

Matthias LANG
Dr. med.

Einflußgrößen und Störfaktoren bei der Analyse biochemischer Marker des Knochenmetabolismus

Geboren am 07.05.1967 in Plauen (Vogtland)
Reifeprüfung am 05.06.1985 in Plauen (Vogtland)
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1990 bis SS 1996
Physikum am 20.03.1992 an der Universität Münster
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Kapstadt und Heidelberg
Staatsexamen am 05.06.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach Innere Medizin
Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. Markus Joachim Seibel

Ziel der Arbeit war die umfassende Untersuchung des präanalytischen Verhaltens folgender biochemischer Knochen-Stoffwechselmarker:

Im Urin:

Desoxypyridinolin und Pyridinolin, Hydroxyprolin, N-terminales Crosslinktelozeptid (NTx)

Im Serum:

Osteocalcin, knochenspezifische alkalische Phosphatase, C-terminales Crosslinktelozeptid, C-terminales Kollagen-Propeptid (PICP)

Die folgenden Fragen sollten in den Versuchsreihen beantwortet werden

- Einflüsse des Alters, des Geschlechts, der Menopause und primär nichtossärer Systemerkrankungen
- diätetische Einflüsse kontrollierter oraler Calcium- und Gelatinezufuhr
- circadiane Rhythmen sowie Aussagekraft diverser Uringewinnungsmethoden
- Einfluß unterschiedlicher Lagerungsbedingungen
- Vergleichbarkeit verschiedener Nachweismethoden gleicher Parameter

Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der präanalytischen und analytischen Phase für die Interpretation erhobener Labordaten. Herausgestellt werden konnten insbesondere die erheblichen Varianzen in der praktischen Handhabbarkeit der zur Untersuchung ausgewählten Parameter. Zusammenfassend ergaben sich für die einzelnen Marker die folgend dargestellten Charakteristika.

Marker der Knochenformation

Die *alkalische Gesamtposphatase* liegt bei Männern im Durchschnitt höher, zeigt bei Frauen allerdings einen altersabhängigen Anstieg nach der Menopause. Primär nichtossäre Erkrankungen wie Psoriasis, COPD, Leberfibrose, Leberzirrhose, Niereninsuffizienz sowie sekundärer Hyperparathyroidismus (sHPT), führen ebenfalls zum Anstieg der alkalischen

Gesamtphosphatase. Der Parameter zeigt zudem eine eingeschränkte Stabilität unter schwankenden Lagerungsbedingungen.

Dagegen stellte sich bei der *knochenspezifischen alkalischen Phosphatase* die erwartete weitgehende Unabhängigkeit von den o. g. Erkrankungen unter Ausnahme von Leberzirrhose und sHPT als vorteilhaft gegenüber dem Gesamtzym dar. Als Hinweis auf ossäre Mechanismen ist der postmenopausale Anstieg stärker betont.

Bei den untersuchten Eigenschaften ließ das *Prokollagen-I-Propeptid* (PICP) lediglich durch die ausgeprägte Stabilität und fehlende Beeinflussbarkeit durch fibrosierende Lebererkrankungen einen Vorteil gegenüber der alkalischen Gesamtphosphatase erkennen.

Osteocalcin stellt durch die methodenabhängig teils extreme Instabilität hohe Ansprüche an den organisatorischen Ablauf von Probengewinnung und -verwertung, die zumindest derzeit keine routinemäßige Verwendung erlauben.

Bei Betrachtung dieser Ergebnisse ist unter dem Aspekt der Präanalytik die knochenspezifische alkalische Phosphatase den anderen Knochenaufbaumarkern deutlich überlegen, da hier bei starker Knochenspezifität ausreichende Lagerungsstabilität und relativ geringe Abhängigkeit von maßgeblichen Einflußgrößen wie Alter und Geschlecht vorliegt.

