

Aus der Klinik für Nephrologie und Rheumatologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Grabensee

Pyridinium-Crosslinks

Knochenstoffwechsel und Peritonealdialyse

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Nathalie Pausner

2000

„Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. D. Häussinger, Dekan
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. B. Grabensee
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. H. Reinauer

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Therapieformen.....	1
1.1.1	Peritonealdialyse.....	1
1.1.2	Untersuchungen während der Dialyse.....	2
1.2	Metabolische Vorgänge am Knochen.....	2
1.3	Formen der metabolischen Knochenerkrankung.....	3
1.3.1	Renale Osteopathie.....	3
1.3.2	Sekundärer Hyperparathyreoidismus.....	3
1.3.3	„High- und Low-turnover“.....	3
1.4	Pyridinium-Cross-links, Pyridinolin und Deoxypyridinolin.....	4
1.4.1	Cross-links, Struktur und Funktion.....	5
1.4.2	Freisetzung der Pyridinium-Verbindungen.....	7
1.4.3	Hydroxyprolin.....	7
1.4.4	HPLC und ELISA im Vergleich.....	8
1.4.4.1	HPLC.....	8
1.4.4.2	ELISA.....	9
1.4.5	Freie und peptidgebundene Cross-links.....	10
1.4.6	Cross-links und Gewebespezifität.....	12
1.4.7	Cross-links und indirekte Einflußfaktoren.....	13
1.4.7.1	Cross-links und Nahrung.....	13
1.4.7.2	Cross-links und laborchemische Eigenschaften.....	13
1.4.7.3	Cross-links und das Kriterium Alter und Geschlecht.....	14
1.4.7.4	Cross-links und Osteoporose.....	16
1.4.7.5	Cross-links und andere Erkrankungen.....	17
1.4.8	Cross-links, die Nierenfunktion und Kreatinin.....	17
1.4.9	Cross-links und die Sammelmodi.....	17
1.4.10	Longitudinale Variationen, „day-to-day-variations“.....	18
1.4.11	Jahreszeit-abhängige Veränderungen.....	18
1.4.12	Diurnale Schwankungen.....	18
1.4.13	Cross-links in Serum und Dialysat.....	19
1.5	Konventionelle Parameter.....	20
1.5.1	Knochendichte.....	20
1.5.1.1	DXA, ein densitometrisches Meßverfahren.....	20
1.5.2	Laborchemische Parameter.....	21
1.5.2.1	Parathormon.....	21
1.5.2.2	Vitamin-D-Hormon.....	22
1.5.2.3	Alkalische Knochenphosphatase.....	23
1.5.2.4	Alkalische Phosphatase.....	23
1.5.2.5	L- γ -Glutamyl-Transferase, γ GT.....	23
1.5.2.6	Calcium.....	23

2 Fragestellung	24
3 Material und Methoden	25
3.1 Material	25
3.1.1 Patienten	25
3.1.2 Medikation	26
3.1.3 Dialyse	26
3.1.4 Gewinnung, Sammlung und Asservierung der Proben	27
3.1.4.1 Dialysat und Urin	27
3.1.4.2 Serum	27
3.2 Methoden	28
3.2.1 Freie Pyridinium-Cross-links	28
3.2.2 Intaktes Parathormon im Plasma	29
3.2.3 Calcidiol, 25(OH)-Vitamin-D ₃	30
3.2.4 Calcitriol, 1, 25(OH) ₂ -D ₃	30
3.2.5 Alkalische Knochenphosphatase	30
3.2.6 Alkalische Phosphatase	31
3.2.7 L-γ-Glutamyl-Transferase, γGT	31
3.2.8 Ionisiertes Calcium	31
3.2.9 Kreatinin	32
3.2.10 Knochendensitometrie	32
3.2.11 Statistik	32
4 Ergebnisse	34
4.1 Wiederauffindungsraten im Aufstockungsversuch	34
4.2 Doppelbestimmungen	34
4.2.1 Doppelbestimmungen für Serum und Urin	34
4.2.2 Doppelbestimmungen für Kontrollen „low“ und „high“	34
4.3 Verteilung der freien Cross-links Pyd + Dpd in den Dialysaten	35
4.4 Zirkadianer Rhythmus	36
4.5 Clearance von Cross-links und Kreatinin	37
4.5.1 Gesamt-Clearancerate der Cross-links	37
4.5.2 Korrelation zwischen Cross-link- und Kreatinin-Clearance im Dialysat	38
4.6 Deskription der Knochenstoffwechselfparameter	38
4.6.1 Cross-links	40
4.6.1.1 Cross-links kreatininkorrigiert	40
4.6.1.2 Cross-links nicht-kreatininkorrigiert	40
4.6.2 Konventionelle Knochenstoffwechselfparameter in Serum bzw. Plasma	40
4.6.3 Knochendichtemessung	40
4.7 Korrelationen	41
4.7.1 Korrelationen (Tabelle 8, Seite 44) zwischen den Cross-links in Dialysat oder Serum, kreatininkorrigiert, mit den anderen Knochenstoffwechselfparametern	41
4.7.2 Korrelationen (Tabelle 9, Seite 45) zwischen den Cross-links in Dialysat und Urin oder Serum, nicht-kreatininkorrigiert, mit den anderen Knochenstoffwechselfparametern	44
5 Diskussion	46
5.1 Anmerkungen zur Studiendurchführung	46

5.1.1 Krankheit und Therapie	46
5.1.2 Immunoassay zur Bestimmung von freiem Pyridinolin und Deoxypyridinolin.....	46
5.1.3 Menge und Konzentration, eine Begriffserläuterung	47
5.2 Aufstockungsversuche, Doppelbestimmungen, Intra- und Inter-Assay-Variation	47
5.2.1 Kreuzreaktivität	48
5.2.2 Gewebespezifität	48
5.3 Zirkadianer Rhythmus	48
5.3.1 Ursachen.....	49
5.3.2 Einflüsse der anti-resorptiven Therapie	50
5.3.3 Empfehlung für die Therapie.....	51
5.3.4 Zirkadianer Rhythmus im Serum	51
5.3.5 Empfehlung für die Probengewinnung.....	51
5.4 Cross-links in Serum, Dialysat und Urin	52
5.4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	52
5.4.1.1 Clearance von Cross-links und Kreatinin im Dialysat.....	52
5.4.1.2 Serum	52
5.4.1.3 Dialysat und Urin.....	52
5.5 Retention oder Resorption?	53
5.6 Verteilung und Clearance der Cross-links	54
5.7 Degradation der Cross-links	55
5.8 Parathormon.....	56
5.8.1 PTH und Serum-Cross-links	56
5.8.2 PTH und Cross-links im Dialysat und Urin	57
5.8.3 Empfehlung.....	58
5.9 Knochendichte.....	58
5.9.1 Knochendichte und Cross-links im Serum	58
5.9.2 Knochendichte von Femurhals, absolut, in Prozent und Standardabweichung als T-Score	59
5.9.3 Kortikaler und trabekulärer Knochen	60
5.9.4 Empfehlung.....	60
5.10 Vitamin-D-Hormon, Calcidiol und Calcitriol.....	61
5.11 Knochenspezifische alkalische Phosphatase	62
5.12 Calcium.....	63
6 Zusammenfassung und Nachwort	65
6.1 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse	65
6.2 Nachwort.....	65
7 Abkürzungsverzeichnis	67
8 Quellenverzeichnis	68

1 Einleitung

1.1 Therapieformen

Die terminale Niereninsuffizienz ist häufig das Endstadium verschiedener renaler Grunderkrankungen. Diese Diagnose erfordert gemeinsame Überlegungen von Arzt und Patient und die Entscheidung für eine die Nierenfunktion zu erhaltende bzw. ersetzende Therapie.

Die Transplantation mit einem vollständigen Nierenersatz als Optimum der therapeutischen Möglichkeiten steht jedoch nicht jedem Betroffenen offen. Daher bietet sich die Dialyse als eine therapeutische Alternative an.

Die Dialyse ahmt den Wirkmechanismus der Niere nach. Dem Körper werden sowohl die urämischen Toxine entzogen, als auch der gestörte Wasser- und Elektrolythaushalt korrigiert. Arzt und Patient können wahlweise die Anwendung der Hämodialyse (HD) oder der Peritonealdialyse (PD) diskutieren. Bei der weitgehend bekannteren Hämodialyse wird das Blut extrakorporal, d. h. außerhalb des Körpers, über eine künstliche Membran gegen eine Dialyselösung dialysiert.

1.1.1 Peritonealdialyse

Bei der Peritonealdialyse, auch als Bauchfelldialyse bezeichnet, wird das Blut über die peritonealen Kapillaren gegen eine intraperitoneal instillierte Dialyseflüssigkeit dialysiert. Die Anfänge der PD lagen bereits in den zwanziger Jahren, ihre Renaissance begann 1976 mit der Vorstellung einer neuen PD-Technik durch Popovich et al. (1, 2, 3) die 1979 durch Oreopoulos et al. (4) weiter verbessert wurde.

Man unterscheidet mittlerweile zwischen mehreren unterschiedlichen Verfahren:

1. „Continuous ambulant peritoneal dialysis“ (CAPD), kontinuierliche ambulante Peritonealdialyse

Der Patient dialysiert gantztägig über 24 Stunden, indem er in den Zeiten zwischen 6 und 7 Uhr, 11 und 13 Uhr , 17 und 19 Uhr, sowie zwischen 22 und 23 Uhr einen Beutelwechsel, d. h. den Austausch der bereits instillierten Flüssigkeit gegen eine neue, vornimmt (5).

2. „Automated continuous peritoneal dialysis“ (ACPD), automatisierte kontinuierliche Peritonealdialyse

Die Dialysatwechsel erfolgen automatisch-maschinell mit einem „cycler“ während der Nacht. Bleibt das Bauchfell tagsüber trocken, spricht man von „nocturnal intermittent peritoneal dialysis“ (NIPD), intermittierende nächtliche Peritonealdialyse. Wird tagsüber Dialysatflüssigkeit im Bauchraum belassen, heißt das Verfahren „continuous cyclic peritoneal dialysis“ (CCPD), kontinuierliche zyklische Peritonealdialyse.

3. „Continuous cyclic dialysis“ (CPD), kontinuierliche Peritonealdialyse

Diese Form der Dialyse ähnelt im Procedere der Hämodialyse. Der Patient sucht mehrmals pro Woche seine Dialyseambulanz auf, wo er unter fachkundiger Betreuung dialysiert wird.

1.1.2 Untersuchungen während der Dialyse

Die Grundlage zur Entscheidung für ein PD-Verfahren und zur Festlegung des Dialyseregimes bildet der „peritoneal equilibration test“ (PET). Er ermöglicht Aussagen über die Filterfunktion, sowie über die Transporteigenschaften des Peritoneums bezüglich Harnstoff, Kreatinin und Glucose (5, 6).

Die „batch collection“ (BC) prüft dagegen die Effektivität der Entgiftung an kleinmolekularen Stoffen. Dabei werden aus dem 24-Stunden-Sammelurin und den Dialysatausläufen über 24 Stunden Proben für die Bestimmung von Labor-parametern wie z. B. Harnstoff und Kreatinin entnommen, die ausgeschiedenen Urin- und abgelassenen Dialysatmengen bestimmt und aufgezeichnet und das Körpergewicht bzw. die Körpergröße festgehalten. Mit Ablauf des Sammelzeitraums erfolgt am darauffolgenden Morgen eine Blutentnahme, die ebenfalls zur Bestimmung von Laborwerten dient.

Aus den gewonnenen Größen werden die wöchentliche Kreatinin-Clearance, die Harnstoff-Clearance, ausgedrückt als KT/V , und die „normalized protein catabolic rate“ (NPCR) berechnet. Diese Dialysevariablen sind unabhängige und signifikante Parameter für Voraussagen über den klinischen Ausgang in der Dialyse-Behandlung (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13).

1.2 Metabolische Vorgänge am Knochen

Das Gewicht von hydratisiertem Knochen bestimmt sich zu annähernd 60 % durch seinen Mineralgehalt und darin wiederum zu 38 % durch seinen Anteil an Calcium. Der nicht-mineralisierte Anteil umfaßt Fett, Kollagen und Wasser. Die Zusammensetzung der Knochenminerale variiert nur geringfügig. Der nicht-mineralisierte Anteil dagegen variiert individuell und über bestimmte Zeiträume (14).

Der Mechanismus von Osteoblasten und Osteoklasten ist als „coupling phenomenon“ beschrieben. Osteoblasten entstammen einer multipotenten, mesenchymalen Precursor-Zelle im Knochenmark. Osteoklasten leiten sich von hämatopoetischen Precursor-Stammzellen der Monozyten-Makrophagen-Linie ab (15, 16). Zur Zeit gibt es zunehmend Hinweise auf die Relevanz lokal produzierter Wachstumshormone und Zytokine in der Steuerung und Kontrolle von Knochenformation- und resorption. Systemische Hormone greifen in gemeinsamer lokaler Interaktion mit lokalen Modulatoren, u. a. Interleukine (IL), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), „epidermal growth factor“ und verschiedene „colony stimulating factors“, in den Knochenstoffwechsel ein (15, 16, 17, 18, 19).

Der Begriff „modelling“ beschreibt den Vorgang der gleichzeitigen Knochen-neubildung und des Knochenabbaus, der jeweils an lokal unterschiedlichen Stellen stattfindet. Dabei verändert sich die mikroskopische Knochenfeinstruktur und die makroskopische Knochengrobstruktur. „Remodelling“ dagegen charakterisiert das geordnete

Wechselspiel von An- und Abbau (20). Die Knochenneubildungsvorgänge am adulten Knochen funktionieren jedoch mehrheitlich nach diesem Prinzip, das einen Ersatz von resorbierten Knochen durch neuen Knochen vorsieht. Es verbindet die beiden Prozesse von Knochenformation und Knochenresorption miteinander (17, 21, 22). Die Dauer eines Knochenumbauzyklus beträgt im Durchschnitt mindestens 130 Tage (23).

1.3 Formen der metabolischen Knochenerkrankung

1.3.1 Renale Osteopathie

Die renale Osteopathie (RO), man spricht auch von renaler Osteodystrophie, geht mit einer Veränderung der Knochenstruktur, die auf eine Störung in der Calcium-Homöostase zurückgeht, einher. Sie wird häufig im Rahmen von Nierenerkrankungen, z. B. bei chronischer Niereninsuffizienz oder bei Langzeitdialysepatienten diagnostiziert (24). Ihre Entstehung ist auch für CAPD-Patienten dokumentiert, jedoch mangelt es an Langzeitinformationsdaten (25). Die nachweisbare qualitative Veränderung des Knochens und sein morphologisches Bild, das sich in Form von Rachitis, Osteomalazie, Fibroosteoklasie oder kombiniert als Mischbild manifestieren kann, zeigt unterschiedliche Schweregrade mit unterschiedlicher klinischer Symptomatik (26). Es kommt zu einer Osteoidose, einer Zunahme nicht-mineralisierten Knochengewebes, infolge von Mineralisationsstörungen oder einer Steigerung im Knochenanbau (20, 23). Das Resultat ist damit eine höhere Rate an Matrixproduktion als an Matrixmineralisation (27). Zu den möglichen Ursachen ihrer Entstehung gehören Störungen im Knochenstoffwechsel, eingeschlossen die Vitamin-D-Stoffwechselstörung mit einer Zunahme der Knochenformationsrate, die Ausbildung eines sHPT, und daneben das Vorkommen von den Mineralisationsvorgang hemmenden oder darauf toxisch einwirkenden Substanzen, wie Aluminium, Eisen und Fluor, sowie ein gestörter β -2-Mikroglobulin-Metabolismus und wiederholt auftretende metabolische Azidosen (26, 27). Obwohl für PD-Patienten im Vergleich zu HD-Patienten eine bessere Kontrolle des Calcium- und Phosphatstoffwechsels angenommen wird, ist die Entwicklung und die Manifestation einer RO für dieses Patientenkollektiv immer noch von essentieller Bedeutung (28).

1.3.2 Sekundärer Hyperparathyreoidismus

Ein manifester sHPT resultiert aus den kumulativen Effekten von Phosphatretention, Calcitriolmangel, Hypocalcämie, mit einer Erhöhung von PTH und AP, sowie einer abnormen Nebenschilddrüsenfunktion und Skelettresistenz gegenüber der Wirkung von PTH (25, 29, 30, 31). Die Endorganschäden eines sHPT und seine ungünstigen klinischen Folgen sind neben metastatischen Verkalkungen, Schäden des zentralen Nervensystems, des Knochenmarks und des Herzmuskels, vor allem auch die Entstehung der oben beschriebenen renalen Osteopathie und insbesondere der Fibroosteoklasie, die durch eine Zunahme der Osteoklasten gekennzeichnet ist.

1.3.3 „High- und Low-turnover“

„High-turnover“ bezeichnet einen Zustand, bei dem die Anzahl und Größe der sich aktiv im Umbau befindlichen Skelettabschnitte zunehmen. Es werden Knochen-bälkchen resorbiert, und ein vollständiger Ersatz abgebauten Knochens ist nicht gegeben. Daher kann relativ kurzfristig ein Knochenmasseverlust (32) mit der Möglichkeit eines irreversiblen Knochenverlustes eintreten, wie das z. B. für das Krankheitsbild des sHPT typisch ist.

Der Low-turnover, auch als adynamische Knochenerkrankung bezeichnet, beschreibt einen in der Zahl und Größe der Umbaueinheiten verminderten Knochenstoffwechsel. Trotz gravierender Störungen im Coupling-Mechanismus ist der Knochenmasseverlust im Vergleich zu einem High-turnover jedoch verlangsamt. Die Ausmaße, die ein Knochenmasseverlust einnehmen kann, werden demnach von der Anzahl der beteiligten Umbaueinheiten, auch „bone remodelling units“ (BRU) und dem Grad des Couplings innerhalb dieser BRU bestimmt (21). Störungen dieser Komponenten können zu einem pathologischen Knochenmasseverlust führen, z. B. kann die Absenkung der PTH-Konzentration durch hohe Calcitriolspiegel die Entwicklung der adynamischen Knochenerkrankung (Low-turnover) induzieren (33).

1.4 Pyridinium-Cross-links, Pyridinolin und Deoxypyridinolin

Skeletterkrankungen, allgemein und speziell bei der Dialysebehandlung, gewinnen vor dem Hintergrund sich ändernder Altersstrukturen und therapeutisch-technisch ausgereifteren Dialyseverfahren zunehmend an medizinischer und sozioökonomischer Bedeutung. Damit besteht ein, nicht nur medizinisch gewachsenes, Interesse an der Entwicklung effektiver Verfahren für Screening, Diagnose und Prävention (34).

Die gängigen Serumparameter haben einen entscheidenden Beitrag im Verständnis von Knochenstoffwechselstörungen dieser Art geleistet. Obwohl ihnen immer noch ein Aussagewert in der Überwachung akuter Knochenstoffwechseländerungen zugesprochen wird, sind die Resultate mit der entsprechenden Sorgfalt zu betrachten (14), um Fehlinterpretationen auszuschließen (35).

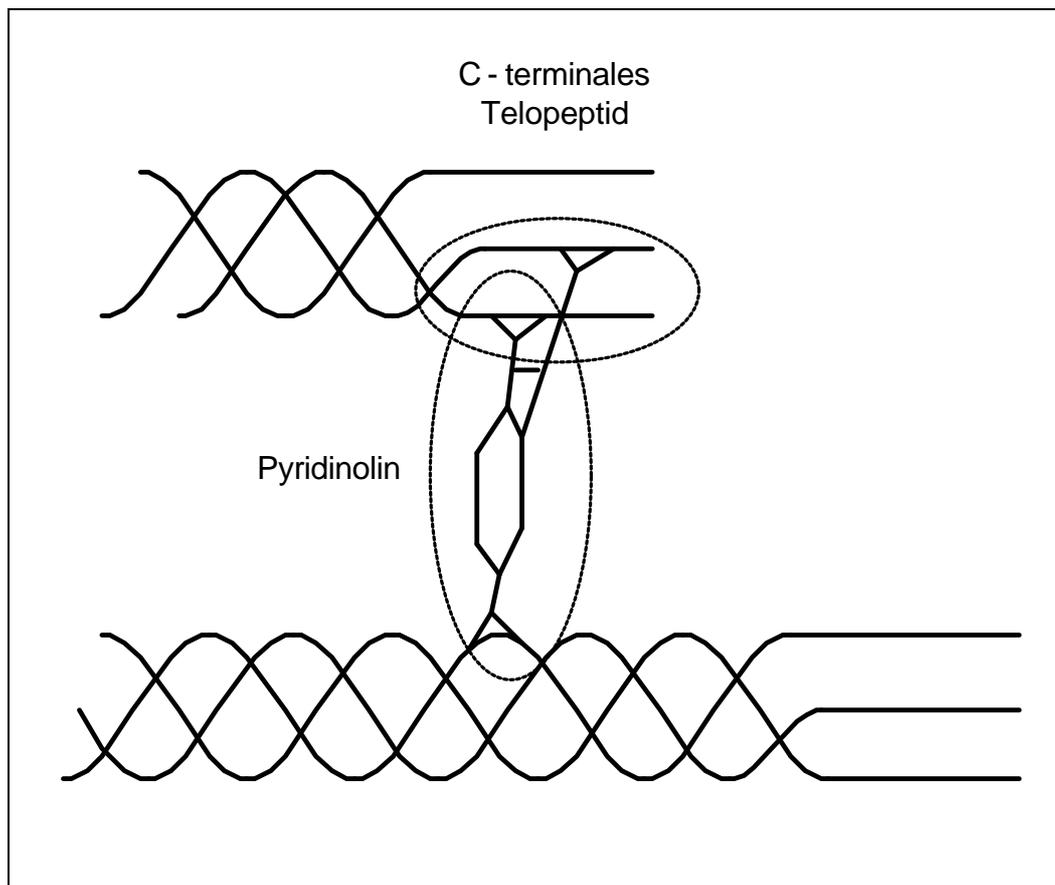
Das Ausmaß, mit dem sich ein neuer Marker in der klinischen Praxis durchsetzt und Diagnose- bzw. Interventionsentscheidungen beeinflusst, hängt neben sozioökonomischen Überlegungen, wie Kosten-Nutzen-Rechnung (36) und einem breiten Anwendungspotential, vor allem von seiner Überlegenheit gegenüber bisher angewendeten routinefähigen diagnostischen Methoden ab. Er zeichnet sich zusätzlich durch einen einfachen und reproduzierbaren labortechnischen Nachweis aus, verhält sich unter bekannten Bedingungen während eines Abfalls oder Anstiegs adäquat und korreliert signifikant mit anderen Markern der Knochenresorption (37).

Hydroxypyridinium-Verbindungen scheinen gegenüber herkömmlichen Parametern des Knochenstoffwechsels erhebliche Vorteile zu besitzen. Z. B. weisen Calcium-Messungen eine deutlich niedrigere Sensitivität als Cross-link-Bestimmungen auf (35, 38, 39). Unter der Annahme, daß die gängigen Parameter insgesamt eine große Variationsbreite innerhalb ihrer Meßergebnisse aufweisen, wird momentan der Assay zur Bestimmung der Cross-links als der mit dem höchsten Maß an Reliabilität und der niedrigsten Variationsbreite im Vergleich (40, 41) beurteilt. Sie gelten bei der Bewertung von Stadium, Aktivität und Grad von skelettalen Erkrankungen als valide

(42,43). Darauf basiert auch die außergewöhnlich hohe Anzahl an Untersuchungen unter Verwendung der Pyridinium-Derivate. Aufgrund des breiten Spektrums ihrer klinischen Einsatzmöglichkeiten nimmt ihre diagnostische Bedeutung noch zu (44).

1.4.1 Cross-links, Struktur und Funktion

Das Grundgerüst der meisten Binde- und Stützgewebe im Körper, dazu zählt auch das Knochengewebe, bilden kollagene Fasernetze. Ihre mechanische Stabilität beruht neben der Ausbildung hydrophober und elektrostatischer Kräfte, die zwischen einzelnen Molekülen bestehen, auf Quervernetzungen durch kovalente, spezifische intra- und intermolekulare Brückenmoleküle, den „cross-links“ (40).

