

Harald Schmid  
Dr.med.

### **Pyridinolin-Crosslinks im Serum**

Geboren am 21.04.1969 in Freiburg im Breisgau  
Reifeprüfung am 11.05.1988 in Freiburg  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1994 bis WS 2000/01  
Physikum am 20.03.1996 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg  
Staatsexamen am 21.11.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Chirurgie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. H. Schmidt-Gayk

In dieser Arbeit wurde versucht, eine neue Methode zu entwickeln, um die Pyridinoline, insbesondere Desoxypyridinolin, im Serum nachzuweisen. Ziel war es, einen Nachweis in physiologischer Konzentration zu erreichen, d.h. ca. 0,7 nmol/l für DPD und ca 3,6 nmol/l für PYD, entsprechend 1,5 µg/l PYD und 0,28 µg/l DPD.

Die ursprüngliche Methode war ein Nachweis mittels HPLC und Fluoreszenz-Detektion bei Ex 295 nm, Em 400 nm nach Serum-Hydrolyse und Filtration. Als erstes wurde eine Nachsäulen-Derivatisierung mit Ortho-Phthaldialdehyd (OPA) versucht. Dieses Reagenz bindet an primäre Amine und fluoresziert dann bei Excitation mit 340 nm bei Emissionen zwischen 400-700 nm. Die Derivatisierung der Pyridinoline gelang aber nicht. Auch der als nächstes versuchte Nachweis mit einem Elektro-Chemischen-Detektor (ECD) blieb erfolglos. Veränderung des ursprünglichen HPLC-Laufmittels durch Zusatz von Lithium-Perchlorat und Austausch des Acetonitril-Anteils durch Methanol bei Reduktion der Konzentration an Hepta-Fluor-Buttersäure (HFBA) erbrachte eine Verbesserung der Chromatogramme. Die Retentionszeit nahm ab, die Peakhöhe nahm etwa um 50 % zu und die Trennung beider Peaks (PYD und DPD) voneinander war ebenfalls besser. Die bisher nötige Filtration der Serum-Hydrolysate kann unterbleiben. Kühlung der Kapillare zwischen Chromatographiesäule und Fluoreszenz-Detektor auf etwa 3°C erbrachte einen Höhenzuwachs der Peaks um 18 %.

Die Qualitätskontrolle zeigte für das neue Laufmittel für die Intra- und Interassay-Varianz Variationskoeffizienten zwischen 5–11 %. Bei der Recovery lag die prozentuale Abweichung Ist-zu-Soll zwischen 0–11 %. Für PYD ergab sich im gesamten Verdünnungsbereich bis 16 µg/l eine gute Linearität. Die Auswertung der rückgerechneten Konzentrationen ergab einen VK von 7,8 %. DPD zeigte eine Linearität bis zu einer Konzentration von 3,8 µg/l.

Die untere Nachweisgrenze lag bei 2 µg/l, entsprechend 4,8 nmol/l und verbessert somit die ursprüngliche HPLC-Methode (untere Nachweisbarkeit 5 µg/l).

Zur Überprüfung einer möglichen Korrelation der Pyridinoline zu Parathormon und Ostase wurden mit dem neuen Laufmittel 126 Serum-Proben von Dialyse-Patienten gemessen, von denen die Parathormon- und Ostase-Konzentration bekannt war. Es ergab sich mit  $r = 0,85$  eine deutliche Korrelation der Pyridinoline zueinander und auch eine gering ausgeprägte für PTH zu Ostase mit  $r = 0,32$ . Alle anderen Korrelationen der Pyridinoline zu Parathormon und Ostase waren nicht signifikant.