmittelbar vor der zweiten Applikation, was einer 24h Zeitspanne zur ersten Bestrahlung entspricht. Die vierte und letzte Blutabnahme erfolgte am Ende der Therapie nach der letzten Bestrahlungssitzung. Die Strahlendosis entsprach der geplanten Behandlungsgesamtdosis (72, 76 oder 78 Gy). Aufgrund der

betriebsfreien Wochenenden hatten zwei Probanden 24 h vor ihrem letzten Behandlungstermin keine Bestrahlung. Ihr letzter Termin fiel auf einen Montag. Dies ist bei den Albumin Messungen natürlich zu berücksichtigen.

Die Blutabnahme aus der Vene erfolgte mit dem Einmalblutentnahmesystem Vacuette® der Firma Greiner bio-one. Insgesamt wurden den Probanden ca. 28 mL Blut abgenommen. Zur Bestimmung des Redoxzustandes des Serumalbumins wurde bei jeder Abnahme ein 3 mL Blutröhrchen (Vacuette®, K3EDTA, Greiner bio-one) mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) verwendet. Zur Überprüfung der Ausschlusskriterien wurden bei der ersten und letzten Blutabnahme zusätzlich ein 8 mL Serumröhrchen (Vacuette® Röhrchen, 8 mL Z Serum Separator Gerinnungsaktivator, Greiner bio-one) abgenommen.

Um Reaktionen des Albumins nach Abnahme des Blutes zu verhindern/verzögern wurden die Proben bei 4-8 °C gekühlt und umgehend zum Institut für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz transportiert. Die Transportzeit betrug ca. 15-20 min. Die Aufbereitung und Konservierung der Proben erfolgte direkt nach dem Transport. Zuerst wurden die Proben mit 2500 U/min für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden die Überstände mit einer 500 µL Pipette zu drei (EDTA) bzw. fünf (Serum) gleichen Teilen in vorher beschriftete Eppendorfgefäße pipettiert. Diese wurden in Gefrierschränken bei -70 °C eingefroren. Bei einer Lagerung bei -70 °C können die Proben bis zu einem Jahr gelagert werden. Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass sich bei dieser Temperatur die hier zu messenden Eigenschaften nicht ändern. (Erfahrungen im Labor des Institutes für Physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz)

Die Routinelaboruntersuchungen der Blutproben wurden im Institut für physiologische Chemie der Medizinischen Universität Graz durchgeführt. Die Blutbilduntersuchung erfolgte mit dem Gerät SYSMEX® KX-21N. Die klinische Chemie wurde mithilfe eines Vollautomaten für klinische Chemie der Firma EUROLyser® bestimmt. CRP und HbA1c konnten mithilfe des Gerätes Eurolyser smart der Firma EUROLyser® ermittelt werden.

2.4 Methode

Die Messung des Redoxzustandes von humanem Serumalbumin erfolgte mittels HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) ca. zwei Wochen nach Konservierung der letzten Blutprobe. Bei der HPLC-Methode wird das Albumin anhand seiner Bindungen am Cystein-34 fraktioniert. Unterschieden wird dabei zwischen HMA, HNA1 und HNA2. Beim Ablauf dieser Methode wird das Protokoll von Era et al. (38) verwendet.

Die bei -70 °C gelagerten Proben werden aufgetaut und auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend werden 10 µL mit einer Pipette abgehoben und mit 990 µL Proben-Puffer (0,1 M Natriumphosphat, 0,3 M Natriumchlorid, pH 6,87) verdünnt. Diese Lösung wird durch einen Whatman 0,45 µm Nylonfilter (Bartelt Labor- & Datentechnik, Graz) filtriert. Im Anschluss erfolgt die maschinelle Weiterverarbeitung durch das HPLC-System.

Das verwendete HPLC-System besteht aus folgenden Komponenten: Merck-Hitachi L2130 Gradienten Pumpe (VWR, Vienna), Shimadzu SIL-20AC Auto-sampler, Shimadzu CTO Säulenofen (Shimadzu Austria, Vienna), Jasco 821-FP Fluoreszenz Detektor (Spectronex, Vienna).

20 µL des vorbereiteten Filtrates werden in das HPLC-System injiziert und mithilfe der mobilen Phase (50 mM Natriumacetat, 400 mM Natriumsulfat, pH 4,85) in einer Shodex Asahipak ES-502N 7C Anionenaustauschsäule (7,5 x 100 mm, Bartelt Labor- & Datentechnik, Graz) separiert. Für die Elution wird ein Ethanol Gradient von 0-6 % und eine Flussrate von 1 mL/min verwendet. Der Gradient wird in folgendes Schema eingeteilt (Laufmittel A = Phosphatpuffer, Laufmittel B = Phosphatpuffer + 10 % Ethanol):

0 min	Laufmittel A 100 %
5 min	Laufmittel A 100 %
25 min	Laufmittel A 40 % Laufmittel B 60 %
30 min	Laufmittel A 40 % Laufmittel B 60 %
35 min	Laufmittel A 100 %
40 min	Laufmittel A 100 %

Die Temperatur der Anionenaustauschsäule wird auf 35 °C geregelt. Die Detektion der Albumin Moleküle erfolgt nach dem Prinzip der Fluoreszenzchromatographie bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 340 nm.

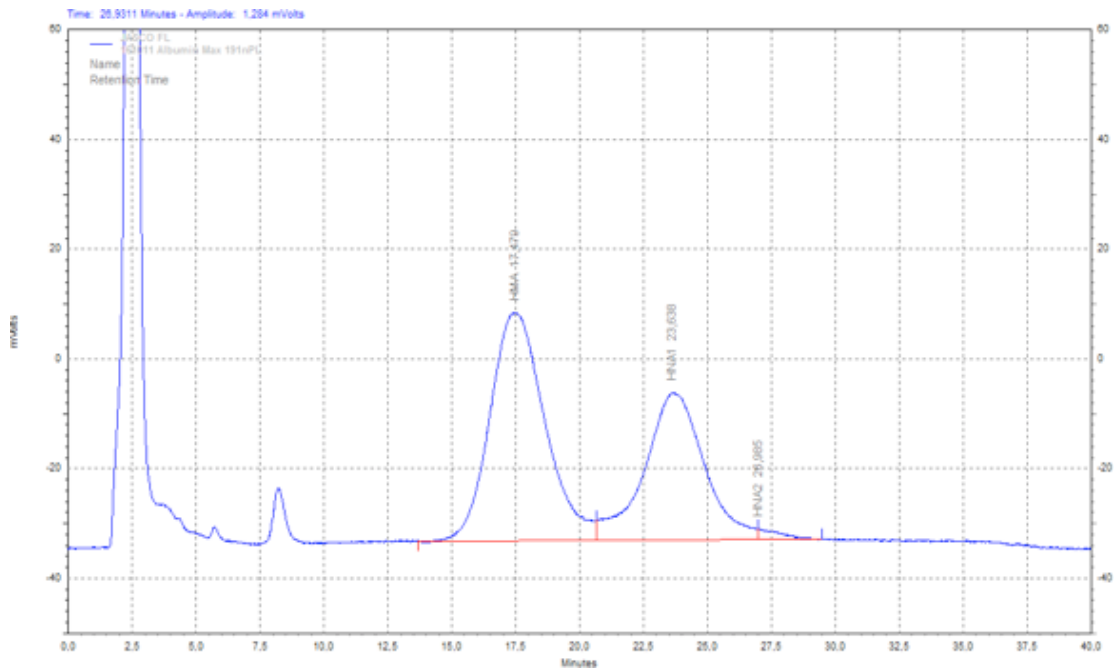


Abbildung 9: Chromatogramm nach einer HPLC am Beispiel des Proband 19

Die Quantifizierung des HMA, HNA1 und HNA2 erfolgte mithilfe der Software PeakFIT der Firma Systat Software Inc. ®, wobei Gauss'sche Glockenkurven in das Chromatogramm gefittet wurden und deren Flächen als Maß für die Konzentration der Fraktionen verwendet wurden.

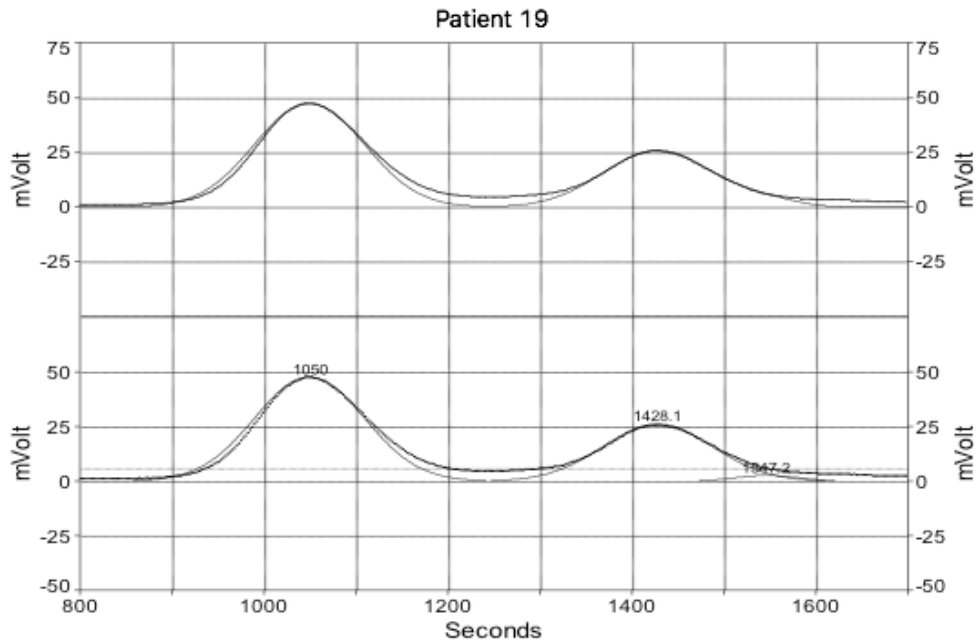


Abbildung 10: PeakFIT Ausschnitt: In drei Gauss'sche Glockenkurven gefittetes Chromatogramm am Beispiel von Proband 19 zum Zeitpunkt nach der letzten Bestrahlung

Zur weiteren Auswertung und Verwendung wurden die Flächen der HMA, HNA1 und HNA2 Kurven in prozentuelle Anteile umgerechnet.

$$HMA(\%) = \frac{HMA(Fläche)}{HMA(Fläche) + HNA1(Fläche) + HNA2(Fläche)}$$

2.5 Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit den Programmen IBM® SPSS Statistics 23 und Microsoft® Excel für Mac 2011 Version 14.7.1. Die gewonnenen Daten wurden in Linien-Diagrammen sowie in Boxplots aufbereitet.

Bei den Liniendiagrammen wurden die Messpunkte eingetragen und ein durch die Linien gekennzeichnete Verlauf eingezeichnet. Boxplots geben genaueren Aufschluss auf die Verteilung der Werte in einer Gruppe. Die Linie in der Box gibt den Median der Gruppe an. Der Anteil der Box oberhalb des Medianes gibt das obere Quantil an, der Anteil unterhalb des Medianes das untere Quartil. In dieser

Box sind 50 % der Daten enthalten. Die weiteren 50 % werden durch die Antennen dargestellt.

Als Methode zur statistischen Auswertung wurde die Repeated Measures ANOVA (Analysis of Variance) verwendet. Bei dieser Methode handelt es sich um eine Varianzanalyse, die für zusammenhängende Proben geeignet ist. Zur Signifikanzermittlung wurde das Signifikanzniveau α mit 0,05 festgelegt. Liegt der p-Wert unterhalb von 0,05 ist eine Signifikanz vorhanden und die H₀-Hypothese (keine Veränderung der Redoxzustände) muss verworfen werden. Ein p-Wert über 0,05 zeigt keine signifikante Änderung, wodurch die H₁-Hypothese (Veränderung der Redoxzustände) verworfen werden muss. Um die Repeated Measure ANOVA verwenden zu können, müssen die Daten auf Normalverteilung getestet werden. (39) Die Testung erfolgte mithilfe des Shapiro-Wilk-Testes. (40) Die Ergebnisse der Testung auf Normalverteilung wurden im Programm SPSS Statistics wiederum mit dem p-Wert bewertet. Das Signifikanzniveau wurde erneut mit einem α von 0,05 festgelegt.