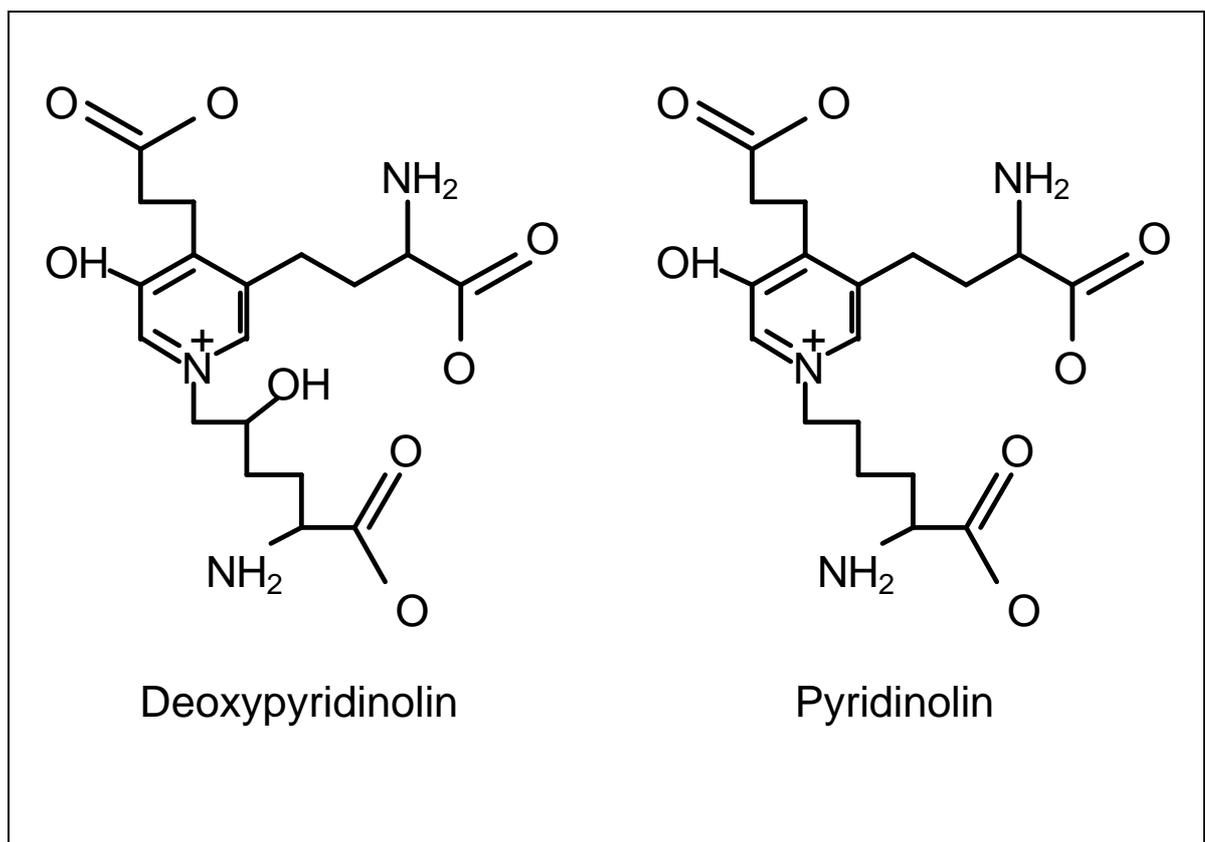


Das Kollagen besteht aus einer durch zwei α -(I)-Ketten und einer α -(II)-Kette gebildeten Doppelhelix (45). Es sind mindestens vierzehn Kollagentypen beschrieben, die sich in Primärstruktur, Quervernetzung und posttranslationaler Modifikation unterscheiden. Ihr Grundaufbau, aus einer helikalen Domäne, einer Propeptiddomäne und einer Telopeptiddomäne, ist jedoch identisch.

Die Knochenproteinmatrix wird zu 85 - 90 % von Kollagen Typ I gebildet (46). Die Ausbildung von Cross-link-Verbindungen zwischen benachbarten Kollagenketten in der extrazellulären Matrix repräsentiert dabei eine besondere Modifikation. Diese Quervernetzung entsteht in einem zeitabhängigen Prozess, der einige Tage bis Wochen andauert, und in Abhängigkeit vom Ausmaß der Kollagenreife durch die Wirkung des Enzyms Lysyloxidase. Lysyloxidase wirkt dabei auf die spezifischen Lysin- bzw. Hydroxylysinreste im Bereich der Telopeptidregion, sowie der Helix

benachbarter Kollagenmoleküle (47). Nach der enzymatischen Oxidation der Lysyl- oder Hydroxyllysylreste zu Aldehyden setzt sich die Bildung von bivalenten Cross-links durch die Reaktion der bereits entstandenen Aldehyde mit anderen Lysyl- oder Hydroxyllysylresten und unter Ausbildung einer Schiff'schen Base fort. Mit der Zeit entstehen nicht-reduzierbare Verbindungen multivalenter Struktur (40, 48). Die Anzahl der Hydroxilierungen determiniert die Form der Cross-link-Verbindung, wobei sich Knorpel- und Knochengewebe vor allem durch einen hohen Anteil an Hydroxylysin auszeichnen. Das „cross-linking“ besteht dann entweder zwischen der N-terminalen oder der C-terminalen Telozeptidregion und der helikalen Struktur eines Kollagenmonomers.

Cross-links lassen sich demnach nicht nur in Typ I-Kollagen, sondern auch in Typ II- (49), Typ III- und Typ IV-Kollagen nachweisen {2480}. In den Stützgeweben von Knochen und Knorpel finden sich dabei vor allem die 3-Hydroxypyridinium-Derivate, Pyridinolin (Pyd) und Deoxypyridinolin (Dpd). Diese trifunktionalen Cross-links fungieren als Brückenverbindung zwischen drei Polypeptidketten zweier benachbarter Kollagenpolymeren (51, 52).



Pyridinolin als Hauptbestandteil mit einem Molekulargewicht von 400 Dalton (D), gebildet aus drei Hydroxyllysylresten (46), entsteht sowohl aus zwei miteinander reagierenden bifunktionalen Keto-amino-Cross-links (53), als auch durch die Kondensation von Hydroxyllysinaldehyden mit einem bereits bestehenden bifunktionalen Ketoamin-Cross-link. Der verhältnismäßig niedrige Anteil an Deoxypyridinolin, bestehend aus einem Lysyl- und zwei Hydroxyllysylresten, entsteht durch eine

inkomplette Hydroxylierung der Lysinreste in der Helix (47). Das molare Verhältnis von Pyridinolin zu Deoxypyridinolin im Knochen und Dentin Erwachsener beträgt 3,5 : 1 bzw. 4 : 1 (54), dagegen in allen anderen Bindegeweben ungefähr 10 : 1 (55).

1.4.2 Freisetzung der Pyridinium-Verbindungen

Während der Kollagenolyse von Knochen durch die Osteoklasten wird die kollagene Matrix proteolytisch degradiert. Dabei werden die bestehenden Quervernetzungsstrukturen als Cross-link-Derivate Pyridinolin und Deoxypyridinolin freigesetzt.

1978 erbrachten Fujimoto et al. (52) den Nachweis von Pyridinolin, und 1982 wurde die Struktur von Deoxypyridinolin durch Barber et al. aufgeklärt (56). Aufgrund ihrer komplexen Struktur werden sie vom Organismus nicht weiter metabolisiert, sondern gelangen nach ihrem Abbau in die Blutbahn und werden anschließend in freier, glykolisierter oder peptidgebundener Fraktion mit dem Urin ausgeschieden (19, 57, 58). Deshalb eignen sich Pyridinium-Verbindungen als Marker der Kollagendegradation von Knochen (51, 52), allen voran Pyd und Dpd, die sich durch eine hohe Gewebe- und Prozeßspezifität auszeichnen (35, 43, 59, 60).

Die nichtreduzierbaren, fluoreszierenden trivalenten Hydroxypyridinium-Verbindungen Pyd und Dpd verfügen somit über einen einzigartigen Vorteil. Sie sind Endprodukte der Lysyloxidase-vermittelten reifen Skelettkollagenproduktion und resultieren nicht als biosynthetische Intermediärprodukte aus dem Abbau unreifen oder neu synthetisierten Kollagens (46, 59, 61). Zwar ist der Nachweis von Pyd auch für viele andere Bindegewebe des menschlichen Organismus, eingeschlossen Knochen, Knorpel, Blutgefäße, Faszien, Bänder, Intestinum, Muskel und Leber erbracht worden (62, 63), jedoch fehlen beide Derivate in den Kollagenfasernetzen der Haut, der Sklera oder der Kornea (59).

Da im Vergleich zum Knochen der Stoffwechsel in anderen Geweben niedriger ist (64), geht man davon aus, daß der im Urin gemessene Anteil vor allem aus abgebauten Knochengewebe stammt. Tatsächlich weist das Knochenkollagen wie auch andere Bindegewebe, z. B. in Sehnen, Bändern, Faszien und Blutgefäßen (43), eine niedrige Konzentration an Pyridinium-Resten aus. Die Menge an Pyd im Knochen beträgt rund 0,3 mol/mol Kollagen und damit weniger als 1/5 des Knorpelkollagens. Die Spezifität für resorptive Prozesse wurde in einer radioisotopischen Untersuchung von Eastell et al. (65) und in einer histomorphometrischen Studie von Delmas et al. belegt (66). Da die Cross-links ausschließlich während der fibrillären Kollagenreifung im Gegensatz z. B. zu Hydroxyprolin entstehen (43, 54, 67, 68), wird die Messung im Urin als ein sensitiver Index für die Knochenresorption angesehen (69,70).

1.4.3 Hydroxyprolin

Die früher gängige Bestimmung von Hydroxyprolin als Marker von Knochenresorptionsprozessen birgt viele Nachteile (71). Sie gilt heute als überholt (62, 67), so daß bereits die Aussagefähigkeit von Hydroxyprolin-Assays über Korrelationsanalysen mit Pyd bzw. Dpd bestimmt wird (72).

Hydroxyprolin entsteht nicht nur bei der Degradation reifer Kollagenvorstufen, sondern auch im Rahmen des Abbaus von Precursor-Vorstufen während der Kollagenneubildung (67). Neben der Freisetzung dieser Aminosäure im Zuge einer Überproduktion bei der Neosynthese von Pro-Kollagen, und deshalb auch während der Degradation neugebildeter und sofort wieder metabolisierter Moleküle nachweisbar, findet sich Hydroxyprolin nicht nur im Knochen, sondern auch im Kollagen anderer Gewebe, z. B. im Komplement C1q (233), im Elastin, sowie in den Acetylcholinesterasen. Es wird zu 90 % in der Leber metabolisiert (233, 234), und seine Ausscheidung ist in empfindlicher Weise von der Zusammensetzung der Nahrung abhängig (50, 69). Daraus ergibt sich eine erhebliche Variationsbreite in den Meßwerten (69) mit einem Mangel an Spezifität und Sensitivität. Daher sind die Korrelationen zwischen Cross-links und Hydroxyprolin bei niedrigen Knochenstoffwechselraten und damit verbundenen geringen Ausscheidungswerten schwach (42, 54, 69, 71, 235). Der Einsatz von Hydroxyprolin als Knochenstoffwechsel-Marker eignet sich für ausgeprägte Knochenstoffwechselstörungen. In diesen Fällen kann der Anteil der nicht-knochenspezifischen Proline als niedrig angesehen werden (69,72).

1.4.4 HPLC und ELISA im Vergleich

Für die Messung der Cross-links stehen prinzipiell zwei Methoden zur Verfügung, der „high-performance liquid chromatography“-Assay (HPLC), und der „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA). Das gemeinsame Ziel ist die Messung der Cross-links. Sie arbeiten jedoch mit den unterschiedlich charakteristischen Eigenschaften der Pyridinium-Verbindungen. Beide Methoden wurden primär für den Nachweis und die Bestimmung der Cross-links im Urin entwickelt. Dieses ist bei der nun folgenden Darstellung von Untersuchungsergebnissen zu beachten.

1.4.4.1 HPLC

Die HPLC basiert auf der stabilen Struktur der zyklischen Pyridinium-Verbindungen und der sich daraus ergebenden natürlichen Fluoreszenz (48, 73, 74). Sie gilt als der „gold standard“ unter beiden Meßmethoden, weil durch ihre hohe Sensitivität Messungen im pmol-Bereich möglich sind (60, 75).

Die Crosslink-Fraktion wird durch eine vorgeschaltete Partitions-Chromatographie aufgetrennt; nach Hochdruck-Flüssigchromatographie, mit oder ohne vorgeschaltete Säurehydrolyse, können die Pyridinium-Verbindungen anschließend nach den ihnen eigenen Fluoreszenz-„peaks“ quantitativ erfaßt werden. Die Messung erfolgt fluorimetrisch, Pyd und Dpd sind über einen einzigen Lauf getrennt bestimmbar (68, 74, 76, 77). Ohne eine vorgeschaltete Säurehydrolyse werden ausschließlich Cross-links der peptidgebundenen Fraktion erfaßt. Mit der Durchführung einer Säurehydrolyse erfolgt die Konversion der peptidgebundenen Fraktion in freie, und damit auch fluoreszierende Derivate, die jetzt ebenfalls bestimmt werden können. Die HPLC erfaßt die

unterschiedlichen Fraktionen, die für eine Beurteilung gerade erforderlich sind, simultan (46). Ohne Vorschaltung einer Säurehydrolyse zeigte sich ein Anteil von 40 - 45 % an freien Cross-links im Urin (57, 59, 78, 79, 80). Der mit der HPLC nachgewiesene Anteil an Pyd im Urin war innerhalb von Gruppen, bestehend aus Gesunden bzw. aus Patienten mit Osteomalazie, Hyperparathyreoidismus und Hyperthyreoidismus konstant, wobei jedoch in Relation zu Kreatinin für das Krankengut signifikant höhere Werte in der Cross-link-Ausscheidung gemessen wurden (81).

Die HPLC weist aber auch über eine Reihe von Nachteilen aus:

Ihre Durchführbarkeit ist zeitaufwendig, teuer, arbeitsintensiv, sowie komplex, und deshalb vor allem großen Laboratorien vorbehalten (43, 46, 58, 60, 64, 71). Der technische Aufwand und die Störanfälligkeit sind hoch. Z. B. gelten die verwendeten Standards als nur bedingt lichtstabil (82, 83) und dadurch mit Fehlern behaftet. Zusätzlich gibt es Hinweise auf eine mögliche Zerstörung peptidgebundener Cross-links durch die Säurehydrolyse (43, 58, 84). Eyre et al. (43) führen unveröffentlichte Ergebnisse an, die auch unter Vermeidung einer direkten Säurehydrolyse für einen Verlust von Cross-links von 20 - 60 % im Urin sprechen. Die Bestimmung der freien Dpd-Fraktion im Hydrolysat ist auch deshalb nicht einfach, weil sich aus der Nähe des Dpd-Peaks zum Pyd-Peak und dem im Vergleich zum Pyd-Peak niedrigen Dpd-Peak Interferenzen bilden können. Sie täuschen eine Überhöhung der Resultate vor (67).

Mehrheitlich basiert das erhobene Datenmaterial auf Untersuchungen unter Anwendung einer HPLC. Trotzdem warnen Seibel et al. (64) vor dem Hintergrund einer mangelhaften Standardisierung und der Existenz mehr oder weniger vergleichbarer Basiswerte vor einem unkritischen Gebrauch oder einer vorschnellen Interpretation gewonnener Informationen. Dieses Argument der nicht vorhandenen Standardisierung wird ebenfalls von einer ganzen Reihe weiterer Autoren angeführt (40, 43, 46, 54, 58, 73, 76, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92). Selbst 1996 thematisiert Robins et al. (93) diesen Aspekt. James et al. (46), sowie Kent et al. (83) bemängeln ebenfalls den fehlenden synthetischen stabilen internen Standard für die HPLC.

Diese Problematik war Anlaß zur Entwicklung und Evaluierung neuer Nachweismethoden, den Immunoassays, zur Anwendung in der klinischen Routine und zum „follow-up“ bei antiresorptiven Therapien (19).

1.4.4.2 ELISA

Die zur Zeit verfügbaren immunologischen Assays messen, ohne Vorschaltung einer Säurehydrolyse, ausschließlich die freie Fraktion der Pyridinium-Verbindungen in nativer Form im Urin, wahlweise mit dem Nachweis von Pyd und Dpd und sehr kleinen Peptiden (Molekulargewicht < 1000 D) oder nur von Dpd (94, 95, 96). Dieser Dpd-spezifische ELISA erfaßt nach Robins et al. (94) eine Hauptkomponente im Urin, weil der Anteil von DPD an den Gesamt-Cross-links angeblich 40 - 50 % beträgt. Das Meßprinzip basiert insgesamt auf der Verwendung von Antikörpern in nativ eingesetztem Urin, die gegen den Pyridinium-Ring gerichtet sind (97, 98, 99).

Andere Assays erkennen als Antigen das „carboxy-terminal telopeptide of type I collagen“ (ICTP) der peptidgebundenen Fraktion im Serum (231, 232) oder Antikörper gegen das INTP, das quervernetzte aminoterminal Kollagen-Typ-I-Telopeptid im Urin (37, 100) bzw. gegen die lineare Sequenz des C-Telopeptids (101).

Vielfältige Untersuchungen, älteren und jüngeren Datums, haben signifikante Korrelationen zwischen dem ELISA und der HPLC aufzeigen können (46, 94, 97, 102, 103). Die Ergebnisse einer Multicenter-Studie, die eine breit angelegte Bewertung von Dpd, gemessen mit einer HPLC bzw. mit einem ELISA, anhand von Korrelationskoeffizienten erbringen soll, steht noch aus (46). Eine Einschränkung der Korrelation mit der HPLC wurde nach Bildung von Untergruppen unterschiedlicher Teilkonzentrationen innerhalb der Cross-link-Ausscheidung beobachtet (104). Unter der Annahme, daß der Immunoassay die freie Crosslink-Fraktion und die niedrigmolekularen Anteile (<1000 D) mißt, die gemeinsam 80 % der Gesamtfraktion ausmachen, würde das schlechte Ergebnis durch eine mögliche Kreuzreaktion des Antikörpers mit interferierenden Inhaltsstoffen im Urin erklären.

1.4.5 Freie und peptidgebundene Cross-links

Das Verhältnis von freier zu peptidgebundener Fraktion (105) und das Verhältnis von freier Fraktion zur Gesamtfraktion (80, 106) gelten als konstant. Die Fraktionen korrelieren sowohl im Normalkollektiv als auch in einem Kollektiv, das aufgrund einer metabolischen Knochenerkrankung bzw. der Menopause erhöhte Spiegel aufweist (59). Für diagnostische und epidemiologische Ziele ist die freie Fraktion zu bestimmen (59, 106).

1983 vermuten Fujimoto et al. (57), daß 40 % der Cross-links als freie Fraktion in den Urin ausgeschieden werden; 1995 wird immer noch ein Verhältnis, frei zu gebunden, von 40 zu 60 % postuliert (105). Die Untersuchung von Robins et al. (59) konstatiert einen ähnlich hohen Anteil freier Cross-links und signifikante Korrelationen von Pyd und Dpd zur Cross-link-Gesamtmenge.

Eyre et al. (62) ermitteln 1995 ein Verhältnis von gebundenen zu freien Cross-links von 2 :1, das sich im Ergebnis mit einer Untersuchung von Abbiati et al. (80) aus dem Jahr 1993 deckt. Tatsächlich enthält der Gesamtpool durchschnittlich einen niedrigmolekularen, proteinfreien Anteil von etwa 35 - 45 % und zu 55 - 65 % an Peptidreste gebundene Derivate (46, 59, 98, 107, 108). Die peptidgebundene Fraktion enthält nach Robins et al. (109) vor allem Peptide von sehr niedrigem Molekulargewicht. Daniloff et al. (108) beziffern die Peptidfraktion mit einem Molekulargewicht > 3500 D auf ungefähr sieben Prozent. Withold (50) schreibt den peptidgebundenen Cross-links ein Molekulargewicht von 1000 bis mehr als 10000 D zu.

Seibel et al. (97) bestimmen mittels HPLC einen Anteil von freiem Pyd am Gesamtpyridinolin von 37 % und von freiem Dpd am Gesamtdeoxypyridinolin von 38 %. Sie weisen gleichzeitig auf eine hohe Korrelation zwischen Werten der freien Fraktion zur Gesamtfraktion hin, die sich in einer Messung mit einem ELISA bestätigten. Schmidt-Gayk et al. (38) geben bei gesteigerter Knochenresorption den Anteil für freies Dpd mit 32 % und für peptidgebundes Dpd mit 68 % an.

Das konstante Verhältnis zwischen freier und peptidgebundener Fraktion ebnete den Weg für die Entwicklung immunologisch arbeitender Assays. Denn ein stabiles Verhältnis gilt für den Vergleich von Daten, die auf zwei verschiedenen Methoden basieren, als unabdingbar (46, 109). Es existieren jedoch einschränkende Hinweise,

daß eine Aufrechterhaltung dieser Fraktionsanteile nicht durchgängig gegeben ist (110). Z. B. steigt beim Morbus Paget, bei der Osteoporose oder bei der Hyperthyreose der Anteil der gebundenen Fraktion in der Ausscheidung an. Eine veränderte Turnover-Rate, sowie eine antiresorptive Therapie beeinflussen ebenfalls das Verhältnis im Anteil der freien zu peptidgebundenen Cross-links (111).

Garnero et al. (111) untersuchten unter diesem Aspekt die Auswirkungen einer Oestrogen- und Bisphosphonattherapie. Sie entdeckten, daß mit zunehmendem Knochen-Turnover der Anteil der freien Fraktion absinkt. Die Ausscheidung der freien Fraktion korrelierte dabei negativ mit der Gesamtfraktion. Eine Therapie wirkte sich dabei unterschiedlich aus. Die freie und die Gesamtfraktion fielen unter Oestrogen-Gaben ab, wohingegen die Bisphosphonate keine Absenkung der freien Fraktion induzierten.

In einer anderen Untersuchung sank das Verhältnis freier zu peptidgebundener Fraktion bei gesteigerter Knochenresorption von 55 % auf 32 % (38). Auch mit steigendem Alter scheint sich das Verhältnis von freien zugunsten der peptidgebundenen, höhermolekularen (> 10000 D) auf 15 - 20 %, verglichen mit 5 % bei jüngeren Erwachsenen an der Gesamtausscheidung, zu verlagern (102). Delmas et al. (103) ermittelten dagegen einen Anteil der freien Fraktion von 90 % an der Gesamtfraktion. Da der Anteil ansonsten eigentlich nur 40 % beträgt, schließt er eine zusätzliche Erkennung peptidgebundener Cross-links mit niedrigem Molekulargewicht, zusätzlich zu den freien Cross-links, im verwendeten ELISA nicht aus.

Trotzdem gelten die Pyridinium-Verbindungen, neben BAP als Marker der Knochenformation, als die momentan und auch zukünftig aussagekräftigsten Parameter zur Erfassung knochenresorptiver Vorgänge bei der Niereninsuffizienz (112, 113). Die Korrelationen zwischen freier und totaler Fraktion, zwischen HPLC und ELISA (99, 105) und sogar zwischen freier, mittels ELISA bestimmten Fraktion, und einer mit HPLC gemessenen Gesamtfraktion, gemessen auch vor dem Hintergrund metabolischer Knochenerkrankungen, waren wiederholt signifikant. Der konstante Anteil der freien Fraktion in der HPLC spricht für den Informationsgehalt der Cross-links und die hohe und einfachere diagnostische Anwendbarkeit demnach für die Verwendung eines Immunoassays (81). Da die Bezugsgröße HPLC immer noch als der „gold standard“ angesehen wird, gilt der ELISA als effizient und bietet sich als Alternative zur HPLC geradezu an (39,94).

