

Sylke Becker
Dr. med.

Messung von gesamtem und freiem Pyridinolin und Desoxypyridinolin im Urin mittels Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie-(HPLC)-Analyse bei Gesunden, Frauen in der Menopause und Mammakarzinompatientinnen mit Knochenmetastasen

Geboren am 10.02.1966 in Bensheim.
Staatsexamen am 14.11.1994 an der Universität Heidelberg.

Promotionsfach: Laboratoriumsmedizin
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. H. Schmidt-Gayk

Zielsetzung dieser Arbeit war die Erstellung und Verbesserung eines Nachweisverfahrens für die Knochenabbaumarker Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) im Urin, basierend auf der Vorfraktionierung mittels CF1-Säulenchromatographie und der Ionenpaar-Umkehrphasen-Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC). Es sollte die Analysezeit verkürzt sowie die routinemäßige Praktikabilität in Kombination mit einer hohen Sensitivität und Spezifität berücksichtigt werden. So konnte in dieser Arbeit die Hydrolysezeit (zur Bestimmung der gesamten PYD- und DPD-Konzentrationen) von drei auf eine Stunde im Autoklaven verkürzt werden. Die initiale manuelle CF1-Säulenchromatographie ließ sich durch eine vollautomatische Probenvorfraktionierung mittels ASPEC-System („Automated Sample Preparation System With Extraction Columns“) direkt vor der HPLC-Analyse erfolgreich ersetzen, wobei letztere vom Gradientensystem auf ein isokratisches Verfahren umgestellt wurde, welches weiterhin eine gute Basislinientrennung der Chromatogramme lieferte. Durch diese Maßnahmen konnten nicht nur Material und Geräte eingespart werden, sondern auch die Gesamtanalysezeit (bei 50 Proben) von ca. 40 Stunden auf ca. 18 Stunden verkürzt werden.

Danach erfolgte die Prüfung der klinischen Aussagefähigkeit des weiter entwickelten Analyseverfahrens. Die Intraassayvarianz beträgt für gesamtes PYD 3,5 % und für freies PYD 5,0 % sowie für gesamtes DPD 5,1 % und für freies DPD 8,0 %. Die Interassay-Variationskoeffizienten betragen für die gesamten PYD-Konzentrationen 2,4 % und für die freien PYD-Konzentrationen 6,0 % sowie für die gesamten DPD-Konzentrationen 7,1 % und für die freien DPD-Konzentrationen 6,5 %. Dies spricht für eine hohe Präzision des Analyseverfahrens. Es konnte die Stabilität von PYD und DPD in Urinproben und der Standardlösung bei Raumtemperatur (normale Laborlichtbedingungen) und + 4 °C über drei Tage nachgewiesen werden. Allerdings soll direkter Sonnenlichteinfall auf die Proben vermieden werden. Auch zehnmaliges Einfrieren und Auftauen von Urinproben erbrachte keinen Konzentrationsverlust der beiden Quervernetzungsstücke. Die PYD- und DPD-Konzentrationen in den Urinhydrolysaten blieben bei Lagerung über 14 Tage bei + 4 °C unverändert. Des Weiteren konnte die Linearität von PYD und DPD in der Standardlösung, im Urin sowie im Eluat dargestellt werden. Die untere Nachweisgrenze liegt bei 4,5 µg/l bzw. 10 nmol/l und die Wiederfindbarkeit für PYD bei 87 - 99 % sowie für DPD bei 82 - 93 %.

Die Untersuchung der Tagesrhythmik der Pyridinium-Crosslinks zeigte ein Konzentrationsmaximum beider Komponenten zwischen 24 und 8 Uhr sowie ein Minimum zwischen 16 und 20 Uhr. Daraus folgt, dass für klinische Studien die Beachtung einer einheitlichen Probengewinnung von höchster Bedeutung ist. Die PYD/DPD-Quotienten unterlagen dagegen keiner Tagesrhythmik und lagen bei Gesunden zwischen 5,2 und 5,8. Von Aoshima und Mitarbeitern wurde außerdem gezeigt, dass bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose der Knochen-

abbau besonders nachts gesteigert ist (Aoshima et al. 1998). Die Reproduzierbarkeit innerhalb einer Person war im 24h-Sammelurin sowohl für eine weibliche (über 29 Tage) als auch für einen männlichen (über 14 Tage) Probanden mit einem Variationskoeffizienten (VK) von 10 – 14 % besser als im 1. Morgenurin (VK 14 – 19 %). Dies kann durch den Kreatininbezug bedingt sein. Der 1. Morgenurin hat dagegen den Vorteil höherer Peaks. Ob eine zyklusabhängige Rhythmik für den PYD/DPD-Quotienten bei Frauen vorliegt, sollte mit einer höheren Probandenzahl in weiteren Studien geklärt werden.

Es wäre für eine Nachfolgearbeit interessant, ob mit dem Sammeln von erstem Morgenurin z.B. an drei aufeinander folgenden Tagen und Analyse eines Gemisches aus diesen drei Proben intraindividuelle Variationskoeffizienten um oder unter 10 % erzielt werden können. Dies würde es erleichtern, schon kleinere Unterschiede unter einer Therapie z.B. mit niedrig dosierten Hormonpflastern oder mit Vitamin D und Kalzium zu erfassen.