3 Ergebnisse – Resultate

In diesem Teil der Arbeit werden nun die erhobenen Werte und deren statistische Auswertung präsentiert. Mithilfe dieser Daten wird geklärt, ob bei der Bestrahlungstherapie von Prostatakarzinom Patienten ein vermehrter oxidativer Stress vorherrscht. Die Auswertung erfolgte mittels Varianzanalyse und wurde für jede oxidative Form des Albumins durchgeführt. Es wird geklärt, ob sich HMA, HNA1 und HNA2 im Verlauf der Therapie verändern. Die folgenden Abbildungen zeigen die gemessenen Daten. Die Rohdaten befinden sich im Anhang.

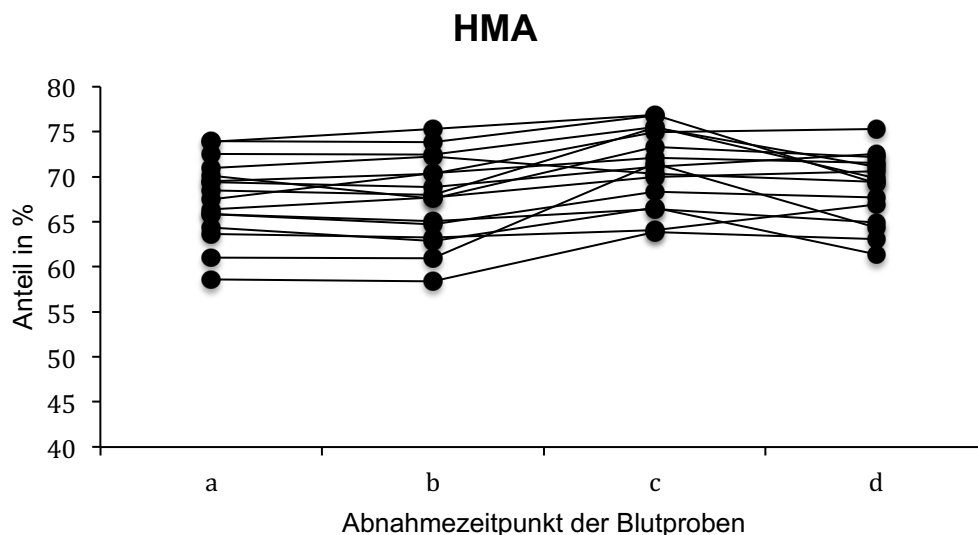


Abbildung 11: Verlauf des HMA. Die Graphen stellen die individuellen Verläufe der einzelnen Probanden dar, Zeitpunkte der Blutentnahmen: a. vor der ersten Bestrahlung, b. nach der ersten Bestrahlung, c. 24 h nach der ersten Bestrahlung, d. nach der letzten Bestrahlung

Die in Abbildung 11 eingetragenen Datenwerte entsprechen dem Prozentanteil des HMA zu dem gesamten im Blut gemessenen Albumin. Die Werte auf der Abszisse entsprechen den Zeitpunkten der Blutentnahmen, aus denen die Albumin-Konzentration gewonnen wurde. Die Zeitpunkte der Blutabnahmen wurden genau definiert und im vorigen Kapitel beschrieben. Tabelle 11 zeigt eine hohe Streuung und Breite der HMA Fraktionen. Die Kreuzungen der Linien lassen große individuelle Unterschiede in den Verläufen der HMA Konzentrationen erkennen.

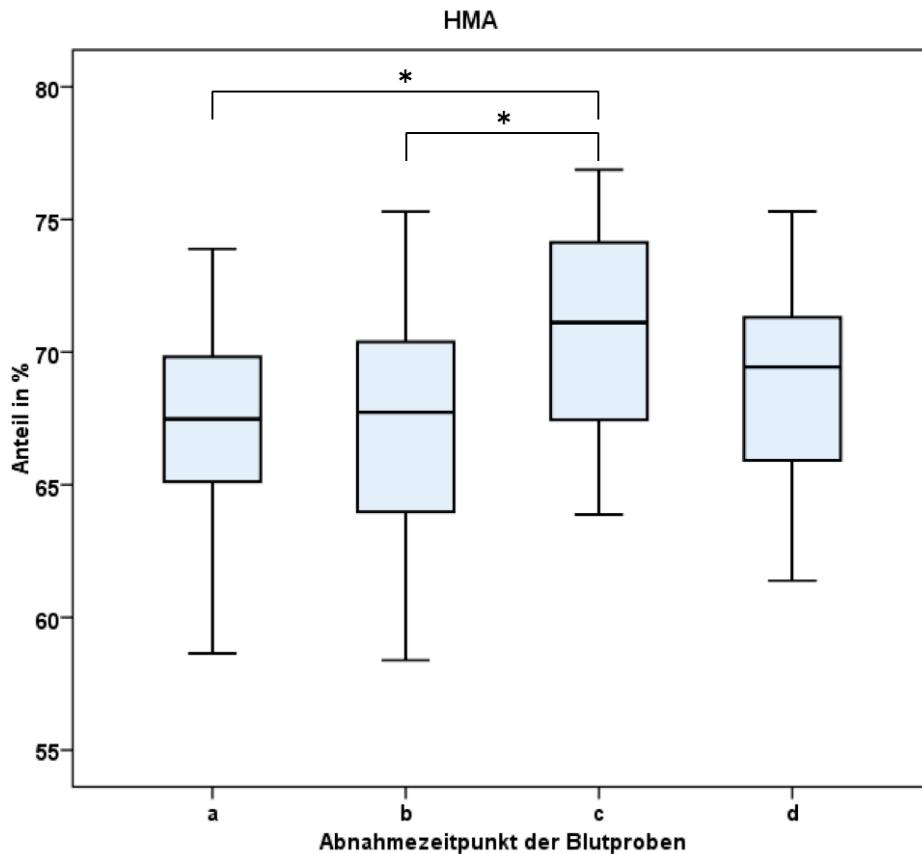


Abbildung 12: Boxplot des HMA Verlaufs, Zeitpunkte der Blutentnahme: a. vor der ersten Bestrahlung, b. nach der ersten Bestrahlung, c. 24 h nach der ersten Bestrahlung, d. nach der letzten Bestrahlung, * kennzeichnen die signifikanten Änderungen (genauere Beschreibung im Ergebnisteil)

In Abbildung 11 und Abbildung 12 wird der Verlauf von HMA über die Therapiedauer der Probanden dargestellt. In den beiden Diagrammen ist erkennbar, dass eine Änderung in der Höhe des HMA Anteils vorhanden ist. Konkret wird eine Erhöhung der HMA Fraktion beim Zeitpunkt der dritten Blutabnahme beobachtet. In Abbildung 12 markieren Sterne (*) einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Proben. Die genauere Auswertung der Daten ist im nächsten Kapitel beschrieben.

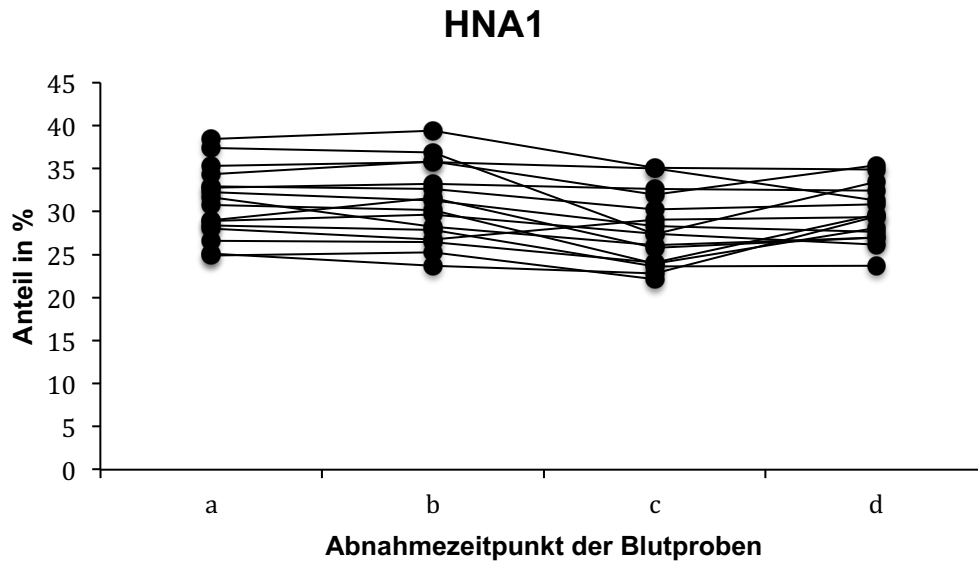


Abbildung 13: Verlauf des HNA1. Die Graphen stellen die individuellen Verläufe der einzelnen Probanden dar, Zeitpunkte der Blutentnahmen: a. vor der ersten Bestrahlung, b. nach der ersten Bestrahlung, c. 24 h nach der ersten Bestrahlung, d. nach der letzten Bestrahlung

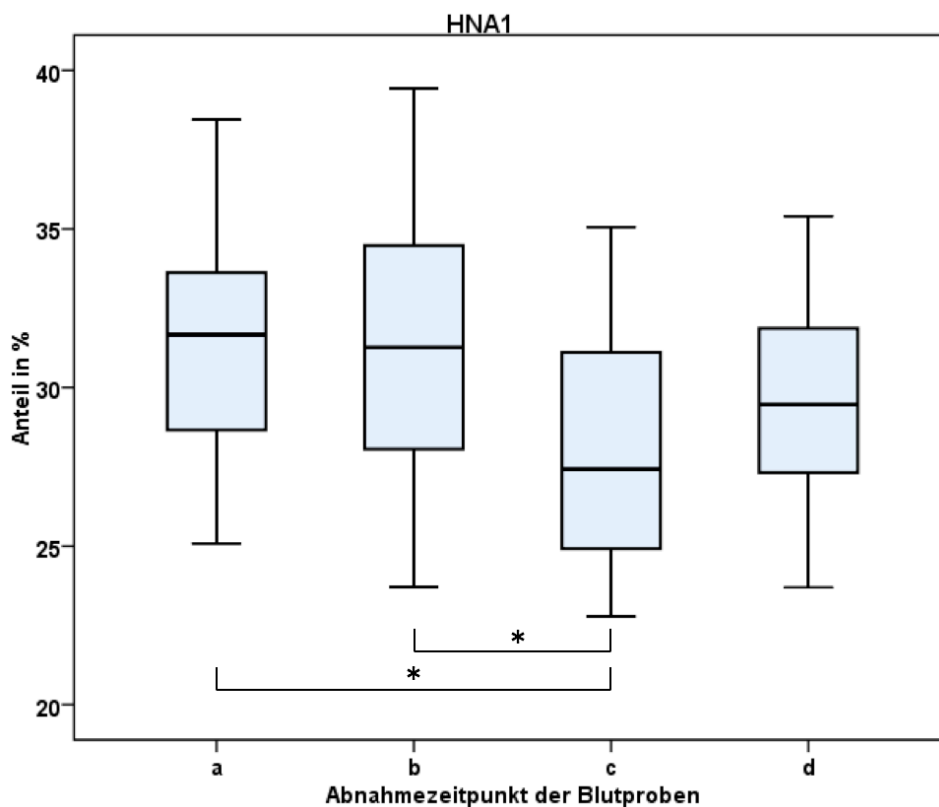


Abbildung 14: Boxplot des HNA1 Verlaufs, Zeitpunkte der Blutentnahme: a. vor der ersten Bestrahlung, b. nach der ersten Bestrahlung, c. 24 h nach der ersten Bestrahlung, d. nach der letzten Bestrahlung, * kennzeichnen die signifikante Änderungen (genauere Beschreibung im Ergebnisteil)

In Abbildung 13 zeigt sich, wie bei der HMA Fraktion, eine hohe Streuung der Werte. Wiederum lassen sich große individuelle Unterschiede in den Verläufen der HNA1 Werte erkennen. Der Verlauf des HNA1 zeigt entsprechend dem Verlauf der HMA Fraktion eine entgegengesetzte Verlaufsform. Zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme zeigen die Proben eine Verringerung der HNA1 Fraktion. Diese Daten sind ebenso in Abbildung 14 gut zu erkennen. Die Sterne (*) kennzeichnen wiederum vorhandene signifikante Unterschiede zwischen zwei Proben.