Eine Studie von Delmas et al. (103) mit Gesunden und Morbus Paget-Patienten erhärtet diese Schlußfolgerung. Obwohl nicht Ziel der Untersuchung, zeigte sich zwischen der freien Pyridinium-Fraktion, gemessen mit einem ELISA, und der Gesamtfraktion, gemessen mit einer HPLC, eine signifikante Korrelation, genauso wie für beide Einzelderivate, Pyd und Dpd. Seibel et al. (97) postulieren ebenfalls die Verwendung eines ELISA, aufgrund einer engen Korrelation zwischen der im ELISA ermittelten freien Fraktion und der mit der HPLC gemessenen freien Fraktion bzw. der Gesamtfraktion. Die Überprüfung der freien Fraktion mit einem ELISA und der Gesamtfraktion mit einer HPLC, durch Robins et al. (81), ergab für die freien Cross-links einen Anteil von 43 %. Dieser Anteil erwies sich auch für Erkrankungen mit bekanntlich erhöhter Ausscheidung, wie Morbus Paget, Hyperparathyreoidismus, Osteomalazie und Hyperthyreoidismus als konstant. Seyedin et al. (98) bestätigen ebenfalls die Anwendbarkeit eines Immuno-Assays in der diagnostischen Routine. Sie

erbrachten den Nachweis, daß die Pyridinium-Verbindungen überwiegend, d. h. zu 38 % in freier, in glycolisierter oder an weniger als fünf Aminosäuren mit einem Molekulargewicht < 1000 Dalton gebunden, in den Urin ausgeschieden werden. Die peptidgebundenen Cross-links mit Molekulargrößen von > 1000 Dalton stellten mit 22 % den kleineren Anteil an der Gesamtfraction, wobei sich diese großmolekularen Peptide nicht durch die Dominanz einer bestimmten Spezies, sondern vor allem durch eine breite Heterogenität auszeichneten. Freies Pyd und freies Dpd reagierten ausgeprägt mit dem Antiserum, wohingegen glycolisierte, an Peptide mit einem Gewicht von > 1000 Dalton gebundene, sowie cross-link-ähnliche Verbindungen nur minimale Kreuzreaktionen zeigten. Mit einem Korrelationskoeffizient von 0,97 zur HPLC genügt der Assay den Ansprüchen klinischer Routinebedingungen. Eine der jüngsten Untersuchungen mit einem Immunoassay ergab Normwerte für die freien Cross-links von 8 - 24 nmol/ mmol Kreatinin bzw. 10- 28 nmol/ mmol Kreatinin im Urin, für gesunde Männer und für gesunde prämenopausale Frauen, respektive, (114). Für die Konzentrationen von Pyd und Dpd bei Gesunden werden Schwankungen innerhalb eng umschriebener Normbereiche angenommen (94, 115, 116).

1.4.6 Cross-links und Gewebespezifität

Das Verhältnis von Pyd und Dpd im Urin deckt sich mit der Wiederauffindung von Cross-links im Knochen (42, 71). Es bestehen keine zusätzlichen Hinweise auf Stoffwechselschritte zwischen ihrer Entstehung im Knochen und der Ausscheidung im Urin (85). Damit ist die logische, sowie berechtigte und naheliegende Schlußfolgerung erlaubt, einen Zusammenhang zwischen dem Ursprung ihrer Entstehung und den physiologisch-resorptiven Vorgängen am Knochen herzustellen (86, 71, 109, 117). Änderungen in den Ausscheidungsraten der Cross-links beruhen vor allem auf quantitativ veränderten Knochenresorptionsraten und nicht auf direkt im Knochen lokalisierten Veränderungen (116). Trotz unterschiedlicher Labormethoden bei der Probengewinnung und Analyse ergibt sich ein molares Verhältnis von 3 bzw. 4 : 1 von Pyd zu Dpd (55, 115, 116). Es zeigen sich signifikante Korrelationen bei Gesunden und Erkrankten zwischen kreatininkorrigierten und unkorrigierten Werten, auch innerhalb der freien Fraktion und der Gesamtfraction (46, 109, 115, 116, 118).

Der Nachweis lokaler Konzentrationsunterschiede in den Geweben, nicht nur in der Gesamtmenge der Pyridinium-Verbindungen, sondern auch für die Einzelderivate Pyd und Dpd (47, 109) stellen den obigen Zusammenhang jedoch infrage.

Pyd findet sich in Typ-I- und II-Kollagen, Dpd vor allem in Typ-I-Kollagen des Knochens (68). Knochen hat unter den Kollagen-Typ-I-reichen Geweben den niedrigsten Gehalt an Pyridinium-Verbindungen (55, 74). Für Pyd ergeben sich daher die höchsten Konzentrationen im Knorpel. Die Konzentration im Knochen ist dagegen als niedrig zu bewerten (47, 74). Die anfängliche Annahme, Dpd sei ausschließlich in Knochen und Dentin lokalisiert (74), wurde in verschiedenen Untersuchungen widerlegt. Signifikant vorhandene Mengen wurden auch in anderen, nicht-ossären Bindegeweben, wie von Aorta oder Bändern, nachgewiesen (59, 68, 69).

Dieser Nachweis signifikanter Mengen an Dpd, das unter bestimmten physiologischen und pathologischen Bedingungen nicht ursprünglich dem Knochen entstammt, läßt an der Nachweisspezifität der Cross-links zweifeln, zumal über den Stoffwechsel anderer

kollagener Gewebe wenig bekannt ist (43, 62). Jedoch plädiert man im allgemeinen trotz allem für die Verwendung der Pyridinium-Verbindungen als Marker der Knochenresorption. Denn nicht-knochenspezifisches Gewebe ist, mit einigen Ausnahmen, durch einen niedrigen Turnover charakterisiert (46, 69). Dagegen steht der generell hohe Stoffwechselumsatz von Knochen, nicht zuletzt auch bedingt durch die ausgeprägte Knochenmasse (59, 64, 107).

Daher ist nach Auffassung einiger Autoren Dpd, das sich durch ein streng begrenzt lokalisiertes Vorkommen auszeichnet, der zur Zeit spezifischste Marker (65, 67, 69, 71, 107, 116). Nach Arbault et al. (119) soll der Anteil an Dpd 20 % der Gesamt-Cross-links betragen. Obwohl man aufgrund einer höheren Knochenspezifität eher geneigt ist, Dpd als den Marker mit der höchsten Aussagekraft in der Bewertung von Knochenresorptionsvorgängen anderen Resorptionsparametern vorzuziehen, spricht die im Verhältnis zu Pyd geringe Konzentration dieses Cross-link-Derivates dagegen. Das angegebene Verhältnis von Dpd zu Pyd ist gering und beträgt 1 : 4 bis 1 : 5. Es ist von Alter und Geschlecht unabhängig (85). Die Wiederauffindungsraten von Dpd sind niedrig. Daraus resultiert bei niedrigen Konzentrationen und zusätzlicher Assay-Verdünnung eine ungenaue Messung im Urin (83).

Pyd zeichnet sich dagegen bei bestimmten Krankheiten sogar vor Dpd durch seine höhere diskriminatorische Fähigkeit aus, die auf die Konzentration zurückgeführt werden kann (235). Zudem scheint sich Pyd gegenüber Dpd, sowohl frei als auch insgesamt, durch geringere intraindividuelle Variationen auszuzeichnen (91). Damit ist die Anwendung eines Dpd-spezifischen Assays nicht geboten. Die Verwendung einer analytischen Methode, die beide Cross-link-Verbindungen gemeinsam bestimmt, ein Immunoassay für Pyd und Dpd, wird diesen Überlegungen dagegen gerecht.

1.4.7 Cross-links und indirekte Einflußfaktoren

Der größte Anteil der Untersuchungen stellt die Ausscheidung von Pyd und Dpd als von Alter und Geschlecht (59, 94, 115, 120), inhaltlichen Bestandteilen der täglichen Nahrung (57, 69, 80, 121, 122), körperlichen Aktivitäten (115, 120, 123, 124) oder Änderungen der renalen Funktion (115, 125) unabhängig dar. Das ist jedoch nicht durchgängig der Fall. Eine Reihe von Untersuchungen beschreiben ein davon abweichendes Verhalten der Cross-links.

1.4.7.1 Cross-links und Nahrung

Die Einhaltung einer kollagenfreien Diät ist nicht notwendig. Es wurde kein Unterschied in der Ausscheidung nach Zugabe von gelatine-haltiger Nahrung bzw. unter Normalkost festgestellt (57, 69, 71, 85, 87, 121, 126, 127) Das spricht zum Zeitpunkt der Probengewinnung für eine vereinfachte Handhabung durch den Untersucher (85).

1.4.7.2 Cross-links und laborchemische Eigenschaften

Die Cross-links stellen bei Raumtemperatur stabile Verbindungen dar (19, 83, 87). Eine Exposition mit normalen Tageslicht oder Säure führt, im Gegensatz zu UV-Licht

oder zur γ -Strahlung mit konsekutiver Zerstörung der Derivate, zu keinem signifikanten Abfall der nachzuweisenden Menge (82, 128), außer bei extrem hoher UV-Licht-Einwirkung (83). Allgemein wird bei - 20 °C eine Stabilität der Verbindungen in den Proben für einen Zeitraum von mindestens 18 Monaten postuliert (69, 85).

Nach einer Untersuchung von Gerrits et al. (91), die sich vor allem mit der labortechnischen Praktikabilität der Cross-links auseinandersetzt, beträgt die Lagerungsstabilität bei - 20 °C ungefähr zehn bis zwanzig Jahre. Für die freien Cross-links wird der Zeitraum sogar auf maximal 25 Jahre beziffert. Die Konzentration des Analytes bleibt auch durch bis zu zehnmalige Einfrier- und Auftauzyklen unbeeinflusst (91). Trotzdem empfiehlt es sich, wiederholte Einfrier- und Auftauzyklen während des Meßvorganges zu vermeiden (46, 82).

Diese anwenderfreundlichen Eigenschaften und der geringe diagnostische Aufwand prädestinieren die Cross-links zu einem idealen Marker in der klinischen Routine. Die Stabilität der Derivate unter verschiedenen physikalischen Bedingungen läßt zudem auf einen hohen Aussagewert in den ermittelten Cross-link-Konzentrationen schließen. Außerdem impliziert es die Möglichkeit, in intraindividuellen, sowie in interindividuellen Studien Veränderungen im Knochen oder Knochenstoffwechsel über langfristige Zeiträume nachzuweisen. Die Messungen erfüllen dabei methodisch und laborspezifisch dieselben Voraussetzungen.

1.4.7.3 Cross-links und das Kriterium Alter und Geschlecht

Der Einfluss von Alter und Geschlecht auf die Cross-links sind bisher Gegenstand vieler Untersuchungen gewesen. Die Ergebnisse stellen sich nicht einheitlich dar. Das ist sicherlich auch auf die Variationen innerhalb der Untersuchungen inbezug auf z. B. Vorkenntnisse des Untersuchers, Material und Methoden und Beeinflussung der Diskussionsziele zurückzuführen.

Die Ausscheidung der Cross-links weist im Vergleich zu Erwachsenen für Kinder überdurchschnittlich höhere Werte aus (68, 85, 92, 129). Bei ihnen werden in der Zeit des aktiven Wachstumschubes zehn bis fünfzehn mal höhere Konzentrationen beobachtet (22, 57, 85, 94). Die Ausscheidung ist beim Kleinkind am höchsten und fällt kontinuierlich zum 17. Lebensjahr hin ab, um sich anschließend auf einem bestimmten Niveau zu stabilisieren. Diese Reduktion betrifft nicht nur Pyd und Dpd als Einzelparameter, sondern auch ihren aus dem gemeinsamen Verhältnis von Pyd/Dpd gebildeten Quotienten. Eine mögliche Erklärung bietet die im Alter abnehmende Lysylhydroxilierung. Da Pyd einen höheren Anteil an Hydroxylysin-Resten aufweist, muß sich der Quotient aus beiden Cross-links zwangsweise verkleinern (55). Überdies kann ein sich mit zunehmendem Alter verändernder Stoffwechsel der Bindegewebe nicht ausgeschlossen werden. In Abhängigkeit von der Verteilung beider Cross-link-Derivate führen sowohl ein Rückgang im Turnover nicht-ossärer Gewebe mit einem Rückgang der Pyd-Ausscheidung, als auch eine Steigerung des Knochenmetabolismus mit einer Zunahme der Dpd-Ausscheidung ebenfalls zu einem erniedrigten Quotienten (126). Die Cross-link-Ausscheidung stagniert mit Wachstumsstillständen im Kindesalter, ist niedrig und konstant im Erwachsenenalter und nimmt in altersmäßig höheren Lebensabschnitten wieder zu (57). Dieses Fazit ist jedoch nicht konsequent

übertragbar. Die erforderliche differenzierte Betrachtungsweise wird anhand der unten angeführten Untersuchungsergebnisse deutlich.

Uebelhart et al. (233) beobachteten bei prämenopausalen Frauen und Männern ähnliche Werte. Dagegen stand jedoch ein rapider Anstieg in der Ausscheidung bei postmenopausalen Frauen. Die Studie von Beadsworth et al. (85) ermittelte für Frauen zwischen 20 - 29 Jahren insgesamt höhere Werte als für ältere Frauen oder gleichaltrige Männer. Auch Kollerup et al. (92) wiesen mit einer Studie geschlechtsunabhängig für ein Kollektiv im Alter von 20 - 29 Jahren höhere Ausscheidungswerte als für ein Kollektiv im Alter von 30 - 39 Jahren nach. Ein ähnliches Ergebnis präsentiert die Studie von Acil et al. (126), mit schwach erhöhten Werten für Frauen ab 30 Jahre, ohne jedoch den Nachweis eines signifikanten Unterschiedes in der Ausscheidung zwischen Frauen, auch nicht postmenopausal, und Männern erbringen zu können. Acil et al. selbst schränken die Aussagefähigkeit ihrer Studie, die einen Kontrast zu den gängigen Ergebnissen anderer Untersuchungen, wie z. B. von Delmas et al. (103) oder Seibel et al. (97) bildet, ein. Acil et al. verweisen auf eine zahlenmäßig zu kleine Gruppe, bzw. auf mögliche intraindividuelle Variationen im postmenopausalen Knochenstoffwechsel. Die gleichzeitigen Überlappungen zwischen prä- und postmenopausalen Knochenresorptionsparametern ermöglichen eine Verknennung des Unterschiedes. Auch die Untersuchung von Robins et al. (94) unter Verwendung eines Dpd- spezifischen ELISA erbrachte keinen signifikanten Anstieg in der Ausscheidung weiblicher Individuen. Es zeigten sich ungefähr 15 % höhere Ausscheidungswerte für Frauen als für Männer. Frauen über 50 Jahre wiesen im Vergleich zu Männern ausgeprägtere interindividuelle Variationen auf, die sich für Robins et al. ursächlich aus dem Zusammenhang mit der Menopause und einem daraus resultierenden Anwachsen der Cross-links aus nicht knochen-spezifischen Quellen und einem damit veränderten Verhältnis von Pyd zu Dpd erklären. Dagegen wurde gleichzeitig aber auch kein Zusammenhang zwischen den Cross-links und dem Geschlecht bzw. Alter gesunder Individuen (115,120) oder erkrankter Individuen beobachtet (115).

Mehrheitlich wurde jedoch in zahlreichen Untersuchungen ein altersbezogener und geschlechtsspezifischer Anstieg der Cross-links nachgewiesen, im folgenden repräsentiert durch einen Ausschnitt thematisch relevanter Studien:

1. Die Studie von Thijssen et al. (130) weist auf eine, mit der Postmenopause einhergehende erhöhte Ausscheidung der freien und Gesamtfraktion hin. Schlemmer et al. (131) ermittelten ebenfalls postmenopausal erhöhte Cross-link-Raten.
2. Die Studie von Seibel et al. (115) verweist auf die Notwendigkeit von Folgeuntersuchungen, nachdem sich erhöhte Werte für postmenopausale Frauen verglichen mit prämenopausalen Frauen abzeichneten.
3. In der Studie von Seibel et al. (97) mit einer HPLC und einem ELISA, sowie in der Studie von Panteghini et al. (132) mit einem ELISA, war die Ausscheidung freier und auch die peptidgebundener Cross-links für Frauen signifikant höher als für Männer.

4. Arbault et al. (119) weisen einen altersabhängigen Anstieg gemeinsam für weibliche und männliche Individuen nach. Für das weibliche Kollektiv zeichnete sich ein erheblicher Unterschied zwischen prä- und postmenopausalen Frauen ab.
5. Hata et al. (99) sowie Yoshihara et al. (133) verzeichneten eine altersabhängige Zunahme von Pyridinolin, die sich für Frauen signifikanter und ausgeprägter darstellte.
6. Die Untersuchung von Wishart et al. (134) mit gesunden, ausschließlich männlichen Probanden ergab, für den Alterszeitraum von 30 bis 60 Jahren, einen Abfall der Cross-links und einen sich daran anschließenden Anstieg. Sie schließen einen überdurchschnittlichen Knochenverlust für Männer ab 50 Jahren nicht aus, und vermuten, daß sich dieser, im Gegensatz zu dem Substanzverlust bei Frauen, eher durch eine erniedrigte Knochenformationsrate als durch eine erhöhte Knochenresorptionsrate manifestiert.
7. Delmas et al. (103) und ebenfalls Arbault et al. (135) weisen mit einem Immunoassay einen altersabhängigen Anstieg für beide Geschlechter nach, mit einer für das weibliche Kollektiv signifikanten, postmenopausalen Erhöhung.
8. Verschiedene Untersuchungen haben einen Anstieg der Cross-links im Urin während einer postmenopausalen Knochenstoffwechsellage verzeichnet. Jedoch ist weder für normale noch für osteoporotisch erkrankte Frauen ein veränderter Cross-link-Gehalt mit einer Zunahme der Konzentration im Knochen nachzuweisen (109). Das läßt den Rückschluß zu, daß die Ausscheidung der Cross-links eher quantitative Änderungen in der Knochenresorptionsrate, als einen in der Kollagensynthese veränderten Modus widerspiegelt (64).

1.4.7.4 Cross-links und Osteoporose

Die Diagnose einer Osteoporose ist nur aus der Kombination unterschiedlicher klinischer Parameter zu stellen. Den Beitrag, den die Bestimmung der Cross-link-Derivate im Urin einzeln oder gemeinsam im Verbund mit anderen diagnostischen Kenngrößen in der Verlaufskontrolle erbringen, gilt dabei als hinreichend gesichert (44, 60, 97). Neben einem Anstieg bei nicht-osteoporotischen Individuen mit dem Alter zeigen vor allem osteoporotische Patientinnen, im Vergleich zu gesunden Kontrollkollektiven, erhöhte Meßwerte (41, 66, 117, 136, 137, 138). Diese signifikant höheren Ausscheidungsraten für das osteoporotische Kollektiv sind methodisch sowohl mit dem ELISA, als auch mittels HPLC nachweisbar (59, 66, 71, 117, 139, 140). Auch ohne klinische Hinweise auf eine Osteoporose wurden im Urin Werte bis zu zweifach über der prämenopausalen Norm ermittelt (22, 116, 117, 137, 233). Bei postmenopausalen Frauen korrelierten die Cross-links im Urin signifikant mit dem Datenmaterial aus histomorphometrischen Untersuchungen (68). Für die sich mit Beginn der Menopause abzeichnende Erhöhung wird eine Oestrogenmangelsituation als wahrscheinlich angenommen (116, 233). Denn die Ausscheidung unter einer Oestrogensersatztherapie reduzierte sich signifikant und kehrte auf ein prämenopausales Niveau, mit einem sich gleichzeitig normalisierenden postmenopausalen Knochenstoffwechsel, zurück (109, 116, 137).

1.4.7.5 Cross-links und andere Erkrankungen

Die Cross-links findet man auch in körpereigenen, knochenfremden Bindegeweben. Damit ist ein nicht-ossärer Ursprung niemals vollständig auszuschließen. Ihre Degradation kann z. B. bei degenerativen Gelenkerkrankungen, im Rahmen einer Glukokortikoid-Therapie und systemisch-entzündlicher Prozesse mit einem entsprechendem Einfluß auf die Ausscheidungsmenge gesteigert sein (61, 95, 115, 120, 141).

Erkrankungen, die mit einem High-turnover einhergehen, sind häufig von einem Cross-link-Anstieg begleitet (69, 117, 139) und stellen eine Indikation zur Cross-link-Messung (37, 142, 235) dar: Z. B. primärer oder sekundärer Hyperparathyreoidismus (68, 233), Hyperthyreoidismus, Postmenopause und Morbus Paget (233), aber auch der Zustand nach Bettruhe oder nach Fraktur, bzw. durch maligne Prozesse induzierte Hypercalcämien sowie ernährungsbedingte Osteomalazien. Die Ursache liegt wahrscheinlich in gesteigerten Knochenresorptionsraten (57, 68, 69, 135). Die Therapie mit Oestrogenen bzw. Bisphosphonaten oder der Zustand nach Parathyreoidektomie induzieren dagegen eine Absenkung der Cross-links (37).

1.4.8 Cross-links, die Nierenfunktion und Kreatinin

Die meisten Studien beziehen die Meßwerte der Cross-links auf Kreatinin. Das ist sinnvoll, um den möglichen Einfluß von Größen, wie Ausscheidungsvolumen und ein daraus resultierender Verdünnungsfaktor, Körpergröße oder einen nicht nachvollziehbaren Zeitpunkt in der Probengewinnung zu verringern bzw. gänzlich auszuschließen (14, 68, 71, 103, 144, 145).

Dieser Bezug wird jedoch von einigen Untersuchern durchaus kritisch beurteilt. Die Kreatinin-Messung selbst erfolgt nicht unter standardisierten Bedingungen. Das impliziert, trotz fehlendem diurnalen Rhythmus (145, 145, 147), die Möglichkeit einer fehlerhaften Angabe der tatsächlichen Cross-link-Menge. Die direkte Proportionalität von endogener Kreatinin-Clearance, Muskelmasse, sowie Muskel-metabolismus, und die Abhängigkeit von Nahrungsbestandteilen stellen den Bezug der Cross-links auf Kreatinin zusätzlich infrage (48, 110, 120, 144). Damit darf die Tatsache eines artifiziellen Anstiegs bzw. Abfalls gemessener und durch diesen laborchemischen Parameter korrigierter Cross-link-Mengen nicht übersehen werden (46). Delmas et al. (103) sprechen sich für einen Bezug von Cross-links auf Kreatinin aus. Sie weisen aber gleichzeitig, im Hinblick auf die überhöhten Meßwerte bei Frauen über achtzig Jahren, auf einer neben zu geringen Probandenanzahl auch auf den Einfluß einer geringen Muskelmasse mit erniedrigten Kreatinin-Werten hin.

1.4.9 Cross-links und die Sammelmodi

Für den Zeitpunkt bzw. den Zeitraum der klinischen Probenentnahme besteht kein einheitlicher Konsens, sondern das „handling“ differiert zwischen den einzelnen Untersuchern.

Die Cross-links zeigten signifikante Korrelationen für Analysate aus Spontanurin und Sammelurin (59, 61, 80, 87, 148, 149, 150). Colwell et al. (87) weisen eine Korrelation von Sammelurin über 24 Stunden und morgendlichem Spontanurin nach. Sie erklären die Variationen mit dem Einfluß des zirkadianen Rhythmus. Kamel et al. (90) sprechen sich für die Austauschbarkeit beider Sammelmodi aus. Die Studie von Panteghini et al. (132) zeigt signifikante Korrelationen zwischen 24-Stunden-Sammelurin und morgendlichem Spontanurin bzw. 2-Stunden-Fastenurin.

1.4.10 Longitudinale Variationen, „day-to-day-variations“

Zeitabhängige Schwankungen sind eine physiologische Eigenschaft biologischer Parameter. Außer bei Abbiati et al. (80, 106) die weder für die freie noch für die Gesamtfraktion longitudinale Veränderungen nachgewiesen haben, ergeben sich für beide untereinander korrelierten Cross-link-Derivate, z. T. geringfügige und nicht signifikante „day-to-day-variations“ (87, 98, 140, 148). Jedoch sind Mehrfachmessungen zur Miterfassung dieser Variationen nur bei Erkrankungen, die mit ausgesprochen subtilen Knochenveränderungen einhergehen nötig (87, 148). Ausgeprägte Knochenstoffwechselraten überdecken dagegen diese physiologisch longitudinalen Variationen.

1.4.11 Jahreszeit-abhängige Veränderungen

Postmenopausale Frauen zeigten im Herbst, verglichen mit dem Frühjahr, signifikant niedrigere Werte für Pyd als für Dpd. Der Einfluss calciotroper Hormone und des Calciumspiegels, mit einem direkten bzw. indirekten Einfluß auf die Lysyl-hydroxylase, wird diskutiert (151).