Marker der Knochenresorption

Die Bestimmung des *Hydroxyprolins*, dem bislang wohl am weitesten verbreiteten Parameter der Knochenresorption, ist mit dem Nachteil verbunden, daß die Einhaltung einer vorausgehenden kollagenfreien Diät und die Sammlung des 24-h-Urins eine hohe Compliance des Probanden voraussetzt. Während sich das verfälschende Potential von Nahrungskollagen beweisen ließ, boten Nacht- und 2-h-Sammelurin eine der 24stündigen Urinsammlung ebenbürtige Aussagekraft, so daß diesbezüglich eine Vereinfachung des Procedere vorgeschlagen werden kann. Bei Unabhängigkeit von Alter und Geschlecht sowie fehlender biologischer Rhythmik stellen die erwähnten ernährungsbedingten Fehlerquellen und die weite extraossäre Verbreitung hydroxyprolinhaltigen Kollagens im Körper die limitierenden Faktoren für die Verwendung des Hydroxyprolins als Knochen-Stoffwechsellmarker dar.

Das *carboxyterminale Kollagen-I-Telopeptid* (ICTP) bietet aus präanalytischer Sicht ebenfalls den Vorteil der Unabhängigkeit von Geschlecht und Alter. Auch zeigte sich keine Signalveränderung durch Temperaturschwankungen und Tauzyklen in den Stabilitätstests. Ein menopausalbedingter Einfluß konnte nicht verifiziert werden. Dagegen schlagen sich die untersuchten extraossären Erkrankungen Psoriasis, COPD, Leberfibrose und -zirrhose, Niereninsuffizienz sowie renaler sekundärer Hyperparathyroidismus in deutlich erhöhten Serumspiegeln nieder.

Bei der Analyse des *aminoterminalen Kollagen-I-Telopeptids* NTx ist neben starken tageszeitlichen Schwankungen die Beeinträchtigung durch die o. g. Erkrankungen mit Ausnahme von Psoriasis zu beachten. Bei oraler Kollagenbelastung konnte Nahrungsabhängigkeit nicht bewiesen werden; Alter, Geschlecht und Menopause blieben ohne Einfluß.

Die *Pyridinium-Crosslinks* stehen in einer direkten Abhängigkeit vom Lebensalter und erfahren einen zusätzlichen Anstieg durch Eintritt der Menopause. Dabei sind die Konzentrationen auch bei prämenopausalen Frauen höher als bei Männern. Bestrahlung mit Licht, Temperatureinflüsse und Tauzyklen zeigen kaum Einfluß auf diese Substanzen, dagegen besteht eine diurnale Rhythmik mit nächtlichem Anstieg. Für die Diagnostik ist der Nachturin ausreichend. Die untersuchten Erkrankungen bewirken unter Ausnahme der Psoriasis bei Gesamtpyridinolin und -DPD mit HPLC erhöhte Konzentrationen. Bei freiem und glykosiliertem Pyridinolin sowie freiem DPD trifft dies nur bei COPD zu, das Vorliegen von Leberfibrose und Niereninsuffizienz bleibt ohne Auswirkung. Wird dagegen die ELISA-

Methode zur Bestimmung der freien immunreaktiven Crosslinks verwendet, ist neben erhöhten Werten bei Lebererkrankungen und COPD mit einer Reduktion bei Niereninsuffizienz mit oder ohne begleitenden Hyperparathyroidismus zu rechnen. Daß die Resultate alimentär beeinflussbar sind, ist wahrscheinlich, bislang jedoch nicht mit hinreichender Sicherheit abzugrenzen. Für die immunreaktiven Crosslinks ist dies durch Nahrungskollagen und im intraindividuellen Vergleich durch vermehrte Calciumingestion nachgewiesen, bei Pyridinolin und DPD in freier und gebundener Form mittels HPLC sowie immunreaktives DPD erreichen die beobachteten Anstiege nach oraler Kollageneinnahme nicht das gesetzte Signifikanzniveau.

Unter den Knochenabbaumarkern sind bei, mit Ausnahme des Hydroxyprolins, generell wenig ausgeprägten Merkmalunterschieden die HPLC-bestimmten freien Pyridinium-Crosslinks aufgrund der Stabilität gegenüber Leberfibrose und Niereninsuffizienz die aus präanalytischem Blickwinkel unkompliziertesten Parameter.

Insgesamt bleibt festzustellen, daß die modernen Knochenstoffwechselmarker auch aus präanalytischer Sicht deutliche Vorteile gegenüber den bisher verfügbaren Parametern bieten. Die Interpretation der Ergebnisse setzt dennoch weitergehende Kenntnisse über die eingesetzten Parameter und anamnestische Besonderheiten der Patienten voraus.