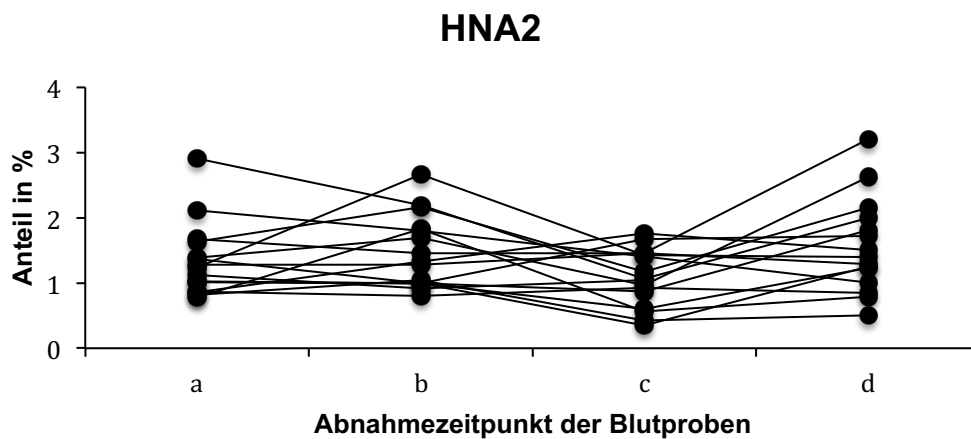


Abbildung 15: Verlauf des HNA2. Die Graphen stellen die individuellen Verläufe der einzelnen Probanden dar, Zeitpunkte der Blutentnahmen: a. vor der ersten Bestrahlung, b. nach der ersten Bestrahlung, c. 24 h nach der ersten Bestrahlung, d. nach der letzten Bestrahlung

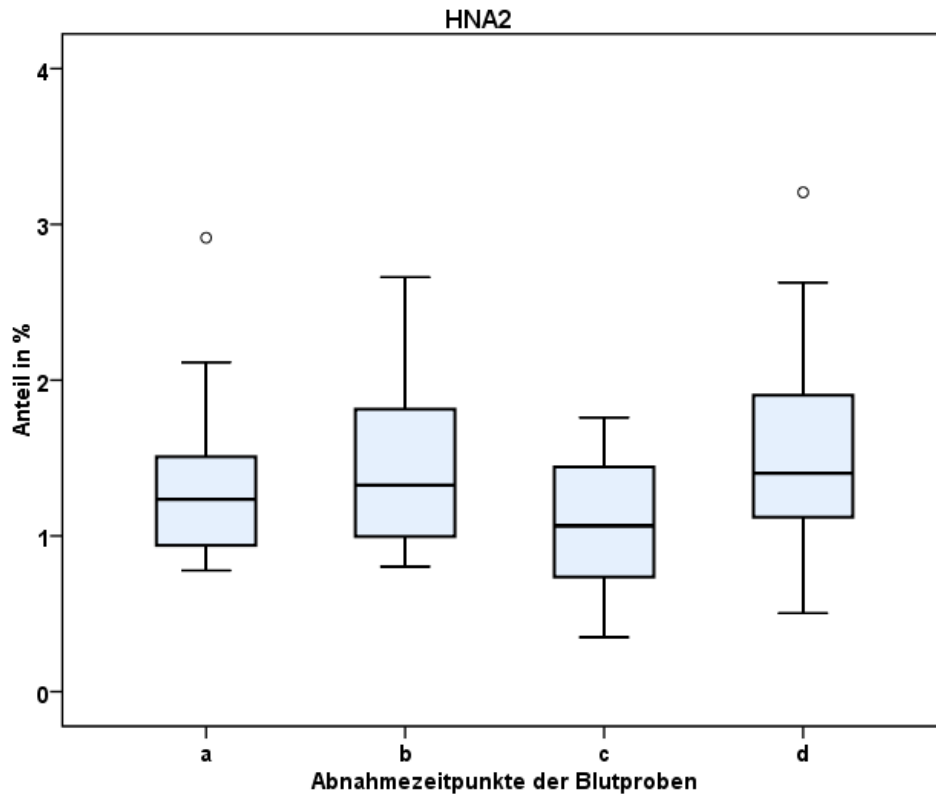


Abbildung 16: Boxplot des HNA2 Verlaufs, Zeitpunkte der Blutentnahmen: a. vor der ersten Bestrahlung, b. nach der ersten Bestrahlung, c. 24 h nach der ersten Bestrahlung, d. nach der letzten Bestrahlung

In Abbildung 15 und Abbildung 16 ist der Verlauf der HNA2 Fraktion zu sehen. Die relative Streubreite ist im Vergleich zu den anderen Fraktionen noch größer. Die einzelnen Punkte in Abbildung 16 bei den Abnahmezeitpunkten a. und d. symbolisieren Ausreißer. HNA2 zeigt keine signifikante Veränderung.

Durch die Redox-Vorgänge in den Albuminfraktionen beeinflussen sich die Albumin-Anteile gegenseitig. Somit resultiert beispielsweise durch eine erniedrigte HNA1 und HNA2 Fraktion ein erhöhter HMA Anteil und umgekehrt. Um die Signifikanz dieser Änderungen zu bestätigen, muss das mathematische Verfahren der Varianzanalyse durchgeführt werden. Mit ihr wird beurteilt, ob die beobachteten Änderungen einer Gesetzmäßigkeit folgen oder nur dem Zufall entsprechen. Bevor eine Varianzanalyse durchgeführt werden kann, wird der Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung der Daten durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Überprüfung von 12 Datensätzen (4 Abnahmezeitpunkte mit je 3

Albuminfraktionen). Der Shapiro-Wilk-Test wird mit der Software SPSS Statistics durchgeführt.

Albuminfraktion	vor 1.Bestrahlung	nach 1.Bestrahlung	24h nach 1.Bestrahlung	nach letzter Bestrahlung
HMA	0,965	0,991	0,518	0,817
HNA1	0,939	0,983	0,325	0,930
HNA2	0,010	0,134	0,482	0,583

Tabelle 5: p-Werte nach Shapiro-Wilk-Test der Albuminfraktionen

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der Testung auf Normalverteilung. In dieser Arbeit wurde der Shapiro-Wilk-Test zur Auswertung herangezogen. Das Signifikanzniveau α wurde mit 0,05 gewählt. Auffällig ist, dass ein Wert in der Tabelle unter das Signifikanzniveau fällt. Dabei handelt es sich um HNA2 zum Zeitpunkt vor der ersten Bestrahlung mit einem p-Wert von 0,010. Alle anderen Albuminfraktionen sind normalverteilt.

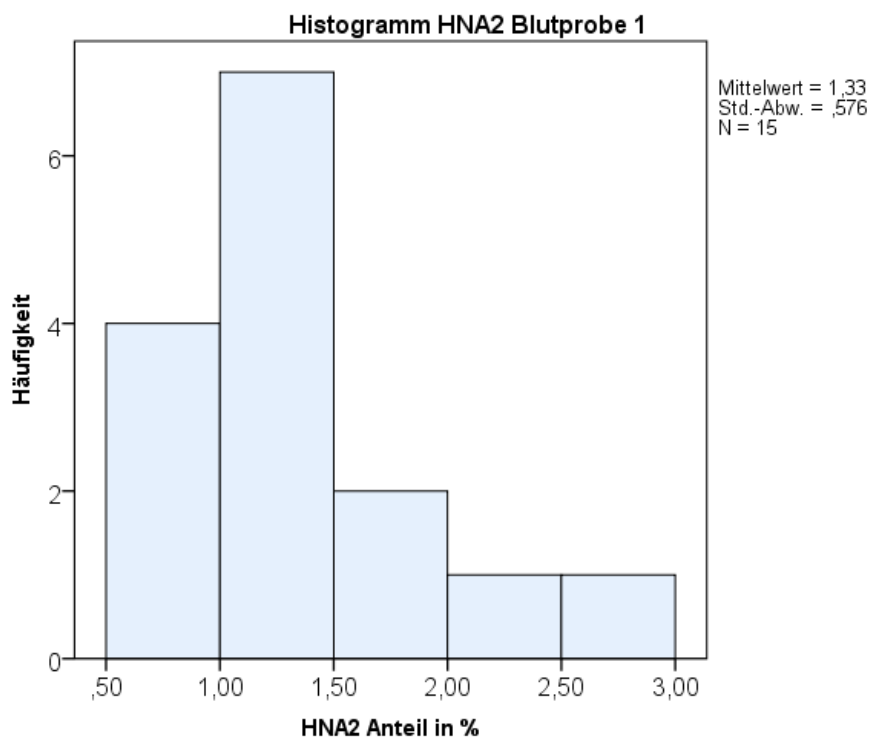


Abbildung 17: Histogramm des HNA2 vor der ersten Bestrahlung

Abbildung 17 zeigt das Histogramm der HNA2 Verteilung vor der ersten Bestrahlung. Deutlich erkennbar sind der ein-gipflige Anstieg und der anschließende Abfall der Werte. Der größere Anteil der HNA2 Werte findet sich im

Bereich von 0,5-1,5 %. Der geringe p-Wert von 0,010 der Verteilung lässt auf keine Normalverteilung schließen.

In dieser Studie wurde aufgrund einiger Faktoren trotzdem von einer Normalverteilung der HNA2 Daten (Zeitpunkt vor der ersten Bestrahlung) ausgegangen. Durch die kleinen Werte des HNA2 und der Schwierigkeit HNA2 im Programm Peakfit exakt zu integrieren, kommt es zu einer Unsicherheit bei der Analytik. Ebenso reagiert der Shapiro-Wilk Test sensibel auf Ausreißer, welche in dieser Datenmenge durchaus vorhanden sind. Weitere Gründe für die Annahme der Normalverteilung sind die ein-gipflige Form des Histogramms (Abbildung 17), sowie die Tatsache, dass alle anderen Datenmengen auch normalverteilt sind.

Durch die angenommene Normalverteilung der HNA2 Daten vor der ersten Bestrahlung und den Normalverteilungen der anderen Messdaten konnte die Repeated Measures ANOVA durchgeführt werden. Das Signifikanzniveau wurde mit 0,05 festgelegt.

Varianzanalyse mittels der Repeated Measures ANOVA

Die einfachste Form der Varianzanalyse ist der t-Test. Beim t-Test wird durch den Vergleich der Mittelwerte von abhängigen Variablen der Einfluss einer unabhängigen Variable getestet. In dieser Studie entspricht die unabhängige Variable der Zeit. Die Albuminfraktionen entsprechen den abhängigen Variablen. Mit dem t-Test können nur 2 Datenmengen getestet werden. Müssen mehrere Datensätze miteinander verglichen werden, benötigt man die ANOVA (Analysis of Variance). Die Repeated Measures ANOVA wird verwendet, da es sich um wiederholte Messungen an den gleichen Probanden handelt und die Proben somit nicht unabhängig sind. Zu beachten ist, dass die Repeated Measures ANOVA nur angibt, ob eine signifikante Änderung in den Datenverläufen aufgetreten ist. Um eine genaue Bestimmung des Zeitpunktes der signifikanten Änderung festzustellen, muss ein post-hoc Test durchgeführt werden. (39,41)

In den folgenden Analysen werden die Albuminfraktionen einzeln statistisch ausgewertet. Zuerst erfolgt die Auswertung der HMA Fraktion, anschließend die

der HNA1 Fraktion und zuletzt erfolgt die Auswertung der HNA2 Fraktion. Die Verläufe der einzelnen Albuminfraktionen werden mittels der Repeated Measures ANOVA ausgewertet und anschließend durch einen post-hoc Test analysiert.

Varianzanalyse der HMA Fraktion:

Die Repeated Measures ANOVA wurde für die HMA Fraktion durchgeführt. Das Ergebnis des Tests zeigt eine deutliche signifikante Änderung im Verlauf der Datenmengen. Mit $F(3,12)=6,68$ und einem $p\text{-Wert}=0,007$ ist eine deutliche signifikante Änderung im Verlauf der Albuminfraktionen ersichtlich. Somit muss die H1 Hypothese angenommen werden. Durch die post-hoc Analyse wird der genaue Zeitpunkt der Veränderung festgestellt.