1.4.12 Diurnale Schwankungen

Der zirkadiane Rhythmus in der Cross-link-Ausscheidung gilt für den Urin als gesichert (22, 146, 148, 150, 152). Die dazu relevanten Untersuchungen stammen von Schlemmer et al.. 1992 beschreiben sie (145) einen zirkadianen Rhythmus bei jungen, prämenopausalen Frauen, mit einem nächtlichen Anstieg der Ausscheidung und einem „peak“ in den frühen Morgenstunden von 5 bis 8 Uhr, sowie ein sich daran anschließendes stetiges Absinken über den Tag mit einem „nadir“ zwischen 17 und 20 Uhr. Die Werte gestalteten sich um 8 Uhr durchschnittlich um 100 % höher als um 20 Uhr. Die Untersuchung von 1994 (131) weist die Unabhängigkeit zwischen dem diurnalen Rhythmus und dem Alter, der Menopause bzw. einer manifesten bzw. nicht-manifesten Osteopenie nach. Die Ursachen für den zirkadianen Rhythmus der Pyridinium-Verbindungen sind nicht grundlegend geklärt. Es werden Wechselwirkungen zwischen zirkadian ausgeschütteten Hormonen, wie z. B. PTH, Wachstumshormon oder Kortisol auf den Knochenmetabolismus vermutet.

Der zirkadiane Rhythmus wurde unter verschiedenen Kautelen beobachtet. Er zeigt sich Dpd-spezifisch (22, 146, 152), kreatininunabhängig (22) und wesentlich ausgeprägter kreatininabhängig (148), prämenopausal (150), altersunabhängig (22)

und Menstrationszyklus-unabhängig (148) sowie geschlechtsspezifisch (148) bzw. geschlechtsunspezifisch (152).

1.4.13 Cross-links in Serum und Dialysat

Die Bestimmung von Cross-links im Serum erhöht die Vergleichbarkeit und Beurteilbarkeit unterschiedlicher biochemischer Serumparameter. Denn das Bestimmungsmaterial wird zum selben Zeitpunkt gewonnen bzw. entstammt den gleichen Proben. Die Diskussion um den Einfluß durch die mögliche renal-metabolische Degradation der Cross-links entfällt. Die Entscheidung für einen jeweiligen Sammelmodus, Spontanurinprobe oder 24-Stunden-Sammelurin wird damit unnötig. Die Verwendung von Cross-links aus dem Dialysat bietet sich insbesondere bei anurischen Dialyse-Patienten an.

Die Messung von Cross-links in den jeweiligen Systemen und für verschiedene Kollektive ist bereits mehrfach realisiert worden. Die Unterschiede in dem Datenmaterial einzelner Untersuchungen ergeben sich aus den unterschiedlichen Kalibrationen und wissenschaftlichen Versuchsbedingungen. Sie sind noch keine absoluten Richtgrößen. Sie vermitteln aber durchaus einen Gesamteindruck, in welchem Rahmen sich die Cross-links normalerweise bewegen können.

1993 wiesen Kung et al. (153) mittels eines Immunoassays und James et al. (154) mittels einer HPLC Cross-links im Serum von Normalprobanden nach. 1994 veröffentlichten Abbiati et al. (70) für gesunde Probanden Werte aus einer HPLC von $3,62 \pm 0,65$ pmol/ml und $0,70$ pmol/ml für Gesamt-Pyd und Gesamt-Dpd, respektive. Die Untersuchung von Hata et al. (110) aus dem Jahre 1995 gibt für Gesamt-Pyd die Konzentration mit $5,3 \pm 0,8$ pmol/ml bei jungen, gesunden Erwachsenen an. Ebenfalls 1995 untersuchten Urena et al. (155) mit einem kompetitiven Immunoassay das Serum von HD-Patienten. HD-Patienten zeigten mit $90,6 \pm 99,6$ nM signifikant höhere Werte als das gesunde Vergleichskollektiv mit $1,9 \pm 0,4$ nM. Dabei wiesen die High-turnover-Patienten gegenüber den Low-turnover-Patienten Werte von $108,8 \pm 108,0$ nM zu $34,1 \pm 12,8$ nM auf. Niwa et al. (49) wiesen in demselben Jahr unter Verwendung einer HPLC ebenfalls erhöhte Werte für HD-Patienten nach. Die Studie von Walne et al. (82) dagegen beschäftigte sich ausschließlich mit der Stabilität von Pyridinium-Derivaten in Serum und Urin. Ibrahim et al. (156) untersuchten mit einer HPLC die Cross-link-Derivate parallel in Urin, Serum und Dialysat von HD- und CAPD-Patienten. Sie erbrachten erneut den Nachweis erhöhter Meßwerte in Urin und Serum. Das Kontrollkollektiv zeigte ein Gesamt-Pyd von $4,1$ nmol/l, Dpd lag dabei unterhalb der Nachweisgrenze. Ein Jahr später kommt eine neue Studie von Ibrahim et al. (157) ausschließlich mit HD-Patienten, in einer durchgeführten Studie zu ähnlichen Ergebnissen. Die Untersuchung aus 1996 von Colwell et al. (79) mit einer HPLC gibt Auskunft über den freien und den Gesamtanteil an Pyd und Dpd in Serum und Urin. Im Serum Gesunder betrug der Anteil der freien Fraktion 15 % an der Gesamtfraktion, im Urin dagegen 45 %. Dpd sank im Serum mit steigender Ausscheidung der Pyridinium-Derivate in den Urin. 1997 wurde die Aussagefähigkeit von Pyridinium-Verbindungen im Serum für die Rheumatoide Arthritis (158) bzw. für die Tumor-induzierte Knochenresorption (159) untersucht. Spacek et al. (160) beschäftigten sich dagegen mit der Optimierung von Serumproben für die HPLC.

1.5 Konventionelle Parameter

1.5.1 Knochendichte

Die Knochendichtemessung, Osteodensitometrie, ist eine nicht-invasive Methode. Sie erfaßt den Netto-Effekt aus Knochenneubildung und Knochenresorption quantitativ. Das ermöglicht die Betrachtung von Verlauf, der Entwicklung und des Ist-Zustands von Knochenstoffwechseldefekten. Die präterminale und terminale Niereninsuffizienz bilden Indikationen für densitometrische Untersuchungen {2387}. Die PD zeichnet sich gegenüber der HD durch verbesserte Knochendichten und mildere Verlaufsformen aus (162, 163). Die Therapieeffekte auf den Knochen-stoffwechsel sind sehr unterschiedlich (162, 163, 164). Z. B. zeigten Individuen einen Knochenverlust mit oder ohne Ausbildung skelettaler Symptome (164, 165) oder Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz wiesen mehrheitlich normale Röntgenbefunde aus (166).

Das Ziel der Bestimmung des Knochenmineralgehaltes ist es, nicht nur im „follow up“ Veränderungen der Knochendichte zu dokumentieren, sondern auch die Effizienz einer Behandlung und den Effekt in ihrem Gesamtverlauf zu überwachen (161, 167, 168). Ziel ist es auch, eine niedrige Knochenmasse oder spontane Knochenverluste zu erkennen, um gegenwärtige und zukünftige individuelle Frakturrisiken abschätzen zu können (32, 168, 169).

1.5.1.1 DXA, ein densitometrisches Meßverfahren

Die „dual-X-ray-absorptiometry“ (DXA), auch als DPX oder QDR bezeichnet (161, 170), ist ein planares Verfahren. Es ermittelt den jeweiligen Knochenmineralgehalt oder die „Knochendichte“ in den verschiedenen Skelettabschnitten, wie der Wirbelsäule, dem Femur oder durch Ganzkörpermessungen (161, 167). Das Resultat dieser gleichzeitigen Messung von kortikalem und trabekulärem Knochen-mineralgehalt ergibt den „bone mineral content“ (BMC). Theoretisch ist mit der DXA die Messung jeder „region of interest“ (ROI) möglich. Aber i. d. R. werden verschiedene Abschnitte der Lendenwirbelsäule und der Hüfte gemessen (168).

Die DXA bestimmt den Knochenmeßabschnitt integral. Das Meßergebnis ist die mittlere Mineralbelegung je Meßflächeneinheit der Region, der sogenannte Flächenbelegungswert, umgerechnet in g/cm^2 , die Knochendichte, „bone mineral density“ (BMD) (170). Die BMD ist demnach nicht die wahre Dichte, sondern lediglich die BMC, korrigiert um die gemessene Fläche, d. h. ein teilweise auf die Körpergröße bezogener Wert (168). Die Meßwerte werden in Relation zu spezifischen Referenzkollektiven gesetzt. Damit ist eine vergleichende Interpretation gewährleistet. Die DXA zeichnet sich durch eine niedrige Strahlenbelastung, gute Ergebnisse in der Langzeitreproduzierbarkeit, sowie niedrige Kosten aus (169).

Die technischen Neuerungen der letzten Jahre haben zu einer Entwicklung reliabler Methoden für die quantitative Erfassung der Knochendichte geführt. Verantwortlich dafür ist der niedrige Quotient aus Änderungen der Knochendichte im Verhältnis zum Präzisionsfehler (168). Die DXA gewährleistet eine zufriedenstellend sensitive und

präzise Erfassung dieser Veränderungen (14, 171). Sie hat sich deshalb als der „gold standard“ unter den verschiedenen Verfahren etabliert.

Die Knochendichte ist jedoch ein relativ statischer Parameter in der Erfassung des Knochenstoffwechsels. Die Darstellung des Remodelling wird damit nicht immer ausreichend deutlich (165).

Die Beurteilung eines individuell ermittelten Knochendichtewertes erfolgt nach Bezug auf ein Referenzkollektiv. Der Bezug der Meßwerte auf ein Kollektiv aus Individuen desselben Alters und Geschlechtes, entspricht der relativen Osteopenie, dem „Z-Score“, und erlaubt eine Beurteilung unter dem Aspekt, ab welchem Zeitpunkt altersabhängige Faktoren die Knochenmasse beeinflusst haben könnten (165, 169). Der Z-Score hat sich als für wissenschaftliche Zwecke präzise erwiesen, z. B. für die Korrelation mit anderen Variablen oder für den Vergleich verschiedener Kollektive (165). Der Vergleich mit Spitzenknochendichtewerten von jungen gesunden Erwachsenen ergibt den „T-Score“, das entspricht der absoluten Osteopenie (165, 169). Je nach Untersuchung und Fragestellung findet der T-Score Anwendung, z. B. zur Abschätzung der Frakturrisikogrenze (161).

1.5.2 Laborchemische Parameter

Laborchemische Parameter sollen die klinischen und bildgebenden Verfahren ergänzen. Sie erfassen die dynamischen Stoffwechselprozesse, die mit anderen Verfahren nicht oder nur unzureichend zu dokumentieren sind (44). Insgesamt umfaßt ihr Einsatz die Diagnose, „screening“ und „staging“ von Knochenstoffwechselerkrankungen, sowie Planung, Kontrolle und Anpassung eines Therapieschemas an das aktuelle Stoffwechselgeschehen in kürzerfristigen Abständen (44, 69). Sie sind nicht-invasiv, gut verfügbar und repetitiv meßbar (14). Z. B. kann eine Therapie entsprechend auf den sich eventuell veränderten aktuellen Knochenstatus angepaßt (142) oder die Entwicklung neuer Medikamente optimiert werden (14). Sie erfassen den Knochen und seine Veränderungen in seiner gesamten Bandbreite und mit der ihm eigenen Dynamik in Knochenformation und Knochenresorption (171).

Der Nachweis in Serum und Urin erfolgt größtenteils über Degradationsfragmente aus Matrixkomponenten, über enzymatische Aktivitäten oder über Ausscheidungsprodukte. Sie werden während der einzelnen Resorptions- und Formationsvorgänge in die Zirkulation abgegeben (35). Das Arbeits- bzw. Wirkprinzip des Parameters bestimmt damit den Untersuchungsaspekt im komplexen Mechanismus von Knochenformation und -resorption. Es ist jedoch kritisch anzumerken, daß Freisetzung und Clearance durch verschiedenene systemische Faktoren beeinflusst, und damit die Sensitivität und Spezifität des einzelnen Markers eingeschränkt werden kann (172).

1.5.2.1 Parathormon

Das Parathormon ist ein Proteohormon aus 84 Aminosäuren und wird in der Nebenschilddrüse gebildet. Seine Synthese und Ausschüttung erfolgt nach einem

zirkadianen Rhythmus (22) und in Abhängigkeit der Spiegel von ionisiertem Calcium und $1, 25(\text{OH})_2$ -Vitamin- D_3 -Hormon (30,173). Es gibt keinen Hinweis auf eine unmittelbare autokrine Selbstlimitation des Zellwachstums und der Hormonausschüttung (33). Hormonangriffspunkte mit Stoffwechselwirkungen sind die Nieren, der Darm mit einer Vitamin-D-vermittelten Resorption von Calcium und vor allem das Skelett. PTH fördert im Knochenmark die Neubildung von Osteoklasten und über eine Osteoklastenaktivitätssteigerung einen vermehrten Knochenabbau mit der Freisetzung von Calcium (21). Eine hohe PTH-Konzentration steigert den Knochenturnover (25).

1.5.2.2 Vitamin-D-Hormon

Bezeichnung:

1. Vitamin- D_3 entspricht Cholecalciferol
2. $25(\text{OH})\text{-D}_3$ ist 25-Hydroxycholecalciferol und entspricht Calcidiol
3. $1, 25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ ist 1, 25-Dihydroxycholecalciferol und entspricht Calcitriol

Das Secosteroid Vitamin-D ist ebenfalls für die Homöostase von Calcium und Phosphat verantwortlich. Es dient als „precursor“ für mindestens acht hydroxilierte Metabolite, u. a. $25(\text{OH})\text{-D}_3$ und $1, 25(\text{OH})_2\text{-D}_3$.

Die Hauptzielorgane dieser essentiellen Hormone (174) sind das Intestinum, das Skelett, die Nieren und die Nebenschilddrüsen (175). Zusätzlich kann Vitamin-D seine eigenen Rezeptoren über eine „up-regulation“ hochregulieren (33, 176).

$25(\text{OH})\text{-D}_3$ wird aus Vorläuferstufen in der Leber gebildet. Es ist die Grundlage für die Biosynthese der knochenstoffwechselaktiven, hydroxilierten Form, $1, 25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ in der Niere (175, 177). Die Calcitriol-Konzentration im Blut beträgt $1/500$ von $25(\text{OH})\text{-D}_3$ (26).

$1, 25(\text{OH})_2\text{-D}_3$ entsteht in der Niere durch die Hydroxilierung von $25(\text{OH})\text{-D}_3$ mittels der proximal-tubulär lokalisierten $25(\text{OH})\text{-D}_3\text{-}1\text{-}\alpha$ -Hydroxylase. Die Kontrolle der Aktivität dieses Enzyms erfolgt durch die Stimulation mit PTH und durch die Inhibition mit Calcium und Phosphat (173). Calcitriol fördert die Mineralisierung des Knochens mit Calcium und Phosphat, und steigert gleichzeitig die Resorptionstätigkeit reifer Osteoklasten (21) als auch die Resorption von Calcium und Phosphat aus dem Darm. Malabsorption und Nierenversagen sind deshalb die beiden Störungen, die am häufigsten durch das Auftreten eines Vitamin-D-Mangels gekennzeichnet sind (17). Stimuliert durch PTH oder eine Hypophosphatämie und moduliert durch andere Hormone, wie das Wachstumshormon, Prolaktin, Östrogen, Glukokortikoide, Insulin und Schilddrüsenhormone (178) hemmt Calcitriol über eine „feedback inhibition“ die tubuläre $25(\text{OH})\text{-D}_3\text{-}1\alpha$ -Hydroxylase (173) mit einer konsekutiven Verminderung der eigenen Biosynthese (175, 177, 179) und, ebenfalls über einen Feedback-Mechanismus, die Synthese und Sekretion von Parathormon (29, 180, 181).

Versuche auf molekularer Ebene zeigten den direkten Einfluß von Vitamin-D auf die Replikation bei der Nebenschilddrüsenproliferation (29, 174, 176) unabhängig vom Serumcalciumspiegel. Im Organismus entfaltet sich diese Wirkung von Calcitriol vor allem durch den Genom-Effekt in den Zielorganen (182). Das PTH-Gen z. B. verfügt über ein Vit-D-responsives Element in dem „upstream“ des 5'-Ende seiner DNA.

Calcitriol hemmt über diesen Mechanismus die PTH-mRNA-Expression, und verändert damit die Sensitivität der Nebenschilddrüsenzellen, den Set-point für Calcium, sowie auch das Wachstum (183).

1.5.2.3 Alkalische Knochenphosphatase

Die knochenspezifische alkalische Phosphatase, „bone alkaline phosphatase“ (BAP) entsteht über eine post-translationale Modifikation durch die Knochenzellen. Ihre Funktion beruht wahrscheinlich auf der Hydrolyse organischer Phosphatester (33, 38, 112). Sie ist als Enzym an der Osteoblastenmembran lokalisiert und wird über einen bisher ungeklärten Mechanismus in die Zirkulation freigesetzt (17, 184). Die Konzentration ist ein Maß für die osteoblastäre Aktivität, und damit für die Zahl der am Knochenaufbau beteiligten Osteoblasten sowie deren Aktivitätszustand (21).

1.5.2.4 Alkalische Phosphatase

Alkalische Phosphatase ist ein Phosphatester-spaltendes Enzym und existiert in drei Iso-Unterformen. Das Isoenzym in Knochen, Leber und Niere weist eine einheitliche Proteinstruktur auf, unterscheidet sich jedoch organspezifisch in seinem jeweiligen Kohlenhydratanteil. Die Gesamt-AP ist der Marker der Knochenformation mit der häufigsten Anwendung, aber es mangelt diesem Parameter an Sensitivität und an Spezifität (17, 38, 112, 184, 185).

1.5.2.5 L- γ -Glutamyl-Transferase, γ GT

L- γ -Glutamyl-Transferase (γ GT) findet sich u. a. in der Niere, Leber und im Pankreas und ist bei Leberaffektionen erhöht (186).

1.5.2.6 Calcium

Der Gesamt-Calcium-Bestand des menschlichen Organismus beträgt ca. 1,4 g. 99 % sind überwiegend als Hydroxylapatit in der Knochensubstanz lokalisiert. 1 % dieses Kations befindet sich im Extrazellulärraum, nur 0,03 % befindet sich im Plasma. Calcium ist ausschließlich in seiner ionisierten Form biologisch aktiv.

Die Calcium-Homöostase beruht im wesentlichen auf der Resorption und Exkretion im Gastrointestinaltrakt und in der Niere sowie auf der skelettalen Mobilisation bzw. Deposition. Im Knochen stellt Hydroxylapatit einen Reservespeicher dar, aus dem bei Bedarf sehr schnell Calcium mobilisiert werden kann. Somit ist ein Austausch von Calcium in der Extrazellulärflüssigkeit mit dem im Knochen deponierten Calcium möglich. In der Niere wird ionisiertes und komplexgebundenes Calcium glomerulär filtriert, jedoch zu 95 - 99 Prozent in den proximalen, sowie distalen Tubuli zurückresorbiert. Wie oben bereits erläutert, erfolgt die Regulation des Calcium-Phosphat-Stoffwechsels, neben verschiedenen anderen Einflußgrößen, wie z. B. Calcitonin, größtenteils über Parathormon und die Vitamin-D-Metaboliten (33, 172, 187, 188, 189).

2 Fragestellung

Die Vorgänge am Knochen sind durch eine enge Vernetzung der Knochenstoffwechselfaktoren charakterisiert. Ihre relative Gewichtung ist bei einem fehlfunktionierenden Knochenmetabolismus unbekannt, jedoch dominiert häufig eine Determinante. Daraus resultieren atypische Erscheinungsformen, sowie biologische intra- und interindividuelle Variationen. Eine Einordnung von Phänomenen ist dadurch erschwert. Untersuchungen, die sich in diesem Zusammenhang mit dem Knochenstoffwechsel von Peritonealdialysepatienten, sowie seiner Diagnostik und Evaluation auseinandersetzen, sind deshalb selten.

Die Einschätzung und Beurteilung dieser Knochenstoffwechselprozesse sind für Peritonealdialysepatienten jedoch von hoher Relevanz. In Ermangelung aussagefähigen Datenmaterials wurde die vorliegende Untersuchung unter Verwendung eines wegweisenden und auf die Zukunft ausgerichteten Verfahrens erwogen und konzeptionell entworfen.

Die Pyridinium-Verbindungen haben sich bereits in anderen Untersuchungen als zukunftssträchtige Parameter von Aussagewert erwiesen. Die umfassende klinisch ausgerichtete Studie wurde mit einem zahlenmäßig aussagefähigen Patientenkollektiv unter folgender Fragestellung umgesetzt:

1. Existiert für die Pyridinium-Cross-links, Pyd und Dpd, ein Ausscheidungsprofil in die Dialysatflüssigkeit, und wie manifestiert es sich?
2. Wie stellt sich die Ausscheidung der freien Cross-links in den Systemen Serum, Dialysat und Urin mit einem Immunoassay dar, und besteht ein systemübergreifender Zusammenhang in Darstellung und Aussage?
3. Welche Aussage treffen die Pyridinium-Derivate und die konventionellen Knochenstoffwechselfaktoren PTH, Knochendichte, 25(OH)-Vitamin-D₃, 1, 25(OH)₂-Vitamin-D₃, alkalische Knochenphosphatase oder ionisiertes Calcium, und besteht ein gemeinsamer Zusammenhang?
4. Wie sieht der diagnostische Ansatz für eine differenzierte Betrachtung und Beurteilung von Knochenstoffwechselprozessen bei Peritonealdialysepatienten nach dieser Untersuchung aus?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patienten

64 weiße, erwachsene, terminal chronisch-niereninsuffiziente Patienten der Peritonealdialyseambulanz, Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Medizinische Klinik der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf haben an der Untersuchung teilgenommen. Die Untersuchungsdauer umfaßte den Zeitraum vom 05.12.94 bis zum 28.05.96. Die 23 Frauen und 41 Männer hatten ein Durchschnittsalter von 44 ± 11 Jahren ($x \pm SD$), Spannweite 22 - 71 Jahre. Zum Zeitpunkt der Probensammlung betrug die durchschnittliche Peritonealdialysedauer 705 ± 789 Tage ($x \pm SD$), Spannweite 13 - 3763 Tage. Bei 20 Patienten wurde bereits zuvor eine Hämodialyse-Behandlung über einen durchschnittlichen Zeitraum von 1162 Tagen durchgeführt.

54 Patienten dialysierten mit der CAPD-Methode, 17 Patienten dialysierten mittels eines Cyclers bzw. wechselten innerhalb des Verfahrens von CAPD auf APD.

Die Ursachen der chronisch-renalen Dysfunktion bzw. der terminalen Niereninsuffizienz zugrundeliegende Nephropathien waren:

Krankheit	Anzahl
Systemischer Lupus erythematodes (SLE)	4
Diabetes mellitus Typ I	14
Diabetes mellitus Typ II	2
Schrumpfnieren unklarer Genese	9
Pyelonephritis	3
unbekannt	6
IgA-Nephropathie	8
Glomerulonephritis	7
maligne Nephrosklerose	1
polyzystische Nierendegeneration/fam. Zystennieren	4
fokal noduläre Glomerulosklerose	1
Alport-Syndrom	1
sekundäre Amyloidose	1
Zustand nach DIC	1
Markschwammnieren	1
benigne Nephrosklerose	1

36 Patienten waren oligo- bzw. anurisch (≤ 200 ml/24 h). Die Restausscheidung (für $n=7$ nicht bekannt) des Gesamtkollektivs betrug $0,97 \pm 1,02$ l/24 h, Spannweite 0 - 3,9 l.

9 Patienten waren ein- oder mehrfach nierentransplantiert. 20 Patienten hatten klinische oder biologische Zeichen eines sekundären Hyperparathyreoidismus, der teilweise operativ therapiert worden war. 11 Patienten hatten Zeichen einer Schilddrüsenerkrankung mit

Hypothyreose unter einer Autoimmunthyreoiditis (n=2), euthyreoter Stoffwechsellage bei mäßigem Struma (n=6) oder latenter Hyperthyreose (n=3).