Anhand von 120 gesunden Probanden (61 Männer, 59 prämenopausalen Frauen) wurde ein Referenzbereich für die gesamten PYD- und DPD-Fraktionen im Urin erstellt. Im Vergleich dazu lagen 71 % der PYD- und 74 % der DPD-Werte bei 31 gesunden postmenopausalen Frauen über der oberen Normalbereichsgrenze. Die Urinuntersuchung von 37 Mammakarzinompatientinnen mit Knochenmetastasen ergab im Gegensatz zu den prämenopausalen Frauen sowohl für gesamtes PYD als auch DPD durchschnittlich um das 4,6-fache erhöhte Werte, wobei sämtliche Werte über der oberen Normbereichsgrenze lagen.

Für die freien PYD- und DPD-Fraktionen wurde ebenfalls anhand der Urine von 92 gesunden Probanden (38 Männer, 54 prämenopausale Frauen) ein Referenzbereich erstellt. Im Vergleich dazu lagen 39 % der PYD- und 9 % der DPD-Werte bei 23 gesunden postmenopausalen Frauen über der oberen Normbereichsgrenze. Die freien Konzentrationen der Pyridinium-Crosslinks waren bei 37 Mammakarzinompatientinnen mit Knochenmetastasen im Vergleich zu den prämenopausalen Frauen um das 3,6-fache für PYD und um das 2,6-fache für DPD erhöht, wobei 89 % der PYD- sowie 65 % der DPD-Werte über der oberen Grenze lagen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass das prozentuale Verhältnis der freien zu den gesamten Fraktionen beider Quervernetzungsstücke Unterschiede zwischen Knochenstoffwechselgesunden und Patienten mit gesteigertem Knochenum- bzw. -abbau anzeigt. So lagen die durchschnittlichen prozentualen Anteile bei Männern (n = 38) bei 51 % (23 - 75 %) für PYD und 54 % (21 - 86 %) für DPD sowie bei prämenopausalen Frauen (n = 54) bei 55 % (22 - 88 %) für PYD und 59 % (13 - 80 %) für DPD. Dagegen ließ sich bei postmenopausalen Frauen (n = 23) ein prozentuales Verhältnis von 54 % (27 - 86 %) für PYD und 47 % (20 - 77 %) für DPD sowie bei Mammakarzinompatientinnen mit Knochenmetastasen (n = 37) von 45 % (28 - 60 %) für PYD und 32 % (16 - 76 %) für DPD nachweisen. Während also bei gesunden prämenopausalen Frauen der freie DPD-Anteil an den Gesamtfractionen ca. 60 % beträgt, sinkt dieser Anteil bei Patientinnen mit Knochenmetastasen auf etwa 30 %, wodurch das wahre Ausmaß eines gesteigerten Knochenabbaus durch das freie DPD unterschätzt wird. Auffällig ist außerdem die hohe interindividuelle Variationsbreite der prozentualen Anteile, sodass der Durchschnittswert keine konstante Größe widerspiegelt, was bei der Bestimmung der freien Crosslinks beachtet werden muss.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war der Vergleich des kommerziell erhältlichen Immunoassays „Collagen Crosslinks™ Kit“ (Metra Biosystems Inc.) mit der HPLC-Methodik bezüglich des Nachweis der freien PYD- und DPD-Konzentrationen im Urin. Wegen schlechter Präzision

fürte der EIA zu mangelhafter Übereinstimmung mit den HPLC-Ergebnissen. Auch in Ringversuchen zeigte sich, dass der EIA für klinische Fragestellungen nicht brauchbar war.

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit sollte der quantitative Nachweis der gesamten PYD- und DPD-Fraktionen mittels automatisierter HPLC-Methodik der Bestimmung der freien Fraktionen mit der gleichen Methode oder mittels Immunoassay vorgezogen werden. Dies wird zusätzlich durch das sehr gute Abschneiden meiner automatisierten HPLC-Methode in mehreren internationalen Ringversuchen, in denen eine hervorragende Linearität bei Messung von Patientenproben bewiesen wurde, bekräftigt (NEQAS, siehe Tabellarischen Anhang).

Die von mir optimierte automatisierte Methode zur Messung von Pyridinolin und Desoxypyridinolin im Urin weist ein großes Potential auf, postmenopausal gesteigerten Knochenabbau zu erkennen. Dies gilt allerdings nur, wenn wegen der Tagesrhythmik die Probenentnahme standardisiert wird. Extrem hohe Werte der Pyridinoline fand ich bei Patientinnen mit Mammakarzinom und radiologisch nachgewiesenen Knochenmetastasen (alle lagen außerhalb des Referenzbereichs der prämenopausalen Frauen). Auch erlaubt möglicherweise der von mir beobachtete Anstieg des PYD/DPD-Quotienten bei diesen Patientinnen eine frühere Erkennung der Knochenmetastasierung, was in weiteren Untersuchungen zu klären wäre.