Paarweise Vergleiche						
(I)Zeit	(J)Zeit	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig. ^b	95% Konfidenzintervall für die Differenz ^b	
					Untergrenze	Obergrenze
1	2	-,006	,355	1,000	-1,095	1,083
	3	-3,489*	,725	,002	-5,713	-1,265
	4	-1,471	1,399	1,000	-5,764	2,822
2	1	,006	,355	1,000	-1,083	1,095
	3	-3,483*	,777	,003	-5,866	-1,099
	4	-1,465	1,438	1,000	-5,879	2,950
3	1	3,489*	,725	,002	1,265	5,713
	2	3,483*	,777	,003	1,099	5,866
	4	2,018	1,456	1,000	-2,449	6,485
4	1	1,471	1,399	1,000	-2,822	5,764
	2	1,465	1,438	1,000	-2,950	5,879
	3	-2,018	1,456	1,000	-6,485	2,449

Basiert auf den geschätzten Randmitteln

*. Die mittlere Differenz ist auf dem ,05-Niveau signifikant.

b. Anpassung für Mehrfachvergleiche: Bonferroni.

Tabelle 6: Ergebnisse der paarweisen Vergleiche um den Zeitpunkt der HMA Änderung zu identifizieren.

Tabelle 6 zeigt die genaue Aufschlüsselung des post-hoc Testes. In dieser Aufschlüsselung werden die einzelnen Datenmengen paarweise miteinander verglichen. Die grau gekennzeichneten Werte zeigen die Veränderungen der HMA

Anteile. Beispielsweise in der ersten Zeile der Tabelle herrscht im Vergleich zwischen dem ersten und dritten Zeitpunkt der Blutentnahmen eine mittlere Differenz von -3,45 mit einem p-Wert von 0,002. Dies zeigt eine signifikante Änderung des HMA Levels. Die mittlere Differenz von -3,48 zwischen den Zeitpunkten vor der ersten und 24 h nach der ersten Bestrahlung ergibt einen Anstieg der HMA Fraktion nach 24 h nach der ersten Bestrahlung. Bei weiterer Betrachtung der Tabelle erkennt man, dass ausschließlich bei dem dritten Abnahmezeitpunkt eine signifikante Änderung des HMA Levels auftritt. Bei den anderen HMA Messungen zeigt sich in den Vergleichen keine signifikante Änderung.

Varianzanalyse der HNA1 Fraktion:

Die Ergebnisse der Repeated Measures ANOVA der HNA1 Fraktion zeigen ebenso signifikante Änderungen. Mit $F(3,12)=5,92$ und einem p-Wert=0,01 wird die H1 Hypothese angenommen. Die post-hoc Analyse gibt Aufschluss über den genauen Zeitpunkt der signifikanten Änderung.

Paarweise Vergleiche						
(I)Zeit	(J)Zeit	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig. ^b	95% Konfidenzintervall für die Differenz ^b	
					Untergrenze	Obergrenze
1	2	,157	,364	1,000	-,962	1,275
	3	3,232*	,718	,003	1,029	5,435
	4	1,696	,756	,250	-,625	4,016
2	1	-,157	,364	1,000	-1,275	,962
	3	3,075*	,725	,005	,849	5,302
	4	1,539	,819	,488	-,975	4,053
3	1	-3,232*	,718	,003	-5,435	-1,029
	2	-3,075*	,725	,005	-5,302	-,849
	4	-1,537	,775	,405	-3,915	,842
4	1	-1,696	,756	,250	-4,016	,625
	2	-1,539	,819	,488	-4,053	,975
	3	1,537	,775	,405	-,842	3,915

Basiert auf den geschätzten Randmitteln

*. Die mittlere Differenz ist auf dem ,05-Niveau signifikant.

b. Anpassung für Mehrfachvergleiche: Bonferroni.

Tabelle 7: Ergebnisse der paarweisen Vergleiche um den Zeitpunkt der HNA1 Änderung zu identifizieren.

Wie auch schon in Tabelle 6 wurden in Tabelle 7 die signifikanten Änderungen grau hinterlegt. Es ist wiederum eine Änderung des Albumins zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme zu beobachten. Die mittlere Differenz zwischen den Zeitpunkten vor und 24 h nach der ersten Bestrahlung mit einem Wert von 3,3 gibt darüber Aufschluss, dass es sich um eine Verringerung des HNA1 Anteils handelt. Vergleicht man die weiteren mittleren Differenzwerte wird sofort klar, dass nur zum Zeitpunkt der dritten Blutentnahme eine signifikante Verringerung des HNA1 Levels auftritt.

Varianzanalyse der HNA2 Fraktion:

Die Ergebnisse der Repeated Measures ANOVA ergeben keine signifikante Änderung im Verlauf der HNA2 Fraktion. $F(3,12)=3,36$ und $p\text{-Wert}=0,055$ zeigen keine signifikante Änderung an und somit muss die H_0 Hypothese angenommen werden. Die post-hoc Analyse wurde zur Kontrolle durchgeführt.

Paarweise Vergleiche

(I)Zeit	(J)Zeit	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Sig. ^a	95% Konfidenzintervall für die Differenz ^a	
					Untergrenze	Obergrenze
1	2	-,150	,142	1,000	-,587	,287
	3	,257	,157	,749	-,226	,740
	4	-,225	,200	1,000	-,838	,388
2	1	,150	,142	1,000	-,287	,587
	3	,407	,158	,133	-,079	,893
	4	-,074	,213	1,000	-,727	,578
3	1	-,257	,157	,749	-,740	,226
	2	-,407	,158	,133	-,893	,079
	4	-,481	,177	,101	-1,026	,063
4	1	,225	,200	1,000	-,388	,838
	2	,074	,213	1,000	-,578	,727
	3	,481	,177	,101	-,063	1,026

Basiert auf den geschätzten Randmitteln

a. Anpassung für Mehrfachvergleiche: Bonferroni.

Tabelle 8: Ergebnisse der paarweisen Vergleiche um den Zeitpunkt der HNA2 Änderung zu identifizieren.

Wie zu erwarten, zeigen die paarweisen Vergleiche keine signifikante Änderungen.

Um weitere Zusammenhänge aufzudecken wurden ausgewählte Laborwerte mit dem HMA der Probe vor der ersten Bestrahlung auf Korrelationen untersucht. Die Untersuchung erfolgte mit der Pearson Korrelation. Der Korrelationskoeffizient hat einen Bereich von -1 über 0 bis 1. Liegt der Koeffizient sehr nahe bei 0 ist keine Korrelation der beiden verglichenen Mengen vorhanden. Je weiter der Koeffizient Richtung 1 oder -1 kommt, handelt es sich um eine positive bzw. negative Korrelation der beiden verglichenen Mengen. (42)

Korrelationspartner		Korrelationskoeffizient nach Pearson	p-Wert
HMA (a)	Albumin (a)	0,12	0,69
	Gleason-Score	-0,15	0,59
	Alter der Probanden	-0,25	0,38
	GGT (a)	-0,04	0,88
	ALT (a)	0,31	0,26
	AST (a)	0,11	0,71
Differenz HMA (HMA (c)-HMA (b))	Albumin (a)	0,18	0,51

Tabelle 9: Auflistung der durchgeführten Korrelationsüberprüfungen. Abnahmezeitpunkt (a) vor der ersten Bestrahlung (b) nach der ersten Bestrahlung (c) 24 h nach der ersten Bestrahlung.

Die entsprechenden Grafiken zur Tabelle 9 sind im Bildanhang zu finden.

4 Interpretation und Diskussion

Die Ergebnisse der mathematischen Repeated Measures ANOVA zeigen, dass eine Änderung des Redoxzustandes von humanem Serumalbumin bei Bestrahlung der Prostata stattfindet. Konkret findet sich diese Änderung im Zeitraum zwischen der ersten Bestrahlung und 24 h nach der ersten Bestrahlung. Entgegengesetzt der Annahme, dass die Verschiebung in Richtung oxidierter Form stattfindet, zeigt sich eine Verschiebung in Richtung der reduzierten Form des Albumins. Die Fraktionen HMA, HNA1 und HNA2 ergeben das gesamte Albumin im Blutserum. Erfolgt eine Verschiebung in Richtung der reduzierteren Form HMA, müssen ein oder mehrere Anteile der anderen Fraktionen kleiner werden. In diesen Untersuchungen ist dieser Vorgang klar ersichtlich. Während bei der Messung der dritten Blutprobe im Vergleich zu den ersten zwei Proben das HMA Level um etwa 3,5 % gestiegen ist, ist das HNA1 Level der dritten Probe im Vergleich zu den vorigen Proben um etwa 3-3,2 % gesunken. Die Änderungen des HNA2 erfolgen im Rahmen der normalen Schwankungsbreite und stellen somit keine signifikante Veränderung dar.

Die erwartete Verschiebung des Redoxzustandes des Albumins in Richtung oxidierter Form ist nicht eingetreten. Die Reaktionen in Richtung reduzierten Zustand betreffen ausschließlich die HMA und die HNA1 Fraktion des Albumins. Die HNA2 Fraktion zeigt wie erwartet keine signifikante Änderung, weder eine Zu-, noch eine Abnahme. Um ein Albumin Molekül am Cystein-34 zu HNA2 zu oxidieren benötigt man starke Oxidationsmittel wie beispielsweise H_2O_2 . Gluthation und freies Cystein im Cytosol bzw. Blutplasma sind mit ihren freien Thiolgruppen aber auch geeignete Reaktionspartner für solche Oxidantien. Es ist möglich, dass durch diese beiden Moleküle (vor allem GSH im Cytosol) mit ihren freien Thiolgruppen diese starken Oxidationsmittel abgefangen, bevor sie in direkten Kontakt mit der Thiolgruppe des Cystein-34 des Albumins kommen. Außerdem muss erwähnt werden, dass in dieser Studie die Oxidation des Albumins ausschließlich am Cystein-34 des Moleküls betrachtet wird. Es könnte durchaus möglich sein, dass starke Oxidationsmittel wie H_2O_2 durch ihre hohe Reaktivität an einer anderen Stelle wie dem Cystein-34 des Albumins angreifen. Diese Veränderungen werden in dieser Studie aber nicht erfasst. Die HNA2 Fraktion ist durch ihre geringe Menge schwer zu quantifizieren. Hätte es jedoch

eine geringe Verschiebung des Redoxzustandes in Richtung HNA2 gegeben, wäre diese ersichtlich gewesen, da eine Umsetzung von 2-3 % des Albumins zu HNA2 eine Verdoppelung der HNA2 Fraktion bedeutet hätte. Bei der Reaktion von Cystein bzw. Glutathion mit H_2O_2 entstehen Cystin bzw. Glutathion-Disulfid (GSSG). Diese Disulfide führen in einer Reaktion mit HMA zur Bildung von HNA1. Beim Auftreten reaktiver Spezies durch die Bestrahlung und anschließender Reaktion mit GSH oder Cystein wäre eine Erhöhung der HNA1-Fraktion zu erwarten gewesen. Auch das ist nicht eingetreten, sondern umgekehrt, eine Verringerung von HNA1 und eine Erhöhung von HMA waren messbar.