Es gab keinen Hinweis auf oder Anzeichen für nicht-renal induzierte Erkrankungen des Skelettsystems, z. B. Osteomalazie, Morbus Paget oder aluminium-assoziierte Osteopathie. Zudem bestanden auch keine klinischen Hinweise auf Lebererkrankungen. Die Aktivitätskonzentrationen waren zwar für AP (n=8) und γ -GT (n=9) gesteigert, jedoch nur in drei Fällen gleichzeitig in Kombination mit einer erhöhten BAP. Der diurnale Zyklus der Teilnehmer entsprach einem normalen Wach-Schlafphasen-Rhythmus. Die Ernährung wurde nicht kontrolliert, jedoch bei Bedarf durch Mineralstoff-, Eiweiß- oder Vitamin-präparate ergänzt.

Da Individuen aus einer Normalpopulation nicht das Selektionskriterium der Dialysepflichtigkeit erfüllten, wurde für die Untersuchung kein Vergleichskollektiv aus gesunden Individuen rekrutiert.

3.1.2 Medikation

Jeder Patient erhielt eine Therapie, die sich auf den Knochenstoffwechsel auswirkte. Sie wurde mit Rücksicht auf mögliche, folgenschwere Beeinträchtigungen für den einzelnen Patienten nicht abgebrochen oder modifiziert. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme wurden folgende Medikamente verabreicht, Dosis/Einheit und Dauer der Medikation sind bekannt:

- Vit-D-Hormone [Rocaltrol[®] (n=36), Vigantoletten[®] (n=4), Vigorsan[®] (n=1), Vigantol[®] (n=1)]
- Phosphatbinder [Calciumkarbonat[®] (n=34), Calciumazetat[®] (n=46), Antiphos[®] (n=10)]
- Glukokortikoide [Ultralan[®] (n=2), Urbason[®] (n=3), Decortin[®] (n=2), unbekannt (n=1)]
- Diuretika [Lasix[®] (n=60), Aquaphor[®] (n=2), Dytide[®] (n=1), Furorese[®] (n=2), Furosemid[®] (n=1)]
- Insulinsubstitution (n=19)
- Schilddrüsenhormonsubstitution (n=7)
- Oestrogensubstitution (n=3)

Eine Behandlung mit Calcitonin bzw. Bisphosphonaten wurde nicht durchgeführt.

3.1.3 Dialyse

Die PD erfolgte mit der konventionellen Standardtechnik und unter Verwendung der im Handel erhältlichen Peritonealdialyselösungen (pH 5,5).

Die Dialysatflüssigkeit, kommerziell hergestellt, enthielt neben verschiedenen Glucose-Konzentrationen, einem festgelegten pH-Wert, und unterschiedlichen Elektrolyten, auch Calciumacetat bzw. -karbonat:

- Dianeal[®] Baxter Deutschland GmbH, Ettlingen, Deutschland, Glucose 1,36 % bzw. 3,86 %, PD 4 mit Calcium 1,25 mmol/l (n=25), PD 1 mit 1,75 mmol/l (n=47) sowie PD1 und PD4 mit 1,75 + 1,25 mmol/l (n=3)
- Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland, Glucose 1,50 % bzw. 4,25 %, CAPD 10, CAPD 11 mit Calcium 1,0 mmol/l (n=7) und CAPD 2, CAPD 3 mit 1,75 mmol/l (n=9)
- unbekannt (n=6)

Die Konzentration für Calcium in der Dialysatflüssigkeit wurde für jeden Patienten auf seine Knochenstoffwechselfparameter im Blut abgestimmt. Die Konzentration für Glucose richtete sich dagegen nach dem vorgegebenen Zielvolumen für die Ultrafiltration. Die Entscheidung für ein PD-Verfahren, die Häufigkeit der Beutelwechsel sowie die Verweildauer und Menge der instillierten Lösung basierten auf dem patientenspezifischen PET, den Effektivitätsberechnungen (Kt/V , „normalized protein catabolic rate“ (NPCR), Kreatinin-clearance) und der Serumdiagnostik. Dieses differenzierte Dialyseregime macht Angaben zu der durchschnittlichen Anzahl der Beutelwechsel oder zu der durchschnittlichen Verweildauer überflüssig.

Alle Angaben zur Anamnese, Diagnose und Therapie sind den Akten der Peritonealdialyseambulanz entnommen.

3.1.4 Gewinnung, Sammlung und Asservierung der Proben

3.1.4.1 Dialysat und Urin

Das Material für die Dialysat- bzw. Urinproben wurde vom 05.12.94 bzw. 05.11.95 respektive im Rahmen von 97 BC gewonnen. Aufgrund der langen Studiendauer wurden einige dialysepflichtige Patienten zweimal ($n=18$), dreimal ($n=4$), viermal ($n=1$), sowie fünfmal ($n=1$) erfaßt. Die Anzahl der Dialysatproben aus einer BC richtete sich nach dem jeweiligen PD-Verfahren des Patienten, entweder CAPD oder APD. Die Entnahme der Proben aus den drainierten Ausläufen oder dem Sammelurin über einen Zeitraum von 24 Stunden führte der Patient selbständig durch. Der letzte Beutelwechsel und die Probenentnahme daraus wurden jedoch ambulant, mit Ablauf der 24 Stunden, morgens durch die Mitarbeiter der Dialysestation vorgenommen. Nach der Bestimmung der gängigen Laborparameter aus einer BC wurden 2 ml nicht verwendeten Materials gleichmäßig, ohne Zusatz von Konservierungsmitteln oder anderer Additiva, bei -20 °C und unter Kennzeichnung der Aliquots eingefroren. Um die Interassay-Variabilität zu minimieren, blieb das Probenmaterial bis zum Zeitpunkt der Analysen bei -20 °C gelagert.

3.1.4.2 Serum

Zur Bestimmung der Parameter in Plasma bzw. Serum während einer BC wurde dem nicht nüchternen Patienten morgens, unmittelbar nach dem letzten durchgeführten Beutelwechsel, Blut durch Venenpunktion in gewöhnliche Vacutainer-Röhrchen entnommen. Jede Probe wurde, unter Anwendung unten aufgeführter Methoden in der Routinediagnostik des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik in Düsseldorf untersucht. Nicht eingesetztes Serummaterial wurde wie das Material aus Dialysat und Urin behandelt (46). Die Proben, aufgeteilt in Fraktionen von 5 ml, wurden bis zur Aufarbeitung des Materials durch den immunometrischen Assay bei -20 °C aufbewahrt.

Aus medizinischer Indikation und aus logistischen Gründen war es nicht möglich, für jede BC Serum, Urin und Dialysat geschlossen zu sammeln oder insgesamt alle Parameter zu bestimmen. Die Unterschiede in den Fallzahlen wurden in die Datenanalyse miteinbezogen und beeinflussen daher die Gesamtinterpretation nicht.

3.2 Methoden

3.2.1 Freie Pyridinium-Cross-links

Die Bestimmung von freien Pyridinium-Cross-links in Urin, Serum und Dialysat erfolgte mit einem ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), Pyrilinks-IITM, entwickelt von Metra Biosystems Inc., Palo Alto, CA, USA, Vertrieb: DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland, Lot no. 5L180 (n=5) und Lot no. 6B105 (n=3). Der kompetitive Festphasen-EIA (Enzyme Immunoassay) bestimmt die quantitative Summe von freiem Pyridinolin (Pyd) und Deoxypyridinolin (Dpd) im Urin.

Pyridinium-Cross-links in der Probe und an Streptavidin Festphasen-gebundenes Pyridinolin konkurrieren um die Bindungsstellen der monoklonalen, an alkalischer Phosphatase konjugierten Pyd-Antikörper von der Maus, die eine Kreuzreaktivität von 100 % zu freiem Pyd als auch zu freiem Dpd aufweisen. Die optische Dichte bei 405 nm ist nach enzymatischer Reaktion des Komplexes indirekt proportional der Konzentration an freiem Pyd/Dpd (98, 153, 190).

Proben und Kitreagenzien wurden für 96 Bestimmungen vorbereitet. Nach Rückführung der Urine, Sera und Dialysate auf eine Raumtemperatur von 20°C wurde jede Probe mit einem Vibrator gemischt und anschließend zehn Minuten bei 3300 g zentrifugiert. Das Untersuchungsmaterial wurde dem Überstand entnommen. Proben, Standards und Kontrollen wurden 1:10 mit Assaypuffer (z. B. 50 µl Probe + 450 µl Assaypuffer) verdünnt. Jeweils 50 µl wurden auf den Boden einer vorher definierten Mikroküvette der mit Pyd-beschichteten Mikrostrips aufgebracht. 100 µl Enzymkonjugat (alkalische Phosphatase-markierte Pyd-Antikörper, monoklonal, Maus) wurden noch hinzugefügt. Die Platten inkubierten drei Stunden bei 2 - 8 °C. Ungebundene Reaktionspartner wurden in einem dreischriftigen Waschvorgang mit Waschlösung (Waschpuffer + destilliertes Wasser) entfernt. Nach Zugabe von jeweils 150 µl Substratlösung (Substratpuffer + p-Nitrophenyl Phosphat (pNPP)-Tabletten) inkubierte die Platte eine Stunde bei Raumtemperatur. Dabei wurde das Substrat von dem gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt umgesetzt. Der Zusatz von jeweils 100 µl Stop-Lösung (1 N NaOH) beendete diese enzymatische Reaktion mit Farbumschlag. Die spektralphotometrische Messung der optischen Dichte erfolgte automatisiert bei 405 nm, MIOS Microplate Reader on-board software, Software Version 1.5, Dynatech Laboratories, Ltd., Billingshurst, UK. Die Resultate berechneten sich unter Verwendung einer „four-parameter curve fitting procedure“ und Pyd-Standards in den Konzentrationen 0, 15, 40, 100, 250, 750 nmol/l. Die Angaben in den Einzelproben Urin, Serum und Dialysat sind in mmol Cross-links/ mmol Kreatinin bzw. für Serum in mmol/l und Urin, sowie Dialysat in mmol/ 24 Stunden. Die untere Nachweisgrenze für den Pyrilinks-IITM-Assay war 7,5 nmol/l.

Modifikationen:

1. Das Dialysat wurde unverdünnt eingesetzt, da die Restharnkonzentrierungsfähigkeit der Nieren entfiel. Die vom MIOS ermittelten Meßwerte für die Dialysate wurden deshalb für weitere Berechnungen durch den Faktor zehn dividiert.
2. Serum und Urin wurden 1:10 verdünnt eingesetzt, weil die über der oberen Nachweisgrenze liegenden Meßwerte eines Vorlaufs auf einen Matrixeffekt im Serum und auf eine ausreichende Konzentrierung des Urins hinwiesen.

3. Bei einem Probenmeßwert (n=21, ausschließlich Dialysate) unterhalb der Nachweisgrenze von 7,5 nmol/l, ging der Wert 7,5 nmol/l in die statistische Analyse ein. Die davon betroffenen Berechnungen für Dialysatwerte wurden mit 0,75 nmol/l fortgeführt, da diese unverdünnt eingesetzt worden waren.
4. Dialysatproben (n=10) wurden regelrecht verdünnt und erneut gemessen. Denn die erste Bestimmung hatte für das jeweilige Dialysat einen Wert oberhalb der Nachweisgrenze von 800 nmol/l, der nach Extrapolation des Algorithmus für die Standardkurve festgelegt worden war, ergeben.
5. Die Inkubationszeiten für den höchsten Standard (750 nmol/l) wurden individuell vor Zugabe der Stoplösung auf einen Extinktionswert von mindestens 1,0 variiert, um eine Kalibrationskurve von hinreichender Steilheit zu garantieren.

Protokoll zu den Aufstockungsversuchen

Unter Verwendung eines Immunoassays wurden die Aufstockungsversuche für Serum (n=6) zur Überprüfung der Richtigkeit sowie zum Nachweis der Verdünnungsechtheit durchgeführt.

Das Versuchsprotokoll lautet:

1. Serum nativ
2. 50 µl Serum + 450 µl Assaypuffer
3. 90 µl Serum + 10 µl Standard F (750 nmol/l)
4. 10 µl Serum + 10 µl Standard F (750 nmol/l) + 90 µl Assaypuffer

Die Meßwerte für nativ eingesetztes Serum und für Serum unter Zusatz des Standards F (750 nmol/l) überschritten die obere Nachweisgrenze um ein Vielfaches. Die Ursache ist ein Matrixeffekt mit einem überdurchschnittlich zu hoch konzentrierten Anteil an Proteinen im Serum, der eine Störung der Messungen bewirkt. Dagegen ergaben die Messungen für die Versuchsansätze unter 2. und 4. reelle Werte innerhalb der Nachweisgrenzen. Die Berechnung der Wiederauffindungsraten für den Standard F in 10 µl Serum und 90 µl Assaypuffer erfolgte in Abhängigkeit der Werte für die regelrecht verdünnten Sera.

Die Reproduzierbarkeit des Assays wurde anhand von Doppelbestimmungen der Kontrollen „low“ und „high“, sowie anhand von Serum- und Urinproben unterschiedlicher Pyridinium-Konzentration überprüft.

Die Cross-links werden im Serum oder nach Umrechnung auf Kreatinin als Konzentration bestimmt. Ein bekanntes Volumen aus Dialysat oder Urin wird dagegen als Cross-link-Menge bezeichnet.

3.2.2 Intaktes Parathormon im Plasma

Normbereich: 1,3 - 7,6 pmol/l

Material: 2 ml EDTA Plasma

Die Messung von humanem intaktem PTH 1 - 84 erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Immunoassay, N-tact[®] PTH, Incstar Corporation, Stillwater, MN, USA bzw. Immulite[®] Intact PTH, DPC Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA, USA. Die bis zur Umstellung

auf den neuen Hersteller DPC am 14.06.95 ermittelten Werte wurden nach folgender Formel (191) umgerechnet:

Parathyrin [Immulite[®] Intact PTH] (pmol/l) = $-1,00 + 1,32 \cdot$ Parathyrin [N-tact[®] PTH] (pmol/l).

Die unterschiedlichen Meßwerte beruhen am ehesten auf Unterschieden in der Kalibration.

Beide Immunoradiometrischen Assays (IRMA) funktionieren nach dem Sandwich-Prinzip. Sie verwenden zwei Sequenz-spezifische, gereinigte, einen an eine feste Phase gebundenen, gegen das C-terminale Fragment, PTH 39 - 84, gerichteten Antikörper, sowie einen mit Jod-125 markierten, gegen das N-terminale, PTH 1 - 34, spezifischen Antikörper. Die Konzentrationen von intaktem PTH in den Proben sind direkt proportional zu der im „ γ -counter“ gemessenen Radioaktivität (192).

3.2.3 Calcidiol, 25(OH)-Vitamin-D₃

Material: 2 ml Serum

Normbereich: Sommer: 9 - 49 μ g/l

Winter: 7,5 - 40 μ g/l

Die Bestimmung von 25(OH)-D₃ und anderen hydroxylierten Metaboliten erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Kit, 25-Hydroxyvitamin D ¹²⁵I RIA, Incstar Corporation, Stillwater, MN, USA. Der Radioimmunoassay (RIA) verwendet extrahiertes 25-OH-D aus der Probe, iodinierten [¹²⁵I] 25-OH-Vit₃ Tracer, 25-OH-D-spezifisches Antiserum und einen Antikörperpräzipitationskomplex „Donkey Anti-Goat Precipitating Complex“ (DAG). Es schließt sich eine Messung im Gammazintillationszähler an.

3.2.4 Calcitriol, 1, 25(OH)₂-D₃

Normbereich: 17 - 53 ng/l

Material: 4 ml Serum

Im Radio-Rezeptor-Assay (RRA) zur in-vitro-Bestimmung von 1, 25(OH)₂-D₃, Immundiagnostik GmbH, Bensheim, Deutschland, konkurrieren das 1, 25(OH)₂-D₃ aus der Probe und ein Tracer, ³H-markiertes 1, 25(OH)₂-D₃, um die begrenzte Anzahl von Bindungsstellen am spezifischen 1, 25(OH)₂-D₃-Rezeptor. Nach Abschluß der Reaktion erfolgt die Messung im „ β -counter“.

3.2.5 Alkalische Knochenphosphatase

Normbereich: Männer: 3,8 - 21,3 μ g/l

Frauen: 3,4 - 15,0 μ g/l

Material: 1 ml Serum

Der immunoradiometrische Festphasentest, Tandem[®]-R Ostase[™], Hybritech Inc., San Diego, CA, USA arbeitet nach dem Sandwich-Prinzip unter Verwendung von Antikörpern, die gegen zwei verschiedene antigene Determinanten des Moleküls gerichtet sind. Nach Bildung eines Immunkomplexes aus festphasengebundenem, gegen ein spezifisches Epitop gerichteten Antikörper, aus dem BAP-Molekül und aus einem ¹²⁵Iod-markiertem Tracer, der sich als Antikörper gegen eine andere antigene Determinante des Moleküls richtet, wird die

Radioaktivität in einem „ γ -counter“ gemessen. Sie steht in einem direkten proportionalen Verhältnis zur Konzentration von BAP in der Probe {2510}.

3.2.6 Alkalische Phosphatase

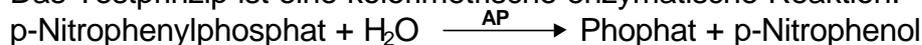
Normbereich: Männer 78-178 U/l

Frauen 59 -160 U/l

Material: 0,5 ml Serum

Der Alkalischer Phosphatase optimiert -Kit, Boehringer AG Mannheim, Mannheim, Deutschland bestimmt die Aktivität von AP im Serum automatisiert mit einem Hitachi 747, „Optimierte Standard-Methode“ der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, Alkalische Phosphatase EC 3.1.3.1.

Das Testprinzip ist eine kolorimetrische enzymatische Reaktion:



Nach Inkubation von Serum und Substratlösung liegt im Testansatz (um pH 10) praktisch vollständig gelb gefärbtes 4-Nitrophenolat vor. Die Zunahme der Extinktion bei 405 nm pro Zeiteinheit ist der Enzymaktivität in einem weiten Bereich direkt proportional (194, 195, 196, 197).

3.2.7 L- γ -Glutamyl-Transferase, γ GT

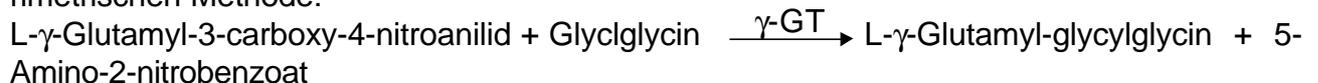
Normbereich bei 25 °C: Männer: 6 - 28 U/l

Frauen: 4 -18 U/l

Material: 0,5 ml Serum

Der L- γ -Glutamyl-Transferase-Kit, Boehringer AG Mannheim, Mannheim, Deutschland bestimmt die Aktivität von γ -GT im Serum automatisiert mit einem Hitachi 747, Methode nach Szasz.

Das Testprinzip der enzymatischen Reaktion beruht auf einer für γ -GT spezifischen kolorimetrischen Methode:



Das Produkt 3-Carboxy-4-Nitroanilin ist gelb gefärbt (Absorptionsmaximum bei 400 nm, kontinuierliche Messung der Extinktionszunahme bei 405 nm) (186, 198, 199, 200).

3.2.8 Ionisiertes Calcium

Normwerte: Männer: 1,20 - 1,31 mmol/l

Frauen: 1,21 - 1,34 mmol/l

Material: 0,5 ml Serum

Der ICATM1 Ionized Calcium Analyzer Radiometer Copenhagen, Radiometer A/S, Copenhagen, Denmark ist ein computergesteuertes System zur gleichzeitigen Bestimmung von ionisiertem Calcium und dem pH-Wert in einer Probe. Der Nachweis erfolgt über eine ionenselektive Elektrode aus einer Polyvinylchloridmembran mit meist langkettigen Phosphatdiestern als Ionenaustauscher (193).

3.2.9 Kreatinin

Normbereich (Serum): Männer: 0,6 - 1,2 mg/dl
 Frauen: 0,5 - 1,0 mg/dl
 (Urin): 1 - 26 mg/kg/Tag

Die Bestimmung von Urin-, Serum- und Dialysat-Kreatinin erfolgt spektralphotometrisch mit dem Synchron CX Kreatinin-Reagenz (Crea), Beckman Synchron CX[®]5 Clinical System, Beckman Instruments Inc., USA nach der enzymatisch-kolometrischen Jaffé-Reaktion:

Kreatinin + alkalisches Pikrat \longrightarrow Kreatininpikrat (roter Farbkomplex)

Kreatinin bildet mit alkalischer Pikratlösung einen roten Farbkomplex.

Die Extinktionsänderung wird bei 520 nm gemessen, die Extinktionsdifferenz ist direkt proportional zur Kreatininkonzentration im Probenmaterial (201,202).

3.2.10 Knochendensitometrie

Die Bestimmung der Knochendichte erfolgte standardisiert mit der DEXA, Lunar DPX-L X-Ray Knochendensitometer, DPX-L-Software 1.3, Lunar[®] Corporation, Madison, WI, USA. Die parallel zur Probenasservierung laufenden Untersuchungen umfaßten anterior-posteriore „scans“ der Lendenwirbelsäule und „scans“ des Femurknochens links. Insbesondere für die Auswertungen waren der Abschnitt LWS 2 - 4 und der Femurhals wichtig. Die jeweilige Untersuchungseinheit, die ROI, wird angegeben:

1. in g/cm².
2. in Prozent und Standardabweichung als T-Score. Der T-Score bezieht das Untersuchungsergebnis der BMD des Patienten, unabhängig von seinem Alter, auf einen Mittelwert einer Referenzpopulation aus „Jungen Erwachsenen“ des gleichen Geschlechts, im Alter von 20 - 39 Jahren. Für die Beurteilung des Osteoporoserisikos und für die statistische Auswertung ist der T-Score der relevante Parameter.
3. in Prozent und Standardabweichung, als Z-Score. Der Z-Score normt das Untersuchungsergebnis auf ein Kollektiv in Abhängigkeit vom Alter und der ethnischen Herkunft.

Da für diese Untersuchung die aktive Mitarbeit des Patienten gefordert war, wurde aus medizinischen bzw. ethischen Gründen nicht jeder densitometrisch untersucht.

3.2.11 Statistik

Die Kalkulationen und statistische Analysen für die Parameter wurden mit Excel Software 5.0 für Windows 95, Microsoft Corp., Redmond, OR, USA und Compaq Hardware, München, Germany, sowie SAS Statistical Analyses System Software 6.12, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA und IBM Hardware, Herrenberg, Germany durchgeführt.

Quelle: SAS/STAT[®] User's Guide, Version 6, Fourth Edition, Vol. 1 und Vol. 2, SAS Institute Inc. Cary, NC 27513, USA.

Die Angabe der Mittelwerte erfolgt als $\bar{x} \pm SD$. Die statistischen Tests waren zweiseitig, und ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant definiert.

Für die deskriptive statistische Berechnung über die Cross-link-Ausscheidung in die Dialysate wurde die univariate Varianzanalyse verwendet. Der Effekt der Zeit, unter Annahme der Nullhypothese, „es bestünde kein Zeiteffekt“, wurde mit einer mehrfaktoriellen multivariaten Varianzanalyse mit einem F-Test, „Manova Test Criteria and Exact F Statistics“ geprüft. Dabei wurden die Mittelwerte in den Zeitpunkten und bei konstantem Zeitpunkt zwischen den Patienten gebildet, zueinander in Beziehung gesetzt und Unterschiede bzw. Variabilitäten aufgezeigt. Die statistische Signifikanz einer zeitabhängigen Variabilität in der Cross-link-Ausscheidung wurde über alle Zeitpunkte, für zwei benachbarte Zeitpunkte und für die einzelnen Zeitpunkte im Kontrast zur Ausscheidung im Zeitpunkt A betrachtet.

Die Korrelation zwischen zwei Mittelwerten der für den Knochenstoffwechsel relevanten Variablen wurde mit der Korrelationsanalyse und dem Korrelationskoeffizienten, „Spearman's rank correlation coefficients“, unter der Nullhypothese $H_0: \rho=0$ untersucht. Ein $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant erklärt.

