

Edward Albert Schober, Ph.D./Univ. of North Carolina  
Dr. med.

## **Variabilität von biochemischen Knochenresorptionsmarkern und Kreatinin in menschlichem Urin**

Geboren am 20.03.1969 in Park Ridge, USA  
Reifeprüfung am 28.12.1990 in Chapel Hill, USA  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1997 bis WS 2002/2003  
Physikum am 07.09.1998 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Mannheim  
Praktisches Jahr in Mannheim und Rheinfelden, Schweiz  
Staatsexamen am 07.11.2002 an der Universität Heidelberg in Mannheim

Promotionsfach: Orthopädie  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. S.J. Breusch

Die Bestimmung von biochemischen Knochenresorptionsmarkern im Urin zur Diagnose und Überwachung von Erkrankungen, die pathologische Knochenresorption bedingen, ist in den letzten dreißig Jahren eingehend erforscht worden. Trotz deutlicher Verbesserungen in der Spezifität, die mit der Entdeckung von Desoxypyridinolin (Dpd) und dem aminoterminalen quervernetzten Kollagen-Typ-I Telopeptid (Ntx) einhergingen, vermindert die erhebliche Variabilität in der Ausscheidung und Messung dieser Marker ihre Brauchbarkeit zur Bestimmung des pathologischen Zustandes im Individuum.

Zur biologischen Variabilität tragen zirkadiane, Tages-, Monats- (bei prämenopausalen Frauen), und saisonale Schwankungen, sowie Alters-, Geschlechts-, Knochenmassen-, Gewichts-, Gesundheits-, Diätetische- und medikamentöse Unterschiede bei. Zur analytischen Variabilität tragen Unterschiede in angewandten Methoden und Apparaten, Exposition von Urinproben gegenüber ultraviolettem Licht, Sensibilität und Spezifität der Antikörper-Epitop-Verbindungen in *enzyme-linked immunoassays* (ELISAs), und Lagerungsbedingungen bei. Knochenresorptionsmarker, die im Spontanurin (statt 24h-Urin) gemessen werden, werden der Diureserate entsprechend angepaßt, indem die Konzentration des Markers durch die Kreatininkonzentration dividiert wird. In dieser Anpassung addiert sich die Variabilität der Kreatininbestimmung zu der der Markerbestimmung.

Die lagerungsbedingte Variabilität wird in der Literatur fast immer als unbedenklich geschildert. Aufgrund von widersprüchlichen Ergebnissen in unserem Labor, und dem nicht-beschriebenen Ausfällen eines Präzipitates in aufgetauten Urinproben, wurden, in zwei Studien, die Effekte der Lagerung und Rezentrifugierung auf die Konzentrationen von Dpd, Ntx und Kreatinin in Urin untersucht.

Die erste Studie umfaßte eine Stichprobe von 14 Patienten mit aseptischer Endoprothesenlockerung und 14 Individuen ohne Lockerungszeichen, als Kontrollen. Urinproben wurden unterschiedlich lange unter verschiedenen Lagerungsbedingungen aufbewahrt. Das Präzipitat in Urinproben wurde resuspendiert, bevor die Proben zentrifugiert wurden. Unter Standard-Lagerungsbedingungen (-20°C) blieb die Dpd-Konzentration unverändert. Nach 7-10 Tagen fiel die Kreatininkonzentration jedoch um ca. 24% ( $p < 0,005$ ), was zu einem signifikanten Anstieg der Dpd/Kreatinin-Werte ( $p < 0,005$ ) führte.

Die zweite Studie umfaßte eine Stichprobe von 40 Patienten, deren Urinproben vier Monate bei -20°C gelagert wurden. Das Präzipitat wurde resuspendiert, aber anschließend wurden die Proben nicht zentrifugiert. Nach 119 Tagen bei -20°C stiegen Dpd- (ca. 20%,  $p < 0,0001$ ), Dpd/Kreatinin- (ca. 65%,  $p < 0,0001$ ) und Ntx/Kreatinin- (ca. 5%,  $p < 0,05$ ), und fielen Ntx- (ca.

-20%,  $p < 0,01$ ) und Kreatinin-Werte (ca. -22%,  $p < 0,0001$ ). Die Veränderungen in Ntx und Dpd wurden auf eine simultane Zerstörung von Ntx und Freisetzung von Dpd zurückgeführt. Der Abfall in Kreatinin könnte durch dessen Zerstörung oder die Adsorption dieses Stoffes an die Behälterwand erklärt werden. Zentrifugierung, nach Resuspension des Präzipitates, entfernt Dpd aus dem Überstand, während, Kreatinin nur wenig durch Nachzentrifugieren beeinflusst wird.

Diese Untersuchung konnte erstmalig zeigen, dass die Lagerung und Probenbehandlung deutlich zur analytischen Variabilität beiträgt, und die Diagnosestellung und Überwachung erheblich erschwert wird, wenn sie nicht bei der Beurteilung berücksichtigt wird. Zur Verminderung der Variabilität wurde der Dpd/Ntx-Quotient als knochenspezifische Alternative zur Ausscheidungsanpassung via Kreatinin vorgeschlagen und z.T. evaluiert.

Diese Arbeit unterstreicht die Komplexität der biomedizinischen Forschung und den Zeit- und Kostenaufwand der durch die (voreilige oder unvorsichtige) Vermarktung kommerzieller Assays bedingt werden kann.