Wodurch wird nun diese Verschiebung in Richtung reduzierter Form des Albumins verursacht? Eine mögliche Erklärung wäre das Auftreten einer Hämolyse durch die Bestrahlung. Die Erythrozyten des menschlichen Körpers beinhalten eine hohe Konzentration von Glutathion in ihrem Zytosol. Durch die Bestrahlung des Prostatakarzinoms werden die im Strahlungsgebiet lokalisierten Erythrozyten ionisierender Strahlung ausgesetzt. Durch die Bestrahlung könnte es zur Zerstörung dieser Erythrozyten kommen wodurch es zur Ausschüttung des Glutathion ins Blutplasma kommen würde. Das GSH fungiert als Reduktionsmittel, wodurch es zu einer Verschiebung des Redoxstatus des Albumins in Richtung reduzierter Form kommen könnte. In einer laufenden Studie wurde am Institut für Physiologische Chemie an der Medizinischen Universität Graz die Hämolyse von Vollblut durch ionisierende Strahlung untersucht. Vollblut wurde mit einer höheren Bestrahlungsdosis als in dieser Studie bestrahlt. Es konnte keine Hämolyse und keine Änderung des Redoxstatus von Albumin nachgewiesen werden, wodurch diese Hypothese verworfen werden kann. (mündlich übermittelt von Prof. Dr. Karl Öttl)

Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine kompensatorische bzw. überschießende kompensatorische Reaktion des Körpers. Der Körper wird auf Grund der ionisierenden Strahlung oxidativen Stress ausgesetzt. Die Messzeitpunkte des Albumins sind mit 4 Zeitpunkten während der gesamten Behandlung der Probanden sehr grob gewählt (ein Nachteil dieser Studie, der sich aber aus der Verfügbarkeit der Patienten ergab). Nach der ersten Bestrahlung erfolgt direkt im Anschluss und 24 h später eine Messung des Albumins. Es ist

bekannt, dass die Bildung von Radikalen durch die Bestrahlung im Zeitraum von Mikrosekunden nach Strahlenexposition erfolgt. Die biochemischen Veränderungen von Molekülen durch die gebildeten Sauerstoffradikale erfolgt im Sekunden bis Minutenbereich. (43) Möglicherweise ist das Ausmaß dieser oxidativen Prozesse aber erst einige Stunden nach der Bestrahlung messbar und kann mit den verwendeten Messzeitpunkten nicht erfasst werden. Der Körper hätte im Anschluss zu diesen oxidativen Prozessen einige Stunden Zeit um auf diesen Stress zu reagieren und gegenregulatorische bis hin zu überschießende gegenregulatorische Maßnahmen einzuleiten, wie z.B. in Form erhöhter Synthese von GSH. Die Messung 24 h nach der ersten Bestrahlung könnte Ausdruck einer solchen überschießenden Gegenregulation des Körpers sein. Sollte diese Theorie zutreffen, stellt sich die Frage, warum die letzte Messung am Ende der Therapie keinerlei signifikante Änderung zu den anderen Messungen aufweist. Diese letzte Messung sollte ebenso wie die dritte Messung aufgrund der 24 h zuvor erfolgten Bestrahlung eine überschießende Kompensation mit erhöhten HMA Anteil und dadurch einen signifikanten Unterschied zur 2. Messung aufweisen, was nicht der Fall war. Ein möglicher Grund dafür wäre, dass nicht bei allen Probanden eine Bestrahlung 24 h vor der letzten Messung durchgeführt worden war. Zwei von 15 Probanden bekamen ihre letzte Bestrahlungsdosis an einem Montag wodurch die vorletzte Bestrahlung am Freitag (72 h) davor durchgeführt wurde. Beim Betrachten der Rohdaten dieser Probanden zeigten sich jedoch keine auffälligen Abweichungen zu den anderen Probanden. Trotzdem könnten diese beiden Probanden der Grund für die ausbleibende signifikante Änderung in der letzten Messung sein. Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der ausbleibenden signifikanten Änderung in der letzten Messung des Albumins könnte eine langfristige Adaptation des Körpers an die Bestrahlungstherapie sein was die Hypothese der Kompensation unterstützen würde.

Bei den genannten Erklärungen handelt es sich um Hypothesen die aufgrund der Datenlage nicht beweisbar sind. Ziel dieser Studie war es, zu erörtern, ob überhaupt Änderungen in dem Redoxzustand des Albumins auftreten. Es konnten Änderungen nachgewiesen werden jedoch kann die Ursache für diese Änderungen mit den vier Messzeitpunkten nicht geklärt werden. Durch eine höhere Messfrequenz hätte der genaue Verlauf der Änderungen aufgezeichnet

werden können. Möglicherweise hätte man dann zunächst eine Verschiebung in Richtung HNA1 festgestellt, die nach 24 h überkompensiert wurde. Diese Studie soll daher als Basis für weitere *in vivo* Untersuchungen von Zusammenhängen zwischen ionisierenden Strahlen und dem Redoxzustand des Albumins dienen. Bei folgenden Studien kann die hier gewonnene Erkenntnis verwendet werden, um den genauen Zeitverlauf und die genauen Ursachen dieser Änderungen zu erforschen.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Guder WG, Nolte J. Das Laborbuch. 2. Auflage ed. München: Urban & Fischer Verlag; 2008. p. 589 ff.
- (2) Heinrich PC, Müller M, Graeve L. Plasmaproteine. Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage ed.: Springer-Verlag; 2014. p. 858-861.
- (3) Lothar T. Albumin. In: Lothar Thomas, editor. Labor und Diagnose. 8. Auflage ed.: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH; 2012. p. 1203 ff.
- (4) Lothar T. Pathophysiologie. In: Lothar T, editor. Labor und Diagnose. 8. Auflage ed.: TH-Books Verlagsgesellschaft mbH; 2012. p. 1205.
- (5) Peters TJ. The Albumin Molecule" Its Structure and Chemical Properties All about Albumin Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. 1. Auflage ed. New York: Academic Press; 1996. p. 9-54.
- (6) Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Serum Albumin. 1988;8. Auflage(Hepatology):385-401.
- (7) Smith MEB, Caspersen MB, Robinson E, et al. A platform for efficient, thiol-stable conjugation to albumin's native single accessible cysteine. Org Biomol Chem 2015 2015(13):7946-7949.
- (8) Löffler G. Aminosäuren. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. 6. Auflage ed.: Springer Medizin Verlag Heidelberg; 2005. p. 22-30.
- (9) Wachter H, Hausen A, Reibnegger G. Aminosäuren, Peptide und Proteine. Chemie für Mediziner. 8. Auflage ed. Berlin: Walter de Gruyter; 2002. p. 395-404.
- (10) Löffler G. Der oxidative Stress. Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. 6. Auflage ed. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; 2005. p. 287-292.
- (11) Horn F. Gluthation - Notarzt der Erythrozyten. Biochemie des Menschen Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 4. Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2005. p. 489-491.
- (12) Oettl K, Marsche G. Redox State of Human Serum Albumin in Terms of Cysteine-34 in Health and Disease Methods in Enzymology 2010;474(Part B):181-195.
- (13) Oettl K, Birner-Gruenberger R, Spindelböck W, Stueger HP, Dorn L, Stadlbauer V, et al. Oxidative albumin damage in chronic liver failure: Relation to albumin binding capacity, liver dysfunction and survival Journal of Hepatology 2013 2012;59(5):978-983.
- (14) Wachter H, Hausen A, Reibnegger G. Oxidation und Reduktion. Chemie für Mediziner. 8. Auflage ed. Berlin: Walter de Gruyter; 2002. p. 140-158.

- (15) Wachter H, Hausen A, Reibnegger G. Organische Schwefelverbindungen. Chemie für Mediziner. 8.Auflage ed. Berlin: Walter de Gruyter; 2002. p. 344-346.
- (16) Wachter H, Hausen A, Reibnegger G. Die Peptidbindung. Chemie für Mediziner. 8.Auflage ed. Berlin: Walter de Gruyter; 2002. p. 403-404.
- (17) van Bergen L, Roos G, De Proft F. From Thiol to Sulfonic Acid: Modeling the Oxidation Pathway of Protein Thiols by Hydrogen Peroxide. J Phys Chem A 2014;31(118):6078-6084.
- (18) Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H. Prostata. In: Denk H, Böcker W, Heitz PU, Moch H, editors. Pathologie. 4. Auflage ed. München: Urban & Fischer; 2008. p. 918-924.
- (19) Lüllmann-Rauch R. Prostata. In: Lüllmann-Rauch R, editor. Taschenlehrbuch Histologie. 3.Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2009. p. 482-483.
- (20) Hartmann M, Pabst MA, Schmied R, Caluba H-, Dohr G. Prostata. In: Hartmann M, Pabst MA, Schmied R, Caluba H-, Dohr G, editors. Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie. 2. korr. Auflage ed. Graz: facultas; 2003. p. 85-85.
- (21) Sauer R. Prostatakarzinom. In: Sauer R, editor. Strahlentherapie und Onkologie. 5., völlig überarbeitete Auflage ed.: Urban & Fischer; 2012. p. 376-382.
- (22) Epstein J, I., Egevad L, Amin M, B., Delahunt B, Srigley J, R. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. Am J Surg Pathol 2016;40(2):244-252.
- (23) Epstein J, I, Allsbrook W, C., Amin M, B., Egevad L, L. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. Am J Surg Pathol 2005;29:1228-1242.
- (24) Yiallourous M. Klassifikation des Krankheitsstadiums. 2014; Available at: <https://www.krebsgesellschaft.de/onko-internetportal/basis-informationen-krebs/krebsarten/prostatakrebs/klassifikation-des-krankheitsstadiums.html>. Accessed 17.01.2017, 2017.
- (25) Sauer R. Stellung der Radioonkologie in der Tumorbehandlung. In: Sauer R, editor. Strahlentherapie und Onkologie. 5., völlig überarbeitete Auflage ed. München: Urban & Fischer; 2012. p. 8-9.
- (26) Sauer R. Strahlenarten. In: Sauer R, editor. Strahlentherapie und Onkologie. 5., völlig überarbeitete Auflage ed. München: Urban & Fischer; 2012. p. 81-83.
- (27) Wannemacher M, Wenz F, Debus J. Physikalische Grundlagen. In: Wannemacher M, Wenz F, Debus J, editors. Strahlentherapie. 2.Auflage ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2013. p. 12-20.

- (28) LKH-Univ. Klinikum Graz. Linearbeschleuniger. 2012; Available at: <http://strahlentherapie.uniklinikumgraz.at/Patientenbetreuung/Ambulanzen/Teletherapie/Linearbeschleuniger/Seiten/default.aspx>. Accessed 19.01.2017, 2017.
- (29) Sauer R. Beschleuniger. In: Sauer R, editor. Strahlentherapie und Onkologie. 5., völlig überarbeitete Auflage ed. München: Urban & Fischer; 2012. p. 185-193.
- (30) Wannemacher M, Debus J, Wenz F. Allgemeine Grundlagen. In: M. W, J. D, F. W, editors. Strahlentherapie. 1.Auflage ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2006. p. 3-9.
- (31) Sauer R. Die Zelle. In: Sauer R, editor. Strahlentherapie und Onkologie. 5., völlig überarbeitete Auflage ed. München: Urban & Fischer; 2012. p. 103-109.
- (32) Sauer R. Wechselwirkung von Strahlung mit Materie. In: Sauer R, editor. Strahlentherapie und Onkologie. 5., völlig überarbeitete Auflage ed. München: Urban & Fischer; 2012. p. 83-88.
- (33) Sauer R. Strahlenchemie. In: Sauer R, editor. Strahlentherapie und Onkologie. 5., völlig überarbeitete Auflage ed. München: Urban & Fischer; 2012. p. 109-111.
- (34) Sauer R. Strahlenbiochemie. In: Sauer R, editor. Strahlentherapie und Onkologie. 5., völlig überarbeitete Auflage ed. München: Urban & Fischer; 2012. p. 111-115.
- (35) LKH-Univ. Klinikum Graz. Goldmarker-Implantation. 2012; Available at: <http://strahlentherapie.uniklinikumgraz.at/Patientenbetreuung/Ambulanzen/Teletherapie/Linearbeschleuniger/Seiten/Goldmarker.aspx>. Accessed 25.01.2017, 2017.
- (36) Sauer R. Bestrahlungsplanung. In: Sauer R, editor. Strahlentherapie und Onkologie. 5., völlig überarbeitete Auflage ed. München: Urban & Fischer; 2012. p. 213-267.
- (37) Seibt W. Dosimetrie. In: Seibt W, editor. Physik für Mediziner. 5., unveränderte Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2003. p. 420-423.
- (38) Era S, Hamguchi T, Sogami M, Kuwata K, Suzuki E, Miura K, et al. Further studies on the resolution of human serum mercapto- and nonmercaptoalbumin and on human serum albumin in the elderly by high-performance liquid chromatographie Int J Prptide Protein Res 1988 04.11.1987(31):435-442.
- (39) Lund A, Lund M. Repeated Measures ANOVA. 2013; Available at: <https://statistics.laerd.com/statistical-guides/repeated-measures-anova-statistical-guide.php>. Accessed 10.02., 2017.
- (40) Shapiro SS, Wilk MB. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). Biometrika 1965;3/4(52):591-611.

(41) Lund A, Lund M. Dependent t-test for paired samples. 2013; Available at: <https://statistics.laerd.com/statistical-guides/dependent-t-test-statistical-guide-3.php>. Accessed 17.02, 2017.