4 Ergebnisse

4.1 Wiederauffindungsraten im Aufstockungsversuch

Die Wiederauffindungsraten im Aufstockungsversuch (n=6) für Pyridinolin und Deoxypyridinolin mit Standard F (750 nmol/l) im Serum betragen $95,5 \pm 6,4$ % (x±SD), Spannweite 85,1 - 106,0 %, C.V. = 6,7 %.

4.2 Doppelbestimmungen

4.2.1 Doppelbestimmungen für Serum und Urin

Die Variationskoeffizienten für die Doppelbestimmungen in Serum (n=39) waren $7,7 \pm 8,3$ % (x±SD), Spannweite 0,3 - 37,5 %, und im Urin (n=10) $2,7 \pm 1,9$ % (x±SD), Spannweite 0,7 - 6,9%.

4.2.2 Doppelbestimmungen für Kontrollen „low“ und „high“

Die Intraassay-Variationskoeffizienten waren für K low 7,8 % und für K high 7,9 % in Charge 1 (n=5) sowie für K low 12,8 % und für K high 1,1 % in Charge 2 (n=3). Die Interassay-Variationskoeffizienten waren für K low 20,3 % und für K high 21,1 % in Charge 1 (n=5) sowie für K low 5,2 % und für K high 8,6 % in Charge 2 (n=3).

Tabelle 1 und Tabelle 2 zeigen die Ergebnisse.

Tabelle 1 Intraassay-Ergebnisse

Variable	C.V. von	C.V. bis	C. V. x	C.V. SD
Charge 1				
K low	0,8	17,2	7,8	5,9
K high	2,8	12,4	7,9	3,8
Charge 2				
K low	2,2	28,6	12,8	11,4
K high	0,9	1,4	1,1	0,2

Tabelle 2 Interassay-Ergebnisse

Variable	x der Kontrollmittelwerte	SD	C.V.
Charge 1			
K low	113,2	23,0	20,3%
K high	388,7	82,0	21,1%
Charge 2			
K low	80,9	4,2	5,2%
K high	451,4	38,8	8,6%

Legende zu Tabelle 1 und 2:

C.V. = Variationskoeffizient in Prozent

x = Mittelwert in Prozent

SD = Standardabweichung in Prozent

Charge 1 mit Lot no. 5L180 (n=5)

Charge 2 mit Lot no. 6B105 (n=3)

K low = Pyd-Kontrolle „niedrig“

K high = Pyd-Kontrolle „hoch“

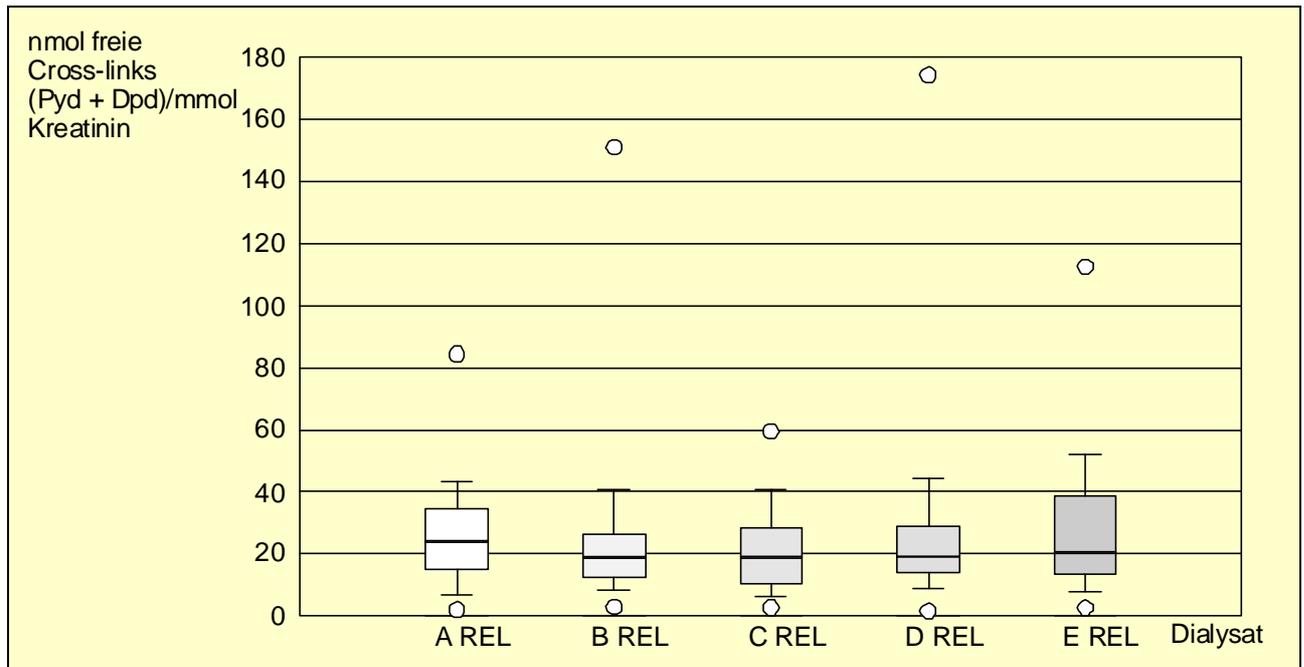
4.3 Verteilung der freien Cross-links Pyd + Dpd in den Dialysaten

Die univariate Varianzanalyse zeigt die Verteilung (Tabelle 3) der Cross-links in zeitlicher Abfolge der Beutelwechsel. Von der ersten (26,7 nmol/mmol) über die zweite (24,0 nmol/mmol) auf die dritte (21,4 nmol/mmol) Probe fiel die Ausscheidung im Mittel ab. Darauf folgte ein Anstieg für die vierte und fünfte Dialysatprobe mit 24,6 nmol/mmol und 29,4 nmol/mmol respektive. Die Werte innerhalb der Minima und Maxima variierten innerhalb einer großen Spannweite.

Tabelle 3

Verteilung der freien Cross-links (Pyd + Dpd) in nmol/mmol
Kreatinin in den Dialysatproben von CAPD-Patienten

Dial	n	x	SD	Min	10%	25%	Med	75%	90%	Max
A REL	59	26,7	17,6	2,0	6,7	15,2	23,9	34,4	43,0	84,3
B REL	59	24,0	23,0	2,9	8,2	12,5	18,7	26,4	40,6	151,0
C REL	59	21,3	13,6	2,8	5,9	10,7	18,8	28,3	40,6	59,4
D REL	58	24,6	23,4	1,6	8,7	14,0	19,0	28,5	44,5	174,3
E REL	25	29,4	23,7	2,7	7,7	13,4	20,5	38,7	52,0	112,7



Legende zu Tabelle 3:

Dial = Dialysatproben

A REL = nmol (Pyd + Dpd)/mmol Kreatinin in Dialysat A

B REL = nmol (Pyd + Dpd)/mmol Kreatinin in Dialysat B

C REL = nmol (Pyd + Dpd)/mmol Kreatinin in Dialysat C

D REL = nmol (Pyd + Dpd)/mmol Kreatinin in Dialysat D

E REL = nmol (Pyd + Dpd)/mmol Kreatinin in Dialysat E

n = Anzahl der Dialysatproben

x = Mittelwert

SD = Standardabweichung

Min = Minimum

Max = Maximum

Med = Median

4.4 Zirkadianer Rhythmus

Die Tabelle 4 zeigt die p-Werte für die Dialysatproben als abhängige Variablen in einer Gesamtfunktion über die Zeit mit den jeweiligen Einzelfunktionen der benachbarten Kontrastvariablen. Der MANOVA-Test auf den Zeiteffekt ($p < 0,05$) war signifikant im Gesamtvergleich über die Dialysatproben A, B, C ($n=59$) mit $p=0,018$, über die Dialysatproben A, B, C, D ($n=58$) mit $p=0,045$ und über die Dialysatproben A, B, C, D, E ($n=25$) mit $p=0,003$. Für die Dialysatproben A, B ($n=59$) im Gesamtzeitvergleich, als auch für die Einzelvergleiche über alle Variablen im sukzessiven Zeitvergleich zeigte sich kein signifikantes Ergebnis.

Tabelle 4

Zeiteffekt im Einzelvergleich der Nachbarvariablen

n	Gesamt	Einzel A, B	Einzel B, C	Einzel C, D	Einzel D, E
59	0,314	0,314			
	*				
	*				
	*				

59	0,018	0,314	0,282		
58	0,045	0,328	0,299	0,323	
25	0,003	0,277	0,501	0,304	0,075

Die Tabelle 5 zeigt die p-Werte für die Dialysatproben als abhängige Variablen in einer Gesamtfunktion über die Zeit mit den Einzelfunktionen der Variablen in Kontrast zur Variablen A. Die Beobachtung als Einzelfunktion der Variablen im zeitlichen Kontrast zur Variable A war signifikant mit $p=0,005$, $p=0,006$ und $p=0,055$ für die Dialysatproben A, C innerhalb ihrer Gesamtfunktionen, und weiter signifikant mit $p=0,001$ für die Dialysatproben A, D in der Gesamtfunktion A, B, C, D, E. Die Betrachtung der übrigen Einzelvariablen im kontrastierten Zeitvergleich zeigte keine signifikanten p-Werte.

Tabelle 5
Zeiteffekt im Vergleich zur Variablen A

n	Gesamt	Einzel A, B	Einzel A, C	Einzel A, D	Einzel A, E
59	0,314	0,314			
59	0,018*	0,314	0,005*		
58	0,045*	0,328	0,006*	0,343	
25	0,003*	0,277	0,055*	0,001*	0,893

Legende zu Tabelle 4 und 5:

Dial = Dialysatproben

n = Anzahl der Dialysatproben

Gesamt = p-Wert des Zeiteffektes für die Dialysatproben im Gesamtvergleich

Einzel = p-Wert des Zeiteffektes für zwei Dialysatproben im Einzelvergleich

* = Signifikanzniveau $< 0,05$ ist statistisch signifikant

4.5 Clearance von Cross-links und Kreatinin

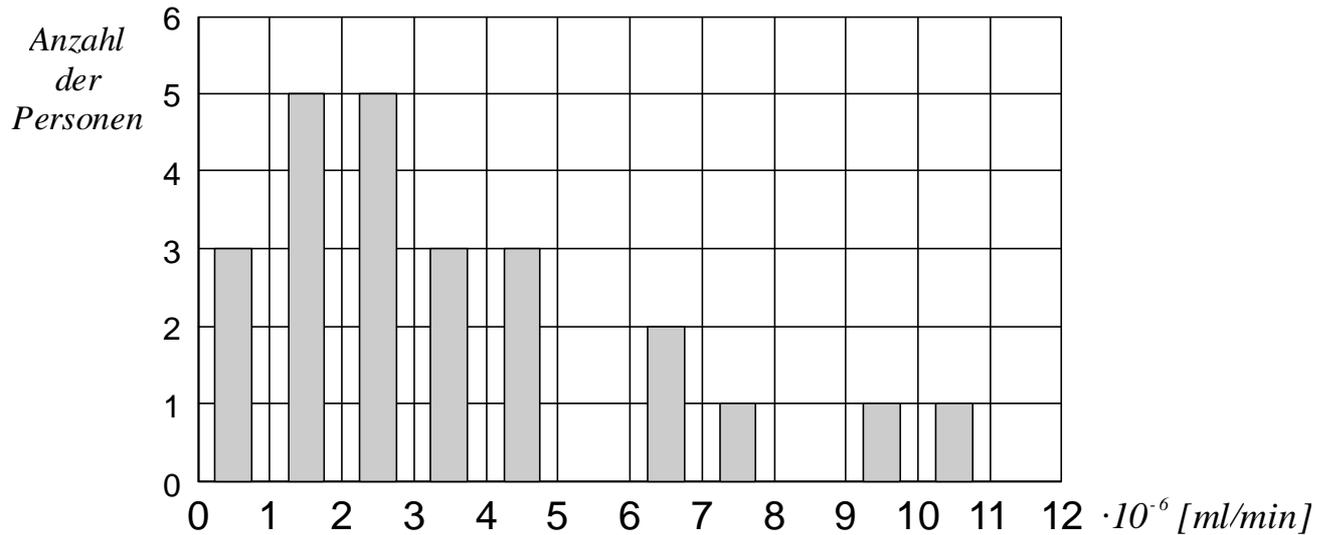
4.5.1 Gesamt-Clearancerate der Cross-links

Die Gesamt-Clearancerate (Tabelle 6) von Pyd und Dpd in Dialysat und Urin ($n=25$) variierte zwischen $9,37 \cdot 10^{-7}$ und $2,21 \cdot 10^{-5}$ ml/min. Es bestand kein Hinweis auf eine Werteakkumulation.

Tabelle 6

Gesamt-Clearancerate der freien Cross-links Pyridinolin und Deoxyypyridinolin für Dialysat und Urin in ml/min für 25 Patienten

Nr.	Nr.								
1	9,3736E-07	6	1,5846E-06	11	2,3378E-06	16	3,4165E-06	21	6,4721E-06
2	9,5362E-07	7	1,8124E-06	12	2,5782E-06	17	4,0404E-06	22	7,2924E-06
3	9,9397E-07	8	1,9727E-06	13	2,9126E-06	18	4,8071E-06	23	9,4413E-06
4	1,2693E-06	9	2,1281E-06	14	3,2285E-06	19	4,8349E-06	24	1,0019E-05
5	1,3808E-06	10	2,2345E-06	15	3,3303E-06	20	6,1376E-06	25	2,2054E-05



4.5.2 Korrelation zwischen Cross-link- und Kreatinin-Clearance im Dialysat

Die Clearance der Cross-links im Dialysat ($n=67$) war im Mittel $2,252 \cdot 10^{-6} \pm 1,9543 \cdot 10^{-6}$ ml/min. Die Clearance von Kreatinin im Dialysat ($n=67$) war $4,7975 \cdot 10^{-6} \pm 1,3897 \cdot 10^{-6}$ ml/min. Die Clearance der Cross-links korrelierte signifikant mit der Clearance von Kreatinin, $r=0,559$, $p=0,0001$, $n=67$.

4.6 Deskription der Knochenstoffwechsellparameter

Legende zu Tabelle 7,8,9 und 10:

SUMREL = nmol (Pyd + Dpd) in nmol/mmol Kreatinin aus allen Dialysatproben einer BC, dividiert durch die Anzahl der Dialysatproben dieser BC

SEREL = nmol (Pyd + Dpd)/mmol Kreatinin im Serum

SUMABS = nmol (Pyd + Dpd)/24 h, berechnet als Summe der Einzelprodukte aus Dialysatproben bzw. Urin, nmol (Pyd + Dpd)/l mit der jeweilig zugehörigen Auslauf- bzw. Ausscheidungsmenge in l

SERABS = (Pyd + Dpd) in nmol/l im Serum

URIN= (Pyd + Dpd) in nmol/mmol Kreatinin im Urin

PTH = Intaktes Parathormon in pmol/l

BAP = Alkalische Knochenphosphatase in $\mu\text{g/l}$

VIT25 = 25(OH)-D₃ in $\mu\text{g/l}$

VIT125 = 1, 25(OH)₂-D₃ in ng/l

CA = Ionisiertes Calcium in mmol/l bei pH 7,4

GGT = Gamma-Glutamyl-Transferase in U/l

AP = Alkalische Phosphatase in U/l

BMD L = Absolute Knochendichte der ROI LWS 2 - 4 in g/cm^2

TLP = Umrechnung der absoluten Knochendichte von LWS 2 - 4 in Prozent, genormt auf „Junge Erwachsene“ im Alter von 20 - 40 Jahren

TLSD = Berechnung der Standardabweichung als T-Score für die ROI LWS 2 - 4

ZLP = Umrechnung der absoluten Knochendichte von LWS 2 - 4 in Prozent, in Abhängigkeit von Alter und ethnischer Herkunft

ZLSD = Berechnung der Standardabweichung als Z-Score für die ROI LWS 2 - 4

BMD F = Absolute Knochendichte der ROI Femurhals in g/cm^2

TFP = Umrechnung der absoluten Knochendichte für den Femurhals in Prozent, genormt auf „Junge Erwachsene“ im Alter von 20 - 40 Jahren

TFSD = Berechnung der Standardabweichung als T-Score für die ROI Femurhals

ZFP = Umrechnung der absoluten Knochendichte des Femurhalses in Prozent, in Abhängigkeit von Alter und ethnischer Herkunft

ZFSD = Berechnung der Standardabweichung als Z-Score für die ROI Femurhals

n = Anzahl der Stichproben

x = Mittelwert

SD = Standardabweichung

Med = Median

Min = Minimum

Max = Maximum

r = Korrelationskoeffizient

p = p-Wert

* = Signifikanzniveau $< 0,05$ ist statistisch signifikant

Normbereich = Referenzintervall des Einzelparameters

Nr. = Nummer

Tabelle 7

Knochenstoffwechselfparameter mit jeweiliger Stichprobenanzahl aller Patienten, Mittelwert und Standardabweichung sowie Median, Minimum und Maximum (Einzelheiten vgl. Legende zu Tabelle 7, Seite 39)

Variable	n	x	SD	Med	Min	Max	Normbereich
SUMREL	96	20,4	16,2	15,6	2,2	75,9	
SEREL	80	59,9	69,0	41,5	9,7	587,4	
SUMABS	38	288,2	187,9	247,8	57,3	785,7	
SERABS	80	54,5	45,7	43,1	7,5	296,0	
URIN	39	31,8	29,0	29,9	0,0	150,8	13 - 93
PTH	79	22,8	26,2	15,0	0,2	149,0	1,1 - 5,8
BAP	81	10,1	7,6	7,8	0,7	37,0	3,4 - 21,3
VIT25	70	14,8	12,1	10,0	3,7	54,0	7,5 - 49
VIT125	69	15,6	14,8	9,9	0,7	72,0	17 - 53
CA	77	1,20	0,16	1,21	0,41	1,63	1,20 - 1,34
GGT	82	22,3	30,7	13,0	5,0	201,0	4 - 28
AP	82	125	46	117	41	287	59 - 178
BMD L	63	1,185	0,215	1,215	0,718	1,674	
TLP	63	96,5	18,0	99,0	58,0	134,0	
TLSD	61	-0,290	1,812	-0,050	-4,350	3,470	
ZLP	63	98,8	18,5	100,0	59,0	139,0	

ZLSD	61	-0,109	1,849	0,050	-4,180	3,670
BMD F	59	0,919	0,176	0,933	0,639	1,692
TFP	59	88,1	16,4	90,0	60,0	158,0
TFSD	57	-0,989	1,450	-0,800	-3,590	5,180
ZFP	59	94,2	18,4	96,0	64,0	174,0
ZFSD	57	-0,505	1,523	-0,380	-3,140	5,980

4.6.1 Cross-links

4.6.1.1 Cross-links kreatininkorrigiert

Die Mittelwerte und Standardabweichung der Messungen waren für Serum (SEREL) mit $59,9 \pm 68,9$ nmol/mmol Kreatinin (n=80), für die Dialysate (SUMREL) $20,4 \pm 16,2$ nmol/mmol Kreatinin (n=96) und für Urin (URIN) $31,8 \pm 29,0$ nmol/mmol Kreatinin (n=39). Die Cross-links im Serum waren gegenüber dem Anteil im Dialysat um das 2,9-fache und gegenüber dem Anteil im Urin um das 1,9-fache erhöht.

4.6.1.2 Cross-links nicht-kreatininkorrigiert

Die absolute Konzentration der Cross-links im Serum (SERABS) war $54,5 \pm 45,7$ nmol/l (n=80). Die Ausscheidungsmenge über 24 Stunden in Dialysat und Urin (SUMABS) betrug $288,2 \pm 188,9$ nmol/24 h (n=38).

4.6.2 Konventionelle Knochenstoffwechselfparameter in Serum bzw. Plasma

PTH war mit $22,8 \pm 26,2$ pmol/l (n=79) um das 3-fache des oberen Normwertes erhöht. VIT125 mit $15,6 \pm 14,8$ ng/l (n=69) und CA mit $1,20 \pm 0,16$ mmol/l (n=77) grenzten an den unteren Normbereich. VIT25 mit $14,8 \pm 12,1$ µg/l (n=70) bewegte sich dagegen innerhalb des unteren Referenzbereiches. GGT mit $22,3 \pm 30,7$ U/l (n=82), AP mit 125 ± 46 U/l (n=82) und BAP mit $10,1 \pm 7,6$ µg/l (n=81) zeigten Werte im Normbereich.

4.6.3 Knochendichtemessung

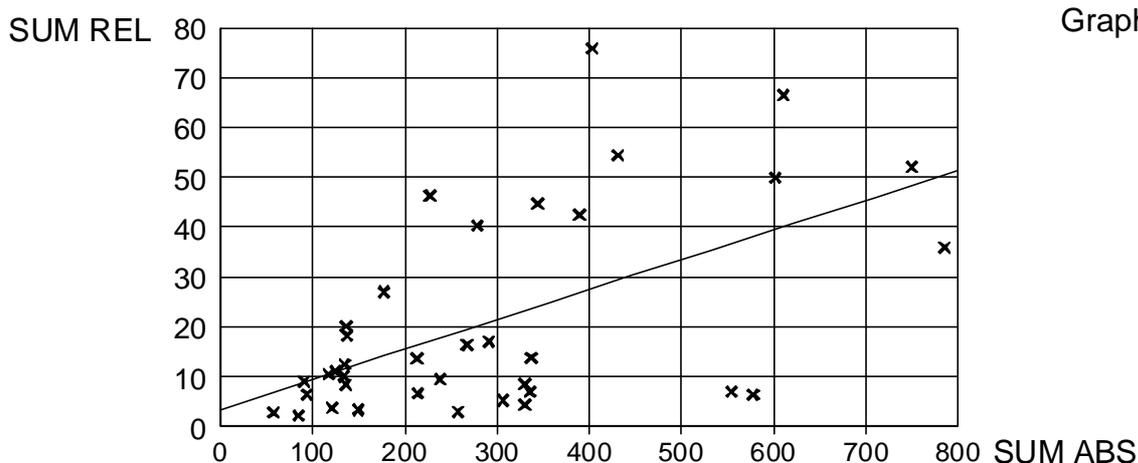
Jede Knochendichte (Tabelle 7) ist durch einen absoluten Wert, einen Prozentwert und seine zugehörige Standardabweichung beschrieben. Ein Normbereich kann nicht angegeben werden, weil sich beide Scores für jeden einzelnen Patienten bereits in Bezug auf ein ausgewähltes Referenzkollektiv berechnen. Die Standardabweichungen wiesen auf eine erniedrigte Knochendichte in LWS und Femurhals hin. Die Knochendichte des Femurhalses war absolut, prozentual und in den Standardabweichungen niedriger als die Knochendichte der Lendenwirbelsäule.

4.7 Korrelationen

4.7.1 Korrelationen (Tabelle 8, Seite 44) zwischen den Cross-links in Dialysat oder Serum, kreatininkorrigiert, mit den anderen Knochenstoffwechselfparametern

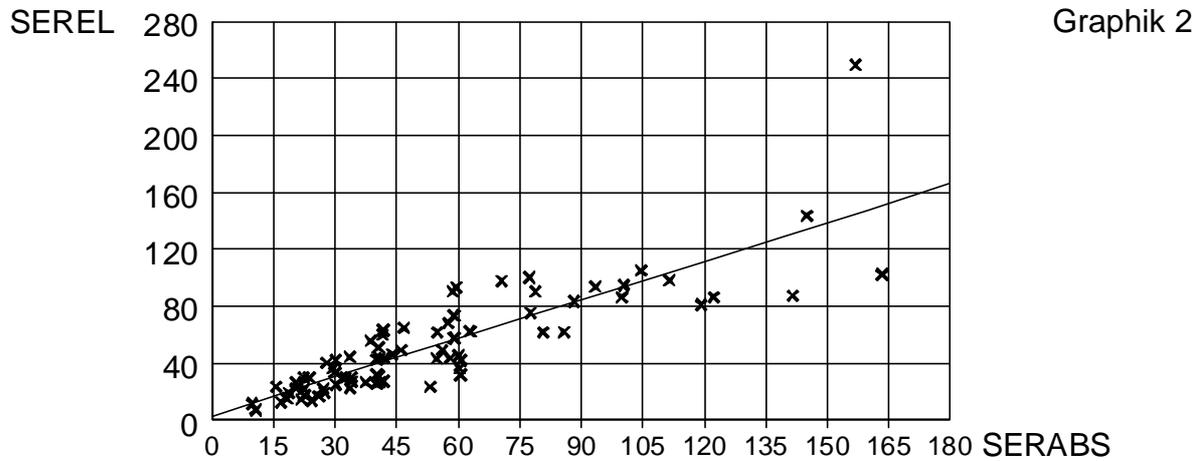
Die kreatininkorrigierten Cross-links in den Dialysaten (SUMREL) korrelierten signifikant mit den kreatininkorrigierten Cross-links im Serum (SEREL), $r=0,285$, $p=0,011$, $n=79$. Sie korrelierten ebenfalls signifikant mit der Cross-link-Konzentration im Serum (SERABS), $r=0,243$, $p=0,031$, $n=79$ und mit den Cross-links in Dialysat und Urin über 24 Stunden (SUMABS) mit $r=0,505$, $p=0,001$, $n=38$ (Graphik 1). Eine signifikante Korrelation bestand zwischen SEREL und SERABS mit $r=0,887$, $p=0,0001$, $n=80$ (Graphik 2) und zwischen SEREL und SUMABS mit $r=0,636$, $p=0,0005$, $n=26$ (Graphik 3). PTH korrelierte signifikant mit SEREL, $r=0,271$, $p=0,020$, $n=73$ (Graphik 4). Die übrigen Korrelationen zeigten keine signifikanten Werte.

$$r = 0,505 \quad p = 0,0001 \quad n=38$$



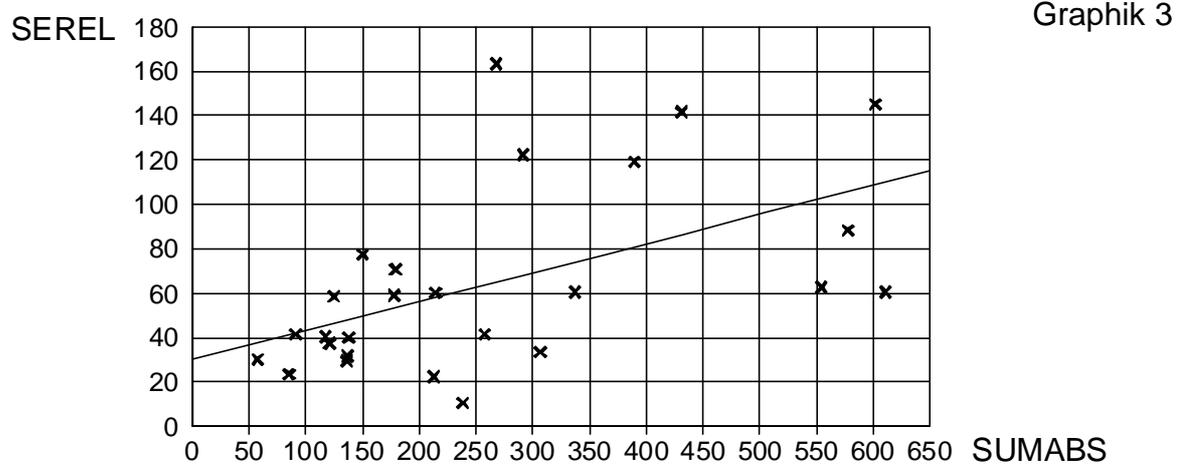
Graphik 1 zeigt die signifikante Korrelation mit $r=0,505$, $p=0,001$, $n=38$ zwischen SUMREL [nmol (Pyd + Dpd) in nmol/mmol Kreatinin aus allen Dialysatproben einer BC, dividiert durch die Anzahl der Dialysatproben dieser BC] und SUMABS [nmol (Pyd + Dpd)/24 h, berechnet als Summe der Einzelprodukte aus Dialysatproben bzw. Urin, nmol (Pyd + Dpd)/l mit der jeweilig zugehörigen Auslauf- bzw. Ausscheidungsmenge in l].

$$r = 0,887 \quad p = 0,0001 \quad n = 80$$



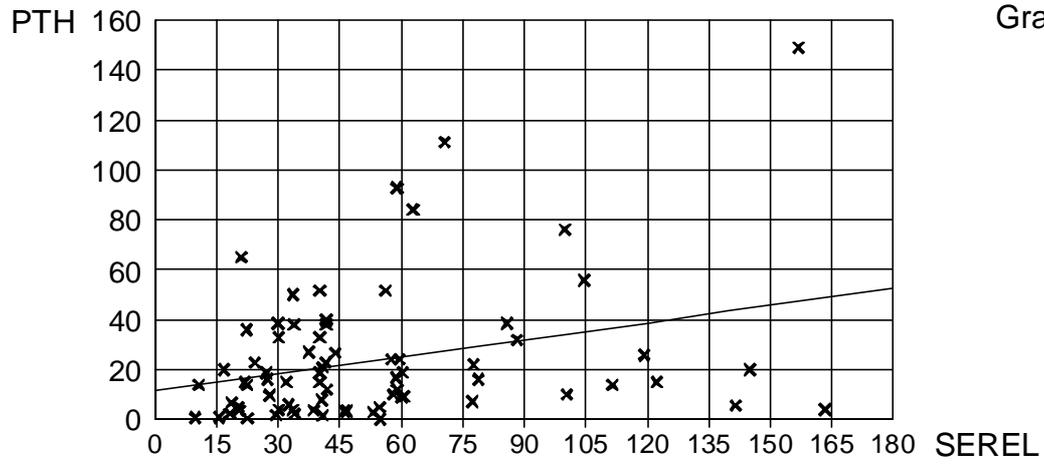
Graphik 2 stellt die signifikante Korrelation mit $r=0,887$, $p=0,0001$, $n=80$ zwischen SEREL [nmol (Pyd + Dpd)/mmol Kreatinin im Serum] und SERABS [(Pyd + Dpd) in nmol/l im Serum] dar.

$$r = 0,636 \quad p = 0,0005 \quad n = 26$$



Graphik 3 beschreibt die Korrelation von SEREL [nmol (Pyd + Dpd)/mmol Kreatinin im Serum] und SUMABS [nmol (Pyd + Dpd)/24 h, berechnet als Summe der Einzelprodukte aus Dialysatproben bzw. Urin, nmol (Pyd + Dpd)/l mit der jeweilig zugehörigen Auslauf- bzw. Ausscheidungsmenge in l] mit $r=0,636$, $p=0,0005$, $n=26$.

$$r = 0,271 \quad p = 0,020 \quad n = 73$$



PTH [Intaktes Parathormon in pmol/l] korrelierte signifikant mit SEREL [nmol (Pyd + Dpd)/mmol Kreatinin im Serum] mit $r=0,271$, $p=0,020$, $n=73$ (Graphik 4).

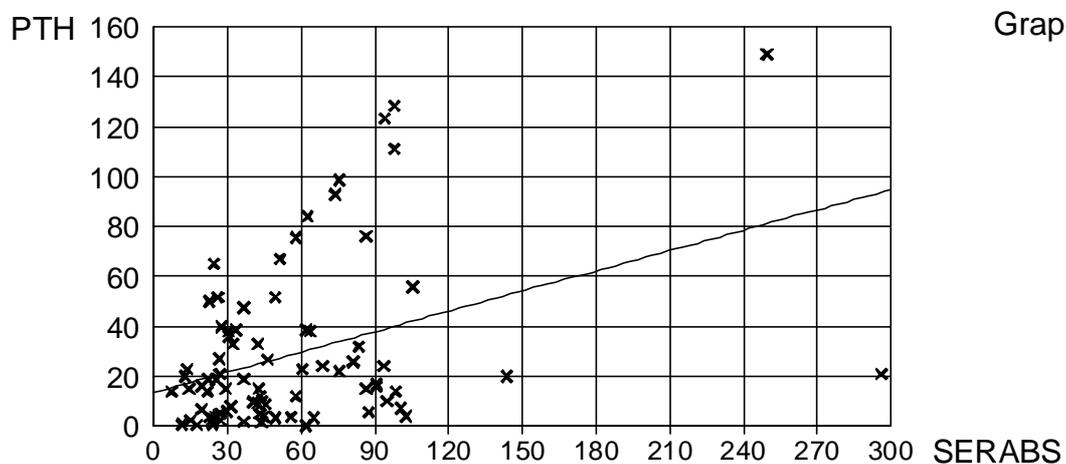
Tabelle 8

Korrelationen zwischen Cross-links (kreatininkorrigiert) und den einzelnen Knochenstoffwechselfparametern

Variable	n	SUMREL r	SUMREL p	n	SEREL r	SEREL p
SUMREL	96			79	0,285	*0,0110
SERABS	79	0,243	*0,031	80	0,887	*0,0001
SUMABS	38	0,505	*0,001	26	0,636	*0,0005
PTH	78	-0,169	0,139	73	0,271	*0,0200
BAP	80	0,076	0,501	78	0,114	0,3210
VIT25	69	-0,169	0,165	70	0,065	0,5950
VIT125	68	-0,139	0,260	69	0,078	0,5270
CA	76	-0,046	0,692	75	-0,041	0,725
BMD L	63	-0,193	0,129	55	-0,092	0,503
TLP	63	-0,194	0,128	55	-0,065	0,636
TLSD	61	-0,149	0,251	53	-0,017	0,903
ZLP	63	-0,145	0,258	55	-0,047	0,735
ZLSD	61	-0,119	0,360	53	-0,016	0,912
BMD F	59	-0,196	0,136	52	-0,226	0,108
TFP	59	-0,231	0,078	52	-0,229	0,102
TFSD	57	-0,179	0,183	50	-0,191	0,184
ZFP	59	-0,064	0,638	52	-0,087	0,541
ZFSD	57	-0,090	0,506	50	-0,122	0,398

4.7.2 Korrelationen (Tabelle 9, Seite 45) zwischen den Cross-links in Dialysat und Urin oder Serum, nicht-kreatininkorrigiert, mit den anderen Knochenstoffwechselfparametern

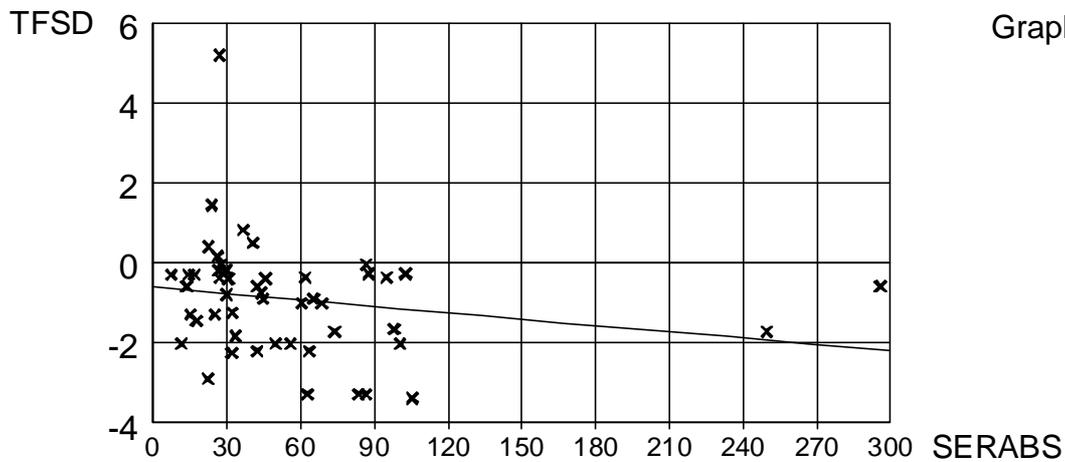
$$r = 0,38 \quad p = 0,003 \quad n = 80$$



Graphik 5

Die Graphik 5 beschreibt die signifikante Korrelation zwischen PTH [Intaktes Parathormon in pmol/l] und SERABS [(Pyd + Dpd) in nmol/l im Serum]. Sie war signifikant mit $r=0,38$ und $p=0,003$ für $n=80$.

$$r = -0,310 \quad p = 0,029 \quad n = 50$$



Eine negativ-lineare Korrelation bestand zwischen SERABS [(Pyd + Dpd) in nmol/l im Serum] und TFSD [Berechnung der Standardabweichung als T-Score für die ROI Femurhals], $r=-0,310$, $p=0,029$, $n=50$.

PTH korrelierte signifikant mit SERABS, $r=0,38$, $p=0,003$, $n=80$ (Graphik 5). Die Knochendichteparameter für den Femurhals korrelierten signifikant mit SERABS. Die negativ-linearen Korrelationen waren zwischen SERABS und TFSD, $r=-0,310$, $p=0,029$, $n=50$ (Graphik 6), zwischen SERABS und TFP, $r=-0,330$, $p=0,017$, $n=52$, sowie zwischen SERABS und BMD F, $r=-0,304$, $p=0,028$, $n=52$. Die übrigen Korrelationen zeigten keine signifikanten Werte.

Tabelle 9

Korrelation zwischen den Cross-links (nicht-kreatininkorrigiert) und den einzelnen Knochenstoffwechselfparametern

Variable	n	SUMABS r	SUMABS p	n	SERABS r	SERABS p
PTH	27	-0,098	0,626	80	0,380	*0,003
BMD F	22	-0,304	0,169	52	-0,304	*0,028
TFP	22	-0,352	0,108	52	-0,330	*0,017
TFSD	21	-0,296	0,192	50	-0,310	*0,029
SUMABS	38			26	0,257	0,204
BAP	27	0,050	0,804	78	0,130	0,256
VIT25	22	-0,152	0,500	70	0,033	0,785
VIT125	21	0,301	0,186	69	0,031	0,799
CA	25	0,000	1,000	75	-0,056	0,632
BMD L	24	-0,178	0,404	55	-0,113	0,413
TLP	24	-0,187	0,382	55	-0,093	0,498
TLSD	23	-0,129	0,557	53	-0,054	0,703
ZLP	24	-0,113	0,560	55	-0,109	0,428
ZLSD	23	-0,059	0,790	53	-0,075	0,592
ZFP	22	-0,118	0,602	52	-0,236	0,093
ZFSD	21	-0,118	0,609	50	-0,264	0,064

5 Diskussion

Der Knochenstoffwechsel von Peritonealdialysepatienten ist häufig durch eine pathologische renal-ossäre Kommunikation verändert. Trotz der klinischen Relevanz, die sich für dieses Patientenkollektiv daraus ergibt, ist die Anzahl themenspezifischer Untersuchungen dazu gering.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit diesen Knochenstoffwechselveränderungen von Peritonealdialysepatienten. Für die Untersuchung wurde ein Immunoassay, der die freien Cross-links Pyridinolin und Deoxypyridinolin in Serum, Dialysat und Urin bestimmt, eingesetzt.

Der knochenresorptive Prozess ist durch endogene „Organismus-spezifische“, als auch durch exogene Komponenten beeinflussbar. Ziel dieser Untersuchung war es, dieser Komplexität gerecht zu werden, und trotzdem gleichzeitig Regelmäßigkeiten oder Tendenzen innerhalb dieser Vorgänge zu erkennen und aufzuzeigen.

5.1 Anmerkungen zur Studiendurchführung

5.1.1 Krankheit und Therapie

Die anti-resorptive Therapie wurde während des gesamten Untersuchungszeitraumes weder modifiziert noch beendet. Damit genügt die Untersuchung dem Anspruch auf Behandlungsstabilität, weil nur dann die Anwendbarkeit biochemischer Parameter als gesichert gilt (203). Die Untersuchung kommt demnach zu Ergebnissen unter klinischen Alltagsbedingungen. Somit ist eine reelle Aussage über ein Kollektiv aus Peritonealdialysepatienten möglich. Ein unbehandelter oder nicht anbehandelter Patient ist dagegen aufgrund von Dauer und Schwere seiner Erkrankung eine untypische Erscheinung und bildet ein künstliches Kollektiv.

Die gemessenen Kreatininkonzentrationen in dieser Untersuchung sind nicht durch muskulär-spezifische Erkrankungen, eine über- oder unterdurchschnittliche Muskelmasse sowie sonstige metabolische oder altersabhängige Veränderungen (110) beeinflusst. Damit ergaben sich wahre Kreatininkonzentrationen und, um den Retentionsfaktor bereinigte, aussagefähige Cross-link-Mengen.

Die Einflußfaktoren, wie z. B. Nahrung, Alter, Geschlecht oder Osteoporose sind für dieses Untersuchungskollektiv dagegen irrelevant. Sie werden von der Grunderkrankung oder von den Therapieeffekten überlagert, oder sie entstehen erst gar nicht. Denn die Dialyse- und anti-resorptive Therapie verhindern gemeinsam das Wirksamwerden gängiger ossär-spezifischer Einflüsse oder therapieren diese unerkannt mit.

5.1.2 Immunoassay zur Bestimmung von freiem Pyridinolin und Deoxypyridinolin

Die Entscheidung für den Nachweis von freiem Pyridinolin und Deoxypyridinolin beruht auf ihren Eigenschaften. Sie sind brauchbare und empfindliche diagnostische

Knochenresorptionsparameter für symptomatische sowie asymptomatische pathologische Knochenprozesse (38, 69, 71, 204, 233). Die simultane Bestimmung von freiem Pyd und Dpd gewährleistet eine hohe diagnostische Signifikanz (205). Der Immuno-assay ist standardisiert, preiswert (160) und für die diagnostische Routine geeignet (98, 114).

Die Entscheidung zur Bestimmung der Cross-links im Serum und im Dialysat ergibt sich aus der verminderten Urinproduktion und -ausscheidung von Dialysepatienten. Der übliche Einsatz dieser Marker im Urin dieser Patienten ist häufig eingeschränkt oder nicht durchführbar. Die Alternative, Cross-links auch in Serum oder Dialysat zu bestimmen, macht einen Rückgriff auf andere, weniger aussagefähige Parameter mangels Analysat (164) unnötig. Eine Interpretation und Neubewertung knochenmetabolischer Prozesse wäre somit auch für oligourische bzw. anurische Patienten möglich.

5.1.3 Menge und Konzentration, eine Begriffserläuterung

Der Begriff Cross-links bezeichnet in der vorliegenden Untersuchung die freien Cross-links Pyd und Dpd, bestimmt mit einem Immunoassay. Die Darstellung der Cross-link-Werte erfolgt im Serum als Konzentration und als Menge. Konzentration in nmol/l bezeichnet den nicht auf Kreatinin genormten Meßwert, Menge in nmol/mmol Kreatinin dagegen den auf Kreatinin bezogenen Wert. Die Meßwerte für Dialysat und Urin sind durchgängig um den zugehörigen Kreatininwert korrigiert. Damit ist die Einflußgröße Ausscheidungsvolumen eliminiert. Der Begriff System bezeichnet das jeweilige Medium, in dem die Cross-links bestimmt wurden.

5.2 Aufstockungsversuche, Doppelbestimmungen, Intra- und Inter-Assay-Variation

Die Untersuchung hat den Nachweis von Cross-links in Serum, Dialysat und Urin bei CAPD-Patienten erbracht.

Nach Verdünnung war die Wiederauffindung des Standards in den Aufstockungsversuchen durchgängig in den Sera gegeben. Erwartungsgemäß zeigte sich keine Interdependenz zu den unterschiedlichen Serumkonzentrationen. Ein bemerkenswerter Verlust von Cross-link-Verbindungen ist damit bei der Probenasservierung oder unter Anwendung des Immunoassays auszuschließen.

Das Antiserum war für die Bestimmung von Pyridinium-Verbindungen im Serum spezifisch. Der Assay ist somit für den Nachweis im Serum tauglich. Eine abgeschwächte Verdünnung der Proben, die die Nachweisempfindlichkeit des Immunoassays steigern soll (114), ist damit nicht obligat. Die Intra-Assay- bzw. Inter-Assay-Variationen zeigten klinisch-chemisch adäquate Werte.

Die Einzelmessungen, die Doppelbestimmungen und die Aufstockungsversuche dokumentieren das Vorhandensein freier Cross-links in Serum, Dialysat und Urin. Der Immunoassay ist geeignet, freies Pyd und Dpd im Serum, Dialysat und Urin zu bestimmen. In Übereinstimmung mit Kung et al. (153) handelt es sich bei dem Immunoassay um eine sinnvolle und zweckmäßige Nachweismethode. Der Assay verfügt über eine zu vernachlässigende Kreuzreaktivität mit peptidgebundenen Cross-links und Assay-Antikörpern, eine hohe Präzision und eine minimale Seruminterferenz.

Walne et al. (82) haben eine Beeinträchtigung des Probenmaterials während mehrmaliger Einfrier- und Auftauzyklen beschrieben. Die Cross-links waren dabei im Urin weniger stabil als im Serum. Die Einzelproben wurden in der vorliegenden Studie dagegen durchgängig nur einmalig eingefroren und wiederaufgetaut. Damit ist eine Beeinträchtigung der Untersuchungsergebnisse ausgeschlossen.

Eine Serumreinigung mittels Ultrafiltration (70) zeigt, nach Vergleich der Ergebnisse mit anderen Studien, keine Optimierung der Meßwerte. Sie fand deshalb in der vorliegenden Untersuchung keine Anwendung.

5.2.1 Kreuzreaktivität

Die Pyridinium-Derivate sind in der vorliegenden Untersuchung gleichzeitig in Serum, Dialysat und Urin nachgewiesen worden. Da die Metabolisations- und Degradationsprozesse sich wahrscheinlich nicht in allen Systemen gleichen, sind Immunoassay-bedingte Kreuzreaktionen nicht vollständig auszuschließen.

Ausscheidungsvarianten und die molekularspezifische Verteilung der Cross-links (67) machen eine Erfassung von Cross-links, die an niedrig-molekulare Peptid-Fragmente gebunden sind (103) möglich. Für den Immunoassay werden Kreuzreaktionen mit Molekülen bis zu einer Molekülgröße von 1000 D vermutet. Sie wurden unabhängig von der Ausprägung des Knochenstoffwechsels beobachtet (104).

Jedoch zeichneten sich weder im Serum, noch im Dialysat oder Urin derart überdurchschnittliche Meßwerte ab, die sich nur durch einen zusätzlichen Nachweis niedrigmolekularer Verbindungen oder der Mitbestimmung höher-molekularer Strukturen erklären ließen. Geringfügige Kreuzreaktionen schränken den diagnostischen Wert der Pyridinium-Cross-links auch deshalb nicht ein, weil sie von Resorptionssteigerungen am Knochen, wie sie bei Dialysepatienten durchaus vorkommen, überlagert werden. Deshalb wurde vermutlich auch bei Erkrankungen, wie z. B. Morbus Paget oder Osteomalazie, der Anteil mit einem konstanten Wert von 43 % bestimmt (81). Außerdem sind für den Assay bisher nur minimale Reaktionen mit glycolisiertem oder peptid-gebundenen Pyridinolin mit einem Molekulargewicht < 1000 D in anderen Untersuchungen beschrieben (98, 99).

5.2.2 Gewebespezifität

Die Cross-link-Bestimmungen und die Einzelbefunde der Patienten weisen weder auf extraossäre Lokalisationen (158) als Ursprung der Pyridinium-Derivate, noch auf eine Resorptions-unabhängige Knochenkollagendegradation (155) hin. Damit sind Änderungen im Verhältnis von Pyd zu Dpd aufgrund ihrer in der Einleitung beschriebenen unterschiedlichen Herkunft für diese Untersuchung ausgeschlossen.

5.3 Zirkadianer Rhythmus

Die Ausscheidung der Pyridinium-Crosslinks über 24 Stunden in die Dialysate A - E einer BC bei CAPD-Patienten zeigte eine diurnale Variation mit einem signifikanten Effekt über die Zeit. Es gab ein Maximum zwischen sechs und sieben Uhr in den frühen Morgenstunden und einen kontinuierlichen Abfall mit einem Minimum zwischen 17 und 19 Uhr am frühen

Abend. Daraufhin stieg die Ausscheidung wieder an, mit einem erneuten Gipfel am nächsten Morgen.

Damit wurde erstmalig ein existenter zirkadianer Rhythmus für die Ausscheidung von freiem Pyd und Dpd in die Dialysatflüssigkeit nachgewiesen.

Ein groß-amplitudiges zirkadianes Ausscheidungsmuster der Cross-links wurde bereits mehrfach, jedoch nur im Urin, beschrieben (22, 131, 146, 147, 150, 152, 206, 207). Das zeitliche Ausscheidungsmuster in den Dialysaten der vorliegenden Untersuchung deckt sich dabei insbesondere mit einer Untersuchung von Schlemmer et al. (145) die ebenfalls ein Maximum zwischen fünf bis acht Uhr und ein Minimum zwischen 17 und 20 Uhr beobachten konnten.