(42) Schwarz J, Bruderer Enzler H. Korrelation nach Bravais-Pearson. 2016; Available at: <http://www.methodenberatung.uzh.ch/de/datenanalyse/zusammenhaenge/korrelation.html>. Accessed 07.03.2017, 2017.

(43) Kauffmann GW, Moser E, Sauer R. Strahlenchemie. Radiologie. 3., völlig überarbeitete Auflage ed. München: Elsevier Urban & Fischer; 2006. p. 37-39.

6 Anhang

6.1 Bildanhang

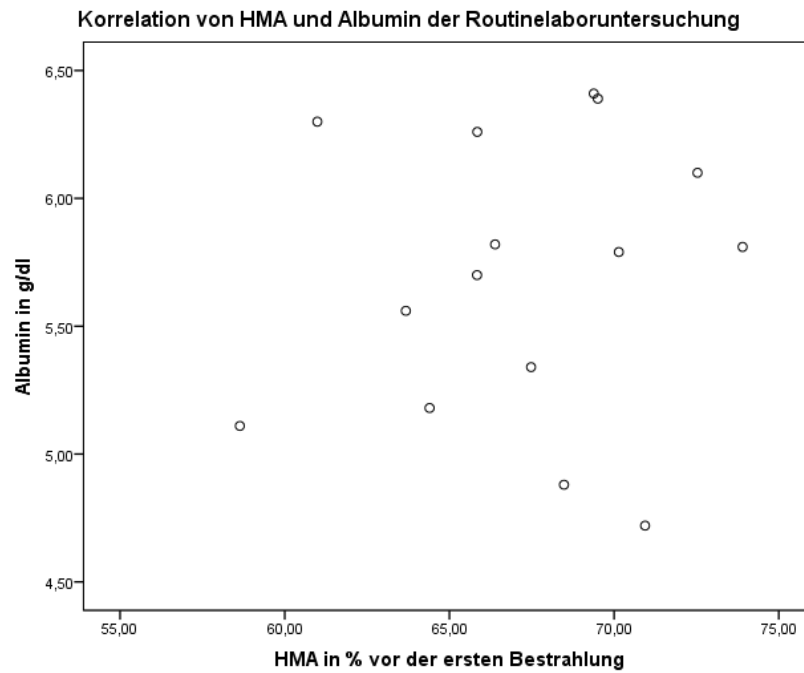


Abbildung 18: Die HMA Konzentration vor der ersten Bestrahlung korreliert mit dem Albumin der Laboruntersuchung mit einem Koeffizienten von 0,12 mit einer p-Wert von 0,69.

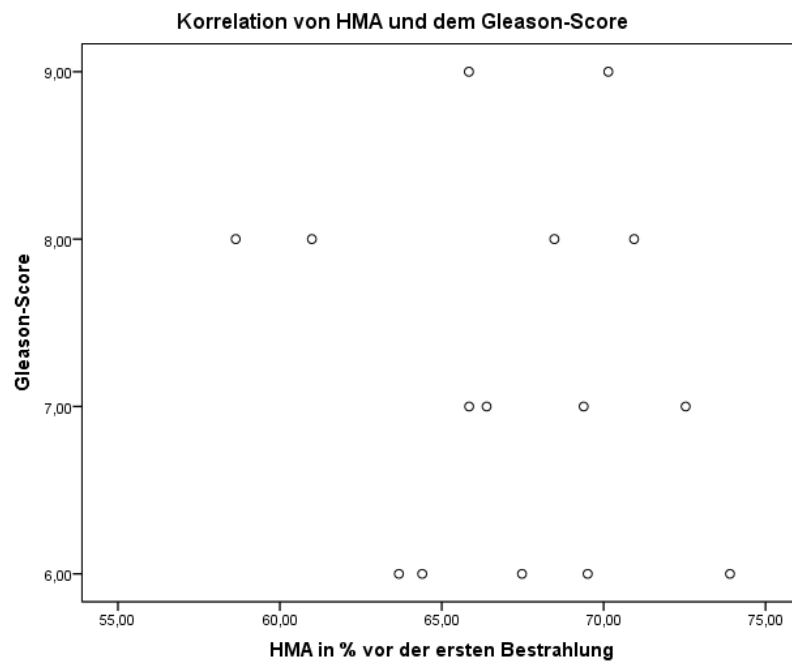


Abbildung 19: Die HMA Konzentration der ersten Bestrahlung korreliert mit dem Gleason-Score mit einem Koeffizienten von -0,15 und einem p-Wert von 0,59.

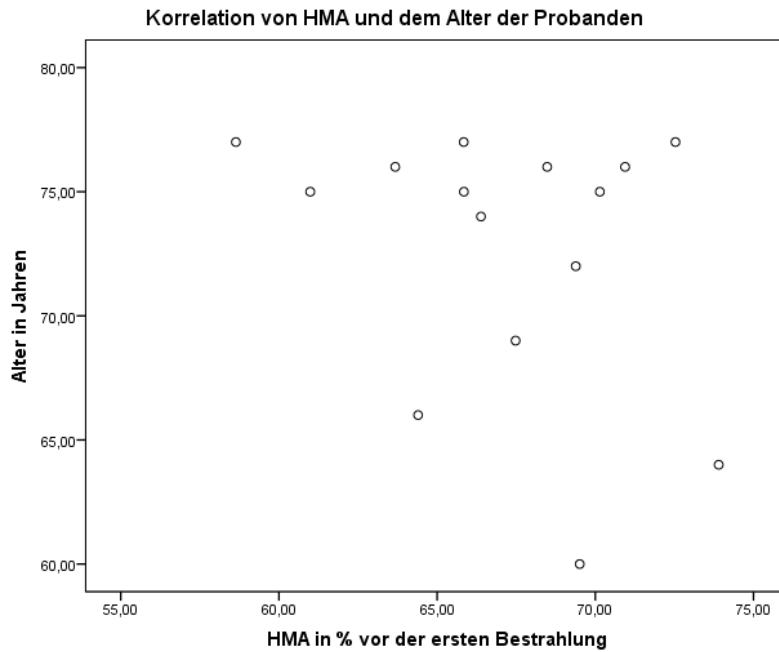


Abbildung 20: Die HMA Konzentration der ersten Bestrahlung korreliert mit dem Alter der Probanden mit einem Koeffizienten von -0,25 und einem p-Wert von 0,38.

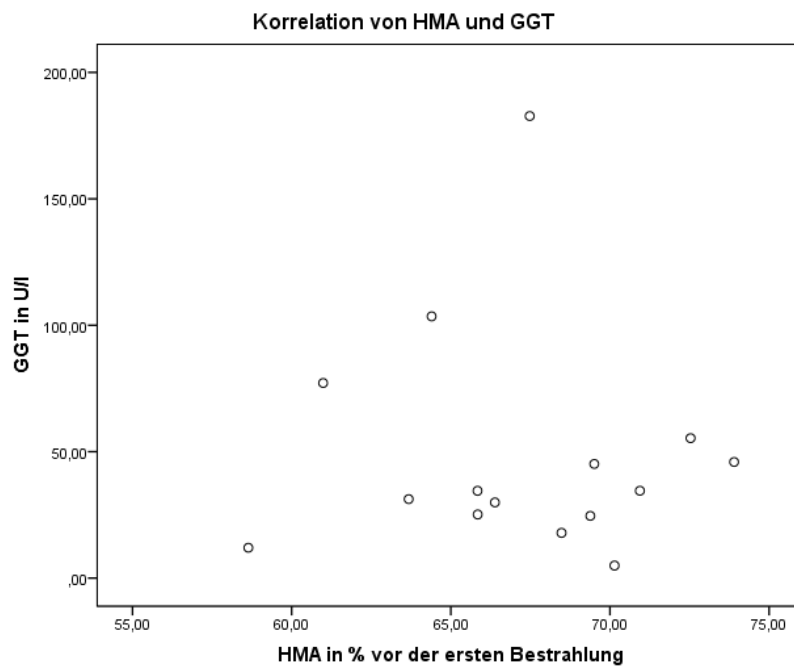


Abbildung 21: Die HMA Konzentration der ersten Bestrahlung korreliert mit dem GGT der Probanden mit einem Koeffizienten von -0,04 und einem p-Wert von 0,88.

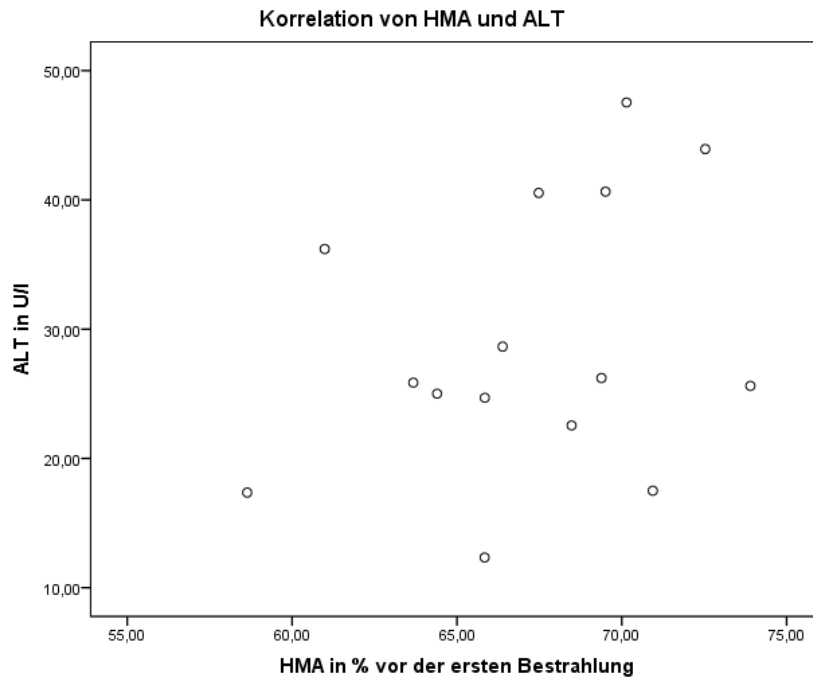


Abbildung 22: Die HMA Konzentration der ersten Bestrahlung korreliert mit dem ALT der Probanden mit einem Koeffizienten von 0,31 und einem p-Wert von 0,26.

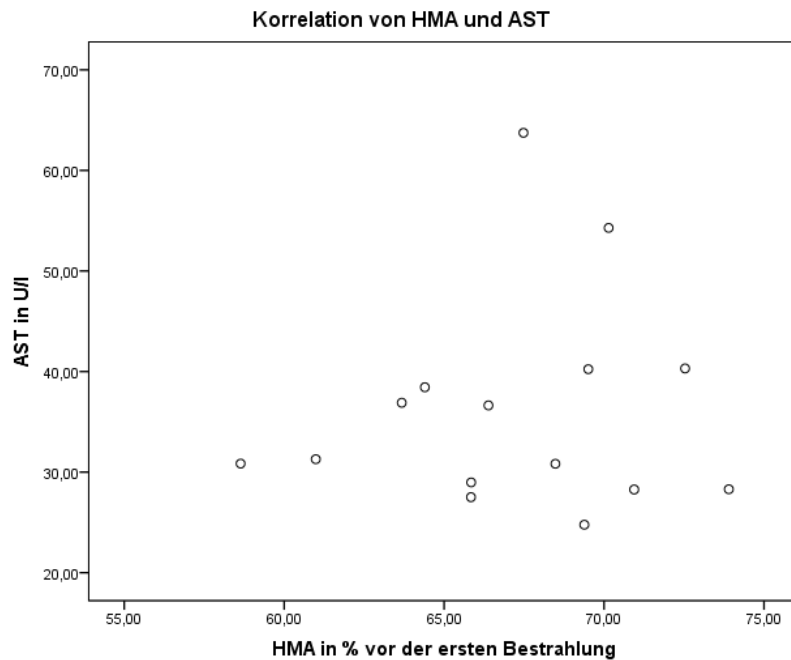


Abbildung 23: Die HMA Konzentration der ersten Bestrahlung korreliert mit dem AST der Probanden mit einem Koeffizienten von 0,11 und einem p-Wert von 0,71.