5.3.1 Ursachen

Vor der Ausscheidung der Cross-links in das Dialysat steht der Vorgang der Knochenresorption und der Knochenkollagen Degradation sowie die Freisetzung der Kollagenbrückenverbindungen in das Serum. Diese Prozesse sind nicht autonom, sondern durch einen diurnalen Rhythmus determiniert. Trotz intensiver Ursachenforschung sind die genauen Zusammenhänge von Entstehung und Auftreten jedoch noch weitgehend unbekannt. Man geht davon aus, daß der zirkadiane Rhythmus durch zwei Komponenten und ihre Aspekte ursächlich bestimmt wird. Es handelt sich um eine exogene und um eine endogene Komponente.

Die exogene Komponente sind zyklische Veränderungen in der äußeren Umgebung. Sie modifizieren die endogene Komponente über einen amplifizierenden Trigger-Mechanismus. Die endogene Komponente ist durch einen diurnalen Rhythmus der Knochenstoffwechselfpezifischen Hormone und durch weitere interne Mechanismen mit einer rhythmisch-intrinsischen Aktivität, sowie durch ihr gemeinsames kontrolliertes Zusammenspiel charakterisiert (146, 152, 207).

PTH, z. B., zeigt einen zirkadianen Rhythmus im Serum (208), mit einem Maximum in den frühen Morgenstunden und einem Minimum am Nachmittag. Die Aufrechterhaltung der Calcium-Homöostase erfordert ebenfalls eine erhöhte Knochenresorption und eine renale Calciumretention, zeitbezogen auf die Nacht (22).

Die Annahme, der zirkadiane Rhythmus der Cross-links sei vor allem eine direkte Antwort auf diese Stimulation, ist jedoch nicht zulässig. Der zirkadiane Rhythmus der Cross-links im Dialysat war unabhängig von erhöhten PTH-Konzentrationen, dem Grad der Niereninsuffizienz und einer antiresorptiven Therapie mit Calcium und Vitamin-D-Derivaten eindeutig nachweisbar und ließ sich nicht supprimieren. Veränderungen in der analytischen Methodik sowie Variationen in den Cross-link-Werten und ihrer Clearance führten ebenfalls zu keiner Einschränkung oder Elimination.

Dieses Ergebnis steht in keinem Gegensatz zu anderen Studien. Obwohl jeder Einzelstudie ein unterschiedliches Konzept zugrundelag, ist das zirkadiane Ausscheidungsmuster als unabhängig von den folgenden Einzeldeterminanten beschrieben worden: Alter (22, 131), Geschlecht (152), Wachstum (22), Kreatinin (22), Ausmaß eines physiologischen wie pathologischen Knochenturnovers (22, 131, 146) und menopausaler Status (131).

Damit werden der zirkadiane Rhythmus sowie die knochenresorptiven Prozesse nicht nur durch die bereits bekannten Knochenstoffwechsel-aktiven Parameter beeinflusst. Auch andere noch überwiegend unbekannt, systemische oder lokale Faktoren müssen diese Vorgänge definieren und modulieren. Zu dieser Schlussfolgerung kommen auch andere Studien (207, 209, 210). Dort wurden ebenfalls andere Einflußgrößen, als z. B. der zirkadiane Rhythmus von PTH, als für die Determination des Knochenstoffwechsels verantwortlich diskutiert. Ein mögliche Erklärung bietet die Änderung der Kollagendegradationsrate (150), die ein Aspekt der endogenen Eigendetermination in der Kollagensubstanz darstellen könnte.

Eine Veränderung der renal-tubulären Funktionen als Ursache des zirkadianen Rhythmus (150) ist durch den Nachweis im Dialysat und bei gleichzeitig bestehender Niereninsuffizienz ausgeschlossen. Die Ausscheidung der Cross-links und die Manifestation des zirkadianen Rhythmus im Dialysat erfolgte unabhängig von der renalen Degradationsfähigkeit sowie dem Ausmaß der Niereninsuffizienz, und damit auch vom Grad der Nierenschädigung und renal-tubulärer Funktionen. Es existiert zudem kein Hinweis auf die Übernahme nierenadäquater Funktionen durch das Peritoneum.

Der Nachweis wurde trotz der individuell-spezifischen Veränderungen von Stoffwechselfunktionen im Knochen, am Peritoneum und in der Niere erbracht. Damit muß eine übergeordnete Struktur innerhalb der knochenresorptiven Prozesse existieren. Das dem zugrundeliegende Muster reagierte zwar sensibel auf Feinmodulationen. Eine vollständige Suppression war jedoch nicht möglich.

5.3.2 Einflüsse der anti-resorptiven Therapie

Die Fortführung der anti-resorptiven Medikation bei diesem Untersuchungskollektiv über die gesamte Studiendauer schließt eine Einschränkung in der Darstellung des zirkadianen Rhythmus nicht vollständig aus. Blumsohn et al. (207) beschreiben eine deutliche Reduktion der durchschnittlichen Knochenresorption und eine Abschwächung des zirkadianen Rhythmus nach abendlicher Calciumsubstitution. Das erklärt in der vorliegenden Untersuchung die Beobachtung, daß sich ein Zeiteffekt erst in einem Vergleich der Einzeldialysate B bis E zu Dialysat A manifestiert. Ein Zeiteffekt im direkten Vergleich benachbarter Dialysate ist damit ohne Therapieeffekt und bei kürzeren Erhebungszeiträumen durchaus denkbar.

Der therapeutische Eingriff durch die kontinuierliche Zufuhr von Dialysat-Calcium konnte das Auftreten eines chronobiologischen Musters der Cross-links in der Dialysatflüssigkeit nicht verhindern. Damit ist fraglich, ob die Gabe therapeutisch anti-resorptiver Calcium-Dosen, die den latenten Calcium-Mangelzustand von Peritonealdialysepatienten durch Deckung des Calcium-Bedarfs ausgleichen sollen, überhaupt eine Resorption verhindert. Sie hat die Ausgestaltung des Resorptionsrhythmus auf jeden Fall weder zeitlich noch im Profil unterdrückt. Da jedoch die PTH-Werte und die Knochendichten in dieser Untersuchung auf den positiven Effekt von Calcium hindeuten, sollte die therapeutische Stärke von Calciumhaltigen Dialysatlösungen weiter genutzt werden.

5.3.3 Empfehlung für die Therapie

Die Cross-links weisen in ihrem charakteristischen Ausscheidungsmuster ein konsistentes diurnales Zeitprofil mit einem Maximum am Morgen auf. Die Knochenresorption muß über Nacht deutlich gesteigert sein. Daher ist die nächtliche Durchführung anti-resorptiver Therapieschemata bei Peritonealdialysepatienten zu diskutieren. Wenn sich die Formulierung von Dosis und Zeitpunkt anti-resorptiver Therapieschemata an einer Einnahme in den Abendstunden orientiert, ist ein anti-resorptiver Effekt gewährleistet und wird optimiert. Eine Calcium-Substitution am Morgen führt deshalb vermutlich auch zu keiner Änderung im zirkadianen Ausscheidungsmuster (207) und bleibt deshalb ohne positive Auswirkung.

5.3.4 Zirkadianer Rhythmus im Serum

Das nachgewiesene chronobiologische Verhaltensmuster der Cross-links in den Systemen Dialysat und Urin macht seine Existenz für das System Serum mehr als wahrscheinlich. Dieser vermutete Zusammenhang wird durch die signifikanten Korrelationen zwischen den Cross-links im Serum mit den Cross-links in Dialysat und Urin bestätigt.

James et al. (154) wiesen bereits auf eine longitudinale und diurnale Variation im Serum hin, ohne diese jedoch näher zu präzisieren. Der Nachweis eines zirkadianen Rhythmus im Serum gesunder und erkrankter Individuen bietet sich deshalb unbedingt als Gegenstand zukünftiger Untersuchungen an.

5.3.5 Empfehlung für die Probengewinnung

Der tatsächliche Nachweis in der Dialysatflüssigkeit und im Urin und unter der Annahme einer ebenfalls zirkadian gesteuerten Ausscheidung in das Serum macht den Zeitpunkt der Probengewinnung äußerst relevant. Die Entnahme der Proben sollte in den frühen Morgenstunden erfolgen, denn zu diesem Zeitpunkt gibt es ein deutlich erkennbares Maximum. Diese konstante zeitpunktorientierte Probengewinnung gewährleistet gleichbleibende Untersuchungsbedingungen. Sie sichert neben anderen laborklinisch-chemischen Aspekten die Qualität von Meßwerten und ihre Beurteilung. Sie ermöglicht die Formulierung diagnostischer Referenzbereiche und damit gleichzeitig die Aufdeckung, auch subtiler Veränderungen im Knochenmetabolismus. Frühzeitig werden Abweichungen in den Knochenresorptionsraten als ein Symptom erkannt oder weisen auf einen pathologischen Mechanismus hin. Eine standardisierte Cross-link-Bestimmung erleichtert die Vergleichbarkeit von Individuen und Kollektiven, ihrer Diagnosen und ihrer Therapie.

Die Untersuchungen mit dem System Urin haben mehrheitlich zu denselben Ergebnissen geführt (14, 36, 42, 68, 121, 149). Es gibt nur eine geringe Anzahl von Studien (19, 148), die dazu anderslautende Empfehlungen anführen.

5.4 Cross-links in Serum, Dialysat und Urin

5.4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

5.4.1.1 Clearance von Cross-links und Kreatinin im Dialysat

Die Clearanceraten der Cross-links in Dialysat und Urin waren niedrig und variierten zwischen $9,37 \cdot 10^{-7}$ und $2,21 \cdot 10^{-5}$ ml/min. Die Clearance der Cross-links und die Clearance von Kreatinin in das Dialysat korrelierten signifikant miteinander.

5.4.1.2 Serum

Die Konzentration der Cross-links war 55 nmol/l und die Cross-link-Menge 60 nmol/mmol Kreatinin im Serum. Die Serumkonzentration war bei einem durchschnittlichen Gesamtserumwert für die Cross-links von 3 - 5 nmol/l für eine gesunde Normalpopulation (49, 70, 110, 153, 154, 155, 157) durchschnittlich fünfzehnfach erhöht. Die Cross-link-Menge entsprach der Cross-link-Konzentration annähernd im Betrag.

Diese „Steigerung“ in Konzentration und Menge an Cross-links im Serum objektiviert sich, sobald man eine um das Zehnfache gesteigerte Kreatininausscheidung in die Berechnung miteinbezieht. Das wird an einem Rechenbeispiel deutlich:

Für ein Normalkollektiv beträgt die durchschnittliche Cross-link-Konzentration 3 - 5 nmol/l und die durchschnittliche Kreatininkonzentration 1 mg/dl im Serum. Nach Umrechnung ergibt sich eine Kreatinin-assoziierte Cross-link-Menge von 30 - 50 nmol/mmol im Serum. In der vorliegenden Untersuchung betrug die mittlere Cross-link-Konzentration 55 nmol/l und die Kreatininkonzentration durchschnittlich 10 mg/dl im Serum. Nach Umrechnung beträgt die Cross-link-Menge ebenfalls 55 nmol/mmol Kreatinin im Serum.

Der Bezug auf Kreatinin korrigiert somit die augenscheinlich erhöhten Werte im Serum nach unten. Die gleichzeitige Bestimmung von Konzentration und Menge vermittelt somit das realistische Ausmaß von Retention und Resorption im Serum. Sie weist für die vorliegende Untersuchung auf eine geringfügig gesteigerte Knochenresorption hin.

5.4.1.3 Dialysat und Urin

Die Bestimmung der Cross-links in Dialysat und Urin über 24 Stunden ergab 288 nmol/24 h. Wenn man Werte für CAPD-Patienten, die mittels HPLC gemessen wurden, von 216 nmol/24 h für Gesamt-Pyd und von 88 nmol/24 h für Gesamt-Dpd (156) zugrunde legt, waren die Werte in der vorliegenden Untersuchung mäßig erhöht.

Im Urin betrug die Cross-link-Menge im Mittel 32 nmol/mmol Kreatinin. Nakamura et al. (114) bestimmten Ausscheidungswerte von 8 -28 nmol/mmol Kreatinin für freie Cross-links in den Urin mit einem Immunoassay bei Normalpersonen. Im Vergleich dazu waren die Cross-links in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls leicht erhöht.

Die Kreatinin-korrigierte Menge der Cross-links, gemittelt aus den Dialysaten jeweils einer BC, betrug im Mittel 20 nmol/mmol Kreatinin. Eine direkte Beurteilung dieses kreatininkorrigierten Querschnitts ist aufgrund fehlender Referenzangaben aus anderen Untersuchungen nicht möglich.

Die Variablen der Cross-links im Serum, Dialysat und Urin korrelierten, bis auf zwei Ausnahmen, erwartungsgemäß signifikant miteinander.

5.5 Retention oder Resorption?

Eine Erhöhung von Cross-links im Serum ist bereits für völlig unterschiedliche metabolische Knochenerkrankungen (110, 153, 154, 211) und für Hämodialysepatienten (155) beschrieben. Normalerweise ist davon auszugehen, daß die Serumspiegel für niedrigmolekulare Substanzen invers zur Restdiurese korrelieren (212). Eine deutliche Reduktion bzw. Veränderungen der GFR verändern damit Bestimmungen von Knochenstoffwechselprodukten im Urin und im Serum. Die Cross-links im Serum stellen somit das Ergebnis eines gesteigerten Knochenstoffwechsels, einer glomerulär-tubulären Dysfunktion, einer Serumretention bei verminderter Clearance in den Urin oder in die Dialysatflüssigkeit oder aus der Summe aller Vorgänge dar. Da die Cross-links jedoch ausschließlich als ein Maß für die Knochendegradation funktionieren sollen, ist folgende Überlegung zu diskutieren:

Inwieweit stellen die Cross-links im Serum das Ergebnis von Resorption oder Retention dar?

Nierenfunktionsänderungen modifizieren die Höhe der Ausscheidung von Stoffwechselprodukten. Zusätzlich resultieren variierende Serumspiegel auch aus der Dauer der Dialyse. Die Aufsättigung von Dialysatlösung mit molekularen Verbindungen kann in einen Rückstau in das Serum münden. Die Pyridinium-Verbindungen stellen darunter wahrscheinlich keine Ausnahme dar (110, 211).

Die signifikante Korrelation zwischen der Clearance der Cross-links und der von Kreatinin in die Dialysate liefert in diesem Zusammenhang einen entscheidenden Hinweis. Sie weist auf eine Gleichbehandlung beider Substanzen in Bezug auf die Filtrationsfunktion der Peritonealmembran hin. Im Urin wurde dagegen bisher kein Bezug zwischen der Cross-link-Ausscheidung und der Kreatinin-Clearance-Rate aufgezeigt (61, 115, 120, 148).

Der proportionale Anstieg der Cross-links und von Kreatinin um denselben Faktor Zehn spricht ebenfalls, trotz unterschiedlichen Transportmechanismen an der Peritonealmembran, für diese Gleichbehandlung im Hinblick auf die Ausscheidung. Niedrig-molekulare Stoffe, wie Kreatinin mit 113 D, werden dabei über Diffusion, und Mittelmoleküle größer 500 D, wie die Cross-links, über den konvektiven Transport aus dem Blut in die Dialysatflüssigkeit entfernt (213).

Die Höhe der Cross-links in der Dialysatflüssigkeit bestimmt sich zudem auch aus der Aufnahmekapazität und aus der Verweildauer der instillierten Flüssigkeit. Ein konsekutiver Rückstau der Pyridinium-Derivate ins Serum ist dabei nicht vollständig auszuschließen. Die Werte resultieren zusätzlich aus dem Zeitpunkt der Probenentnahme und dem Einschränkungsgang der Restdiurese.

Die Erhöhung der Cross-links in allen drei Systemen, und zwar in Kombination mit der PTH und der Knochendichte, weist jedoch deutlich auf eine noch andere Ursache als diese hin. Sie basiert auf einer tatsächlichen Steigerung der knochenresorptiven Prozesse.

Aus der Absenkung der renalen Filtration bzw. einer Aufnahmekapazitätsüberlastung der Dialyseflüssigkeit bei diesem Patientenkollektiv resultiert zwar frühzeitig eine Änderung von Cross-links und von Kreatinin im Serum. Die gleichzeitige Bestimmung von Konzentration und Menge im Serum klärt jedoch über das realistische Ausmaß von Retention und Resorption auf. Erst die Menge der Cross-links im Serum im Verhältnis zur Konzentration der Cross-links im Serum, nach und vor Kreatininkorrektur respektive, liefert den entscheidenden Hinweis auf eine gesteigerte Retention oder auf eine erhöhte Resorption.

Dieser Größenbezug relativiert das Ausmaß von Retention und Resorption, vorausgesetzt beide Parameter, Cross-links und Kreatinin, unterliegen einem gleichen Eliminationsweg (156). Den Nachweis dazu hat die vorliegende Untersuchung erbracht. Obwohl sich Bestimmungen im Serum eigentlich vor allem durch den Verzicht auf eine Korrekturgröße auszeichnen (110), wird bei Peritonealdialysepatienten erst dadurch eine reelle Beurteilung ermöglicht.

Die Cross-links im Serum sind damit ein brauchbares Maß für die Knochenresorption von Peritonealdialysepatienten.

5.6 Verteilung und Clearance der Cross-links

Der direkte Nachweis von Cross-links in Serum, Dialysat und Urin weist auf die Entfernung der Pyridinium-Verbindungen aus dem Serum in die Dialysatflüssigkeit oder den Urin hin. Er beruht auf der Eigenschaft der Filtrationsfunktion der Dialysemembran. Dieser Rückschluß wurde dagegen in anderen Studien erst indirekt aus dem postdialysalen Rückgang der Cross-links im Serum gezogen (49, 157).

Die Kombination aus erhöhten Cross-links in Serum, Dialysat und Urin mit einem erhöhten PTH und erniedrigten Knochendichtewerten spricht gegen eine lokalisierte Autoproduktion von Cross-links an der Peritonealmembran (214, 215). Sie weisen in dieser Konstellation auf die Knochenresorption als Ursache hin. Ansonsten zeigten sich nur die Cross-links in der Dialysatflüssigkeit durch deutlich höhere Werte repräsentiert.

Ein Sammelzeitraum von Dialysatflüssigkeit über 24 Stunden schließt eine zufällige Bestimmung während punktueller Resorptionssteigerungen in der Nacht aus. Jedoch repräsentiert eine Probe, die über einen definierten Zeitraum und nicht zu einem festen Zeitpunkt gewonnen wurde, den gesamten Stoffwechsellvorgang der Knochendegradation. Prägnante Ereignisse werden dadurch verwischt und stellen sich nur noch undeutlich dar. Wenn man zusätzlich von einem zirkadianen Rhythmus in der Ausscheidung ausgeht, sind keine differenzierten Aussagen über die Höhe der Resorption möglich. Darüberhinaus besteht für den Untersucher der Nachteil, daß er, um die Vollständigkeit der Probengewinnung zu gewährleisten, uneingeschränkt auf die Compliance des Patienten angewiesen ist.

Die Meßwerte der Cross-links in Dialysat und Urin verhielten sich komplementär zu den Meßwerten der Cross-links im Serum. Gleichzeitig korrelierten die Cross-links in den

einzelnen Systemen untereinander. Beide Beobachtungen sind Ausdruck der Verknüpfungen zwischen den einzelnen Stoffwechselschritten der Cross-links, von ihrer Freisetzung bis zu ihrer endgültigen Ausscheidung. Die Homogenität in der Darstellung von Variablen und Korrelationen unterstreicht die Aussagefähigkeit dieser Parameter. Eine Differenzierung von Knochenstoffwechselfvorgängen ist somit möglich.

Die Messung im Serum birgt jedoch ein höheres Potential an Integrität als die Messung in Dialysat und/oder Urin. Marker im Serum zeigen bekanntlich geringere Variationen als Marker im Urin (140, 216) und damit auch als Marker im Dialysat. Daraus resultiert gleichermaßen eine stärkere Aussage- und Korrelationsfähigkeit der Cross-links im Serum. Das hat die vorliegende Untersuchung deutlich gezeigt. Sie widerlegt auch die Annahme, daß die freien Cross-links bei therapierten Kollektiven nur über eine mangelhafte diskriminatorische Fähigkeit verfügen (140, 181).

Es wäre jedoch unzulässig, den Cross-links einen absolute diagnostische Aussage zuzusprechen, ohne andere Parameter in die Betrachtung miteinzubeziehen. Eine ausschließliche und umfassende Bewertung und Interpretation durch die Cross-links ist erst dann möglich, wenn die Degradation von Knochenkollagen vollständig aufgeklärt ist.

Aus der Aufrechterhaltung einer Therapie resultiert sicherlich ein abgeschwächter bzw. verspäteter Symptomenkomplex oder zusätzliche Einflußgrößen unbekannter Ordnung. Der Therapieeffekt führte demnach zu einer Schwäche in der Darstellung der Meßwerte und Korrelationen in der vorliegenden Untersuchung. Die Präsentation wäre ohne diesen Faktor vermutlich eindrücklicher. Die Erhebung der Variablen und der Korrelationen fand damit zwar unter real-klinischen, aber auch unter erschwerten Bedingungen statt.

Für die erniedrigten und variierenden Clearance-Raten der Cross-links ist zusätzlich ein Verdünnungseffekt der Dialysatflüssigkeit zu vermuten. Das vorrangig in dieser Untersuchung angewendete Dialyseverfahren CAPD nimmt darauf wahrscheinlich ebenfalls einen Einfluß, der nicht übersehen werden darf. Denn die Tidal-PD und die CCPD zeichneten sich bisher gegenüber der CAPD durch eine höhere Clearance kleinmolekularer Verbindungen aus (13).

Für verschiedene Knochenstoffwechselerkrankungen sind zwar signifikante Gruppenunterschiede beschrieben worden. Es wurden aber auch häufig Überschneidungen mit dem Normwertebereich beobachtet. Dieses Phänomen ist durch die ausgeprägte Dynamik des Knochenstoffwechsels und die zwangsläufige Heterogenität der Störungen bedingt (44).

In diesem Zusammenhang macht auch die vorliegende Untersuchung sehr deutlich, daß eine Beurteilung von Knochenstoffwechselfvorgängen nicht nur anhand eines einzigen Parameters vorgenommen werden kann. Dazu ist eine Kombination aus unterschiedlichen Parametern notwendig.

5.7 Degradation der Cross-links

Der hepatische, prärenale und renale Metabolismus und das „processing“ der Cross-links sind immer noch weitgehend unbekannt (62, 157). Rucklidge et al. (217) haben eine

Reabsorption von Typ-I-Kollagen-Fragmenten in dem proximal tubulären Bürstensaum in der Niere beschrieben, die anschließend von lysosomalen Enzymen denaturiert werden. War die Nierenfunktion verändert, erhöhte sich der Anteil peptidgebundener Cross-links. Dagegen sank der Anteil freier Cross-links im Urin (102,217).

Die Vermutungen einer renal-assoziierten Degradation wird durch ein Kollektiv aus niereninsuffizienten Patienten mit überwiegend nicht funktionsfähigem Nierengewebe, wie es in dieser Untersuchung der Fall war, widerlegt. Außerdem impliziert der Nachweis freier Cross-links im Dialysat gleichzeitig, daß die Zellen des Peritoneums über dieselben physiologischen Mechanismen wie die Tubuluszellen der Niere verfügen müßten. Das ist sicherlich nicht der Fall.

Daraus kann folgender Schluß gezogen werden: Die Entstehung der freien Fraktion, unter Einwirkung unbekannter Enzyme und von bisher unbekannter Lokalisation, resultiert da-mit keineswegs ausschließlich auf einer sich ändernden Peptiddegradation im Nieren-gewebe. Sie sind nicht ausschließlich als ein Endprodukt dieser Vorgänge zu betrachten.

Andere Untersuchungen kommen zu einem ähnlichen Ergebnis. Robins et al. (67) haben deshalb eine renale Degradation ausgeschlossen, weil sich die Menge freier Cross-links im Serum und im Urin glichen