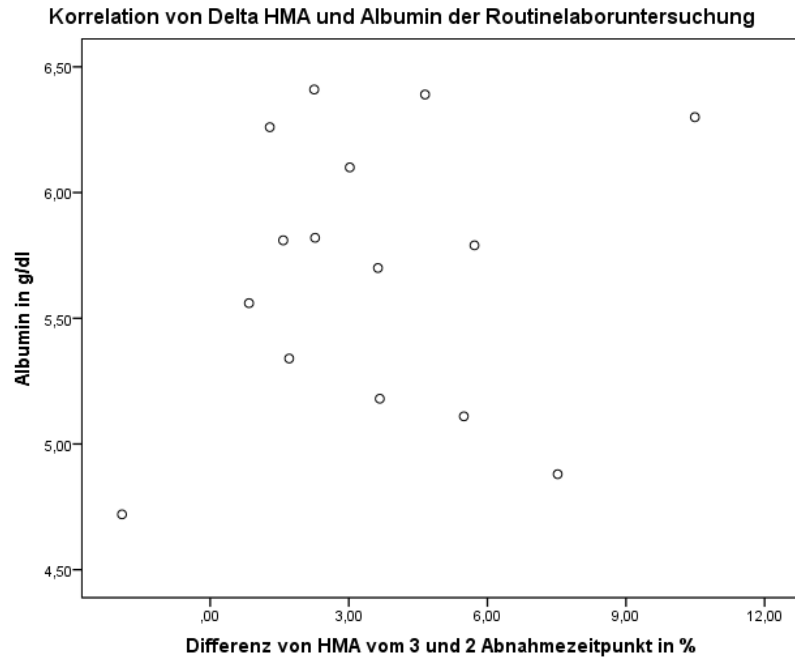


Abbildung 24: Die HMA Konzentrationsdifferenz zwischen der Probe nach der ersten und 24 h nach der ersten Bestrahlung korreliert mit dem Albumin (abgenommen vor der Bestrahlungstherapie) der Probanden mit einem Koeffizienten von 0,18 und einem p-Wert von 0,51.

6.2 Patientenrohdaten

Gemessene Albuminfraktionen der einzelnen Probanden in %-Anteilen

	HMA ^(a)	HNA1 ^(a)	HNA2 ^(a)	HMA ^(b)	HNA1 ^(b)	HNA2 ^(b)	HMA ^(c)	HNA1 ^(c)	HNA2 ^(c)	HMA ^(d)	HNA1 ^(d)	HNA2 ^(d)
Proband 1	69,51	28,38	2,12	70,33	27,87	1,80	74,98	23,62	1,40	75,30	23,69	1,01
Proband 2	63,68	35,29	1,03	63,26	35,75	,99	64,10	35,03	,87	66,91	31,28	1,81
Proband 4	67,48	31,66	,86	70,43	28,24	1,33	72,14	26,10	1,76	71,53	26,97	1,50
Proband 5	60,99	37,38	1,63	60,95	36,89	2,16	71,44	27,39	1,17	64,35	33,50	2,15
Proband 6	69,38	28,95	1,67	68,86	29,69	1,46	71,11	27,42	1,46	72,55	26,17	1,29
Proband 7	66,39	32,25	1,37	67,74	31,27	1,00	70,01	28,31	1,68	70,63	27,64	1,73
Proband 10	65,84	32,93	1,23	64,70	32,64	2,66	68,33	30,24	1,43	63,10	30,87	1,40
Proband 11	73,90	25,09	1,01	75,29	23,72	,99	76,87	22,78	,35	61,39	29,47	1,26
Proband 12	70,14	28,99	,87	67,57	31,63	,80	73,29	25,78	,93	64,93	26,99	,84
Proband 13	72,53	26,65	,82	72,50	26,45	1,05	75,52	24,06	,42	71,10	29,69	,50
Proband 15	70,94	28,04	1,02	72,27	26,74	1,00	70,36	29,04	,60	69,44	29,33	1,23
Proband 16	68,48	30,74	,78	67,96	30,21	1,83	75,48	23,95	,56	69,80	28,11	,79
Proband 17	65,85	32,77	1,39	65,11	33,20	1,69	66,40	32,64	,96	72,16	32,45	2,63
Proband 18	64,40	34,33	1,28	62,89	35,83	1,28	66,56	31,98	1,46	69,28	35,40	3,21
Proband 19	58,64	38,45	2,91	58,38	39,42	2,20	63,87	35,06	1,06	67,72	34,90	2,00

Tabelle 10: Rohdaten der gemessenen Albuminfraktionen in Prozentanteilen zum gesamten Serumalbumin. Abnahmezeitpunkte: (a) vor der ersten Bestrahlung (b) nach der ersten Bestrahlung (c) 24 h nach der ersten Bestrahlung (d) nach der letzten Bestrahlung

Routinelaborparameter der Probanden vor der ersten Bestrahlung (1/2)

	GGT₁₎	AST₁₎	ALT₁₎	Total Protein₂₎	UA₃₎	Urea UV₃₎	Albumin₂₎	Bilirubin₃₎	Glucose₃₎	Creatinin₃₎
Proband 1	45,15	40,24	40,64	7,09	5,91	78,06	6,39	0,70	91,12	1,33
Proband 2	31,24	36,90	25,86	6,68	5,22	73,50	5,56	1,84	100,26	1,50
Proband 4	182,73	63,74	40,54	7,54	11,61	79,62	5,34	1,59	98,50	1,49
Proband 5	77,16	41,15	36,20	7,74	6,20	52,39	6,30	1,02	94,13	1,30
Proband 6	24,59	24,77	26,22	7,55	4,04	76,72	6,41	1,05	91,32	1,35
Proband 7	29,93	36,64	26,28	6,94	3,94	60,90	5,82	0,88	92,15	1,33
Proband 10	34,52	27,51	12,34	7,19	4,19	66,49	5,70	0,72	86,12	1,36
Proband 11	45,93	28,30	25,61	7,27	6,79	64,50	5,81	0,70	83,63	1,01
Proband 12	4,95	54,28	47,54	7,32	3,83	78,63	5,79	0,09	92,96	1,14
Proband 13	55,36	40,31	43,93	7,01	4,43	75,39	6,10	1,00	71,67	1,13
Proband 15	34,55	28,27	17,50	6,27	6,40	62,13	4,72	0,84	91,05	1,65
Proband 16	17,88	30,83	22,55	11,36	3,00	50,55	4,88	1,27	73,27	1,16
Proband 17	25,17	28,98	24,69	6,90	4,17	55,52	6,26	0,82	113,29	1,06
Proband 18	103,52	38,44	25,01	6,61	7,68	62,45	5,18	1,01	98,82	1,35
Proband 19	11,99	30,85	17,36	6,35	4,16	62,01	5,11	0,52	88,79	1,20

**Tabelle 11: Routinelaborparameter vor der ersten Bestrahlung (1/2). Die fehlenden Parameter befinden sich in Tabelle 12 auf der nächsten Seite.
Einheiten: 1) U/L 2) g/dL 3) mg/dL**

Routinelaborparameter vor der ersten Bestrahlung (2/2)

	LDH₁₎	CRP₄₎	HbA1c₅₎	WBC₆₎	RBC₇₎	HGB₂₎	HCT₅₎	MCV₈₎	MCH₉₎	MCHC₂₎	PLT₆₎
Proband 1	514,22	<0,50	6,0	9,2	4,19	13,3	38,6	92,1	31,7	34,5	180
Proband 2	370,69	<0,55	5,6	7,5	4,52	13,1	37,2	82,3	29,0	35,2	212
Proband 4	376,58	8,54	5,4	8,1	3,92	14,3	38,6	98,5	36,5	37,0	187
Proband 5	474,53	1,10	5,1	8,5	4,15	13,1	37,3	89,9	31,6	35,1	214
Proband 6	336,50	<0,50	5,4	10,5	4,98	16,2	45,1	90,6	32,5	35,9	165
Proband 7	313,39	0,67	5,6	4,1	4,25	13,5	38,5	90,6	31,8	35,1	213
Proband 10	400,16	3,51	5,6	6,7	4,66	13,7	41,0	88,0	29,4	33,4	273
Proband 11	340,11	1,74	5,5	4,8	4,25	13,7	39,5	92,9	32,2	34,7	205
Proband 12	378,30	<0,50	5,5	3,5	4,51	14,0	39,8	88,2	31,0	35,2	167
Proband 13	431,02	1,19	5,7	6,9	5,03	16,1	45,4	90,3	32,0	35,5	251
Proband 15	350,89	<0,50	5,8	7,2	4,52	13,2	38,0	84,1	29,2	34,7	192
Proband 16	435,96	1,53	5,8	5,0	4,75	13,2	40,5	85,3	27,8	32,6	222
Proband 17	393,43	1,96	6,3	6,9	4,77	14,5	41,2	86,4	30,4	35,2	217
Proband 18	364,29	1,81	5,7	5,6	4,27	13,8	39,3	92,0	32,3	35,1	194
Proband 19	397,18	0,52	5,4	5,5	4,32	13,0	36,7	85,0	29,7	34,9	201

Tabelle 12: Routinelaborparameter vor der ersten Bestrahlung (2/2). Einheiten: 1) U/L 2) G/dL 3) mg/dL 4) mg/L 5) % 6) x10³/mL 7) x10⁶/mL 8) fL 9) pg

Routinelaborparameter nach der letzten Bestrahlung (1/2)

	GGT₁₎	AST₁₎	ALT₁₎	Total Protein₂₎	UA₃₎	Urea UV₃₎	Albumin₂₎	Bilirubin₃₎	Glucose₃₎	Creatinin₃₎
Proband 1	58,94	42,91	48,20	10,87	7,00	78,98	6,62	0,78	99,14	1,46
Proband 2	20,05	23,90	15,57	6,87	5,87	71,76	6,22	1,45	98,47	1,55
Proband 4	158,84	61,16	57,23	7,35	12,67	59,69	5,00	1,47	97,21	1,80
Proband 5	29,50	31,29	24,74	7,05	4,47	66,40	5,61	1,29	92,99	1,65
Proband 6	25,55	23,98	24,11	7,54	4,01	69,42	6,67	1,39	88,83	1,21
Proband 7	36,41	33,36	28,65	6,44	4,49	60,52	5,65	0,84	92,01	1,65
Proband 10	26,86	22,90	15,68	6,74	4,63	68,64	5,75	10,62	87,21	1,26
Proband 11	39,73	27,13	21,89	7,68	5,67	62,64	5,82	0,95	91,91	1,10
Proband 12	23,55	40,52	42,22	7,02	5,15	56,68	5,52	0,85	92,94	1,09
Proband 13	89,18	34,15	32,63	6,48	4,27	59,87	5,78	1,20	65,23	1,12
Proband 15	26,10	27,62	20,26	6,61	7,03	19,80	6,55	0,73	111,98	1,30
Proband 16	8,10	33,39	28,24	6,33	2,84	67,49	5,42	1,50	86,50	1,14
Proband 17	30,52	38,38	38,56	7,61	5,33	65,72	7,34	1,11	147,94	1,14
Proband 18	87,30	48,80	33,33	6,79	8,83	71,86	5,67	1,42	107,81	1,31
Proband 19	15,09	32,58	16,08	6,57	4,47	65,71	5,58	1,00	96,66	1,12

**Tabelle 13: Routinelaborparameter nach der letzten Bestrahlung (1/2). Die fehlenden Parameter befinden sich in Tabelle 14 auf der nächsten Seite.
Einheiten: 1) U/L 2) g/dL 3) mg/dL**

Routinelaborparameter nach der letzten Bestrahlung (2/2)

	LDH ₁₎	CRP ₄₎	HbA1c ₅₎	WBC ₆₎	RBC ₇₎	HGB ₂₎	HCT ₅₎	MCV ₈₎	MCH ₉₎	MCHC ₂₎	PLT ₆₎
Proband 1	585,24	0,85	6,10	8,0	4,27	13,4	39,3	92,0	31,4	34,1	189
Proband 2	333,56	1,79	5,50	8,9	4,60	13,1	37,5	81,5	28,5	34,9	230
Proband 4	402,49	6,24	5,40	6,2	3,65	12,9	35,4	97,0	35,3	36,4	140
Proband 5	394,13	2,63	5,40	5,5	3,90	12,2	35,0	89,7	31,3	34,9	198
Proband 6	341,49	<0,50	5,40	8,9	4,78	15,5	43,3	90,6	32,4	35,8	168
Proband 7	335,81	0,53	5,70	5,2	4,04	12,6	36,6	90,6	31,2	34,4	193
Proband 10	376,54	9,07	5,50	4,8	4,12	12,4	36,8	89,3	30,1	33,7	231
Proband 11	336,67	1,75	5,40	5,0	3,98	12,9	36,8	92,5	32,4	35,1	199
Proband 12	360,99	0,57	5,40	3,1	4,23	13,3	37,5	88,7	31,7	35,8	154
Proband 13	502,18	>20	5,60	5,8	4,48	14,2	40,5	90,4	31,7	35,1	196
Proband 15	450,93	0,99	5,00	6,0	4,15	12,0	34,8	83,9	31,7	28,9	165
Proband 16	514,38	0,99	2,19	3,9	4,62	12,8	40,0	86,6	27,7	32,0	208
Proband 17	389,35	0,94	5,80	6,0	4,74	14,2	40,7	85,9	30,0	34,9	211
Proband 18	423,24	1,99	5,40	4,7	3,92	13,0	37,0	94,4	33,2	35,1	179
Proband 19	350,18	<0,50	4,80	5,1	4,47	13,2	37,9	84,8	29,5	34,8	184

Tabelle 14: Routinelaborparameter vor der ersten Bestrahlung (2/2). Einheiten: 1) U/L 2) g/dL 3) mg/dL 4) mg/L 5) % 6) x10³/mL 7) x10⁶/mL 8) fL 9) pg

6.3 Dokumente

Dieser Abschnitt enthält folgende Dokumente:

- Informed Consent Version 2
- Ethikvotum

Informationsblatt für Probanden für die Pilotstudie:

Änderungen des Redoxzustandes¹ von humanem Serumalbumin² durch eine Radiotherapie³ bei Patienten mit Prostatakarzinom⁴

Sehr geehrter Proband!

Es freut uns, dass Sie sich für die Teilnahme an dieser Studie interessieren. Für eine solche Teilnahme ist die schriftliche Einverständniserklärung eines jeden Probanden Pflicht. Wir bitten Sie daher, dieses Informationsblatt aufmerksam durchzulesen. Es ist wichtig, dass Sie alles verstehen, was auf diesem Informationsblatt vermerkt ist. Zögern Sie nicht die anwesenden Betreuungspersonen zu fragen, sollte es irgendwelche Unklarheiten geben.

Die Studie

Die Studie untersucht den Redoxzustand (eine bestimmte chemische Konfiguration von Molekülen) von Serumalbumin (ein Eiweißstoff im menschlichen Blut) in Abhängigkeit von einer Radiotherapie (im Volksmund als Strahlentherapie bekannt). Bei einer Radiotherapie werden hochenergetische Röntgenstrahlen benutzt um die Tumorzellen zu schädigen und zu zerstören. Bei dieser Bestrahlung von menschlichem Gewebe werden sogenannte Radikale (Moleküle die andere Moleküle chemisch verändern können) freigesetzt. Diese Radikale verändern die molekulare Struktur des humanen Serumalbumins. Dieser Vorgang wird auch oxidativer Stress genannt und tritt auch bei Stress, Sport, Sauerstoffmangel, etc. auf. Ziel dieser Studie ist es, das Ausmaß dieses oxidativen Stresses anhand von dem Bluteiweiß Albumin zu messen. Um das Albumin messen zu können, werden 4 Blutproben benötigt. Die erste Blutabnahme erfolgt vor dem Therapiebeginn die letzte nach der Strahlentherapie. Die beiden weiteren Blutabnahmen erfolgen während der Therapie. Die Gesamtmenge an Blut beträgt 34 mL (Milliliter). Dies entspricht ungefähr einer Menge von 4 Esslöffeln Blut. Um die höchstmögliche Qualität

¹ Der Redoxzustand ist eine bestimmte chemische Konfiguration von Molekülen. Dieser Zustand ist definiert über die Aufnahme oder Abgabe von Elektronen (einer bestimmten Art von Elementarteilchen). Bei bestimmten Vorgängen im Körper (Stress, Sport, Sauerstoffmangel,...), kann sich die Verteilung dieser chemischen Zustände verschieben.

² Bei humanem Serumalbumin handelt es sich um das häufigste Eiweißmolekül im menschlichen Blut.

³ Die Radiotherapie ist ein medizinisches Verfahren bei dem mit Hilfe von ionisierenden elektromagnetischen Strahlen (hochenergetische Röntgenstrahlen) ein bösartiger Tumor bestrahlt wird. Diese Strahlen zerstören die Tumorzellen.

⁴ Bei einem Prostatakarzinom handelt es sich um einen bösartigen Tumor der Prostata.

der Studie zu erreichen und verschiedene Störfaktoren die durch andere Krankheiten entstehen auszuschließen, gibt es bestimmte Ausschlusskriterien die eine Teilnahme an der Studie nicht ermöglichen. Zu diesen Kriterien zählen:

- Lebererkrankungen
- Nierenerkrankungen
- Lungenerkrankungen
- Autoimmunerkrankungen
- akute Infektionen(=Entzündungen)
- extreme Ernährungsformen (vegan, spezielle Diäten oder Ähnliches)
- Tabakkonsum (mehr als eine Packung pro Tag)

Mögliche Beschwerden und Risiko

Bei dieser Studie wird der Patient während einer standardisierten Strahlentherapie, die vom LKH Graz durchgeführt wird, beobachtet. Für die Studie wird lediglich das Blut des Probanden benötigt. Bei venösen Blutabnahmen handelt es sich um ärztliche Routinemaßnahmen. Sie sind mit dem üblichen sehr geringen Risiko von Komplikationen behaftet (z.B.: Fehlpunktionen, welche eine weitere Venenpunktion erfordern, das Auftreten von Hämatomen (Blutergüssen) oder Infektionen im Bereich der Einstichstelle). Weitere Untersuchungen und Eingriffe sind nicht vorgesehen.

Sollten nach dem Lesen dieses Aufklärungsbogens irgendwelche Fragen auftreten, zögern Sie nicht den/die Prüfarzt/Prüfärztin darauf anzusprechen. Sollten Sie sich gegen eine Teilnahme an der Studie entschieden haben, teilen Sie das bitte dem/der Prüfarzt/Prüfärztin mit. Sollten Sie sich für die Teilnahme an der Studie entschieden haben, bitten wir Sie die beiliegende Einverständniserklärung zu unterzeichnen. Diese Einverständniserklärung kann von Ihnen jederzeit und ohne Angabe von Gründen widerrufen werden. Es entstehen Ihnen in diesem Fall keinerlei Nachteile. Die Einverständniserklärung verbleibt bei der Studienleitung, das vorliegende Informationsblatt verbleibt bei Ihnen. Sollten später Fragen auftreten, können Sie folgende Personen erreichen:

Funktion	Name	Telefonnummer
Prüfarzt	OA Dr. med. univ. Richard Partl	+43/316/385-80775
Projektleiter	Ao. Univ. Prof. Dr. Karl Öttl	+43/316/380-7544
Diplomand	Maximilian Lirscher	+43664/9653205

Einverständniserklärung für Probanden für die Pilotstudie:

**Änderung des Redoxzustandes von humanem
Serumalbumin durch eine Radiotherapie bei Patienten
mit Prostatakarzinom**

Ich habe ein Informationsblatt für Probanden zur oben genannten Studie erhalten, gelesen und verstanden. Möglicherweise aufgetretene Fragen meinerseits wurden von den zuständigen Betreuungspersonen ausreichend und verständlich beantwortet. Mit meiner Unterschrift auf dieser Einverständniserklärung stimme ich der Teilnahme an dieser Studie mit der dazu gehörenden viermaligen Entnahme von insgesamt 34 mL (Milliliter) Blut (12.5 mL vor Beginn der Therapie, 4.5 mL unmittelbar nach der ersten Fraktion der Radiotherapie, 4.5 mL am nächsten Tag nach der ersten Fraktion der Radiotherapie, 12.5 mL nach Abschluss der Radiotherapie zu.

Ich kann diese Einverständniserklärung jederzeit und ohne Angabe von Gründen zurückziehen. Alle gesammelten Daten und Blutproben werden in diesem Fall vernichtet.

(Name des Probanden)

(Unterschrift des Probanden)

Graz am, _____
(Datum)

Prüfarzt:

OA Dr. med. univ. Richard Partl

Graz am _____, Unterschrift _____



Auenbruggerplatz 2, A-8036 Graz
ethikkommission@medunigraz.at
Tel.: +43 / 316 / 385-13928, Fax: -14348

VOTUM

gültig bis 04.04.2017

EK-Nummer: 28-322 ex 15/16
Studientitel: Pilot study: Changes of the redox state of human serum albumin by radiotherapy of patients with prostate carcinoma
Prüfer: OA Dr. med. univ. Richard Partl
 Institut für Strahlentherapie und Radioonkologie (Medizinische Universität Graz)
Sponsor: Medizinische Universität Graz
Ansprechpartner: Ao.Univ.-Prof. Mag. Dr.rer.nat Karl Öttl, 8036 Graz, Auenbruggerplatz 2
CRO: -
Antragsteller: Institut für Physiologische Chemie (Medizinische Universität Graz)
Ansprechpartner: Maximilian Lirscher

Die o.a. Studie wurde von der Ethikkommission erstmals im 'expedited Review' am 21.03.2016 behandelt. Die Ethikkommission ist zu folgendem Schluss gekommen:

Es besteht kein Einwand gegen die Durchführung der Studie in der vorliegenden Form.

Kommissionsmitglieder, die für diesen Tagesordnungspunkt als befangen anzusehen waren und daher gemäß Geschäftsordnung an der Entscheidungsfindung und Abstimmung nicht teilgenommen haben:
keine

Zur Beurteilung vorliegende Dokumente:

Dokumente eingegangen am 05.03.2016, begutachtet im 'expedited Review' am 21.03.2016

✓ Cover Letter Belgeitschreiben 1.0	12.02.2016
✓ Antragsformular ECS	05.03.2016
✓ Originalprotokoll Studienprotokoll Version 1.0 1.0	13.06.2015
Informed Consent Form Informationsblatt Version 1.0 1.0	12.02.2016
Sonstiges: Einverständniserklärung Version 1.0 1.0	12.02.2016
✓ Sonstiges: Gebührenerlass 1.0	12.02.2016

Dokumente eingegangen am 09.03.2016, begutachtet im 'expedited Review' am 21.03.2016

✓ Antragsformular ECS unterschrieben	09.03.2016
--------------------------------------	------------

Dokumente eingegangen am 21.03.2016, begutachtet im 'expedited Review' am 04.04.2016

✓ Informed Consent Form 2	21.03.2016
---------------------------	------------

Die Ethikkommission geht - rechtlich unverbindlich - davon aus, dass es sich um keine klinische Prüfung nach AMG bzw. MPG handelt.

Es handelt sich um eine Studie im Rahmen einer Diplomarbeit.

Das Votum der Ethikkommission berührt in keiner Weise die alleinige Verantwortung der Prüferin / des Prüfers / der Prüfer für die ordnungsgemäße Durchführung der Studie unter Einhaltung aller einschlägiger gesetzlicher Bestimmungen und Richtlinien.

Weiters machen wir darauf aufmerksam, dass der Kommission unverzüglich zu melden sind:

- Abweichungen vom Protokoll aus Sicherheitsgründen oder Protokolländerungen

- Änderungen, die das Risiko der Teilnehmer/-innen erhöhen oder die Durchführung der Studie wesentlich beeinflussen
- Mutmaßliche unerwartete schwerwiegende Nebenwirkungen - SUSARs (AMG-Studien ab 1.5.2004) oder schwerwiegende unerwünschte Ereignisse - SAEs (andere Studien)
- Jegliche Information über sonstige Umstände, die die Sicherheit der Teilnehmer/-innen oder die Durchführung der Studie beeinträchtigen können

Dieses Votum gilt für ein Jahr ab dem Datum der Ausstellung. Bei längerer Studiendauer ist rechtzeitig vor Ablauf der Gültigkeit des Votums ein Zwischenbericht vorzulegen (Berichtsformular), um eine etwaige Verlängerung zu erlangen.

Graz, 04. April 2016



Univ. Prof. DI Dr. Josef Haas
Vorsitzender



Univ. Prof. Dr. Hermann Toplak
Stv. Vorsitzender

Achtung: Bitte bei allen das Projekt betreffende Schreiben oder telefonischen Anfragen die EK-Nummer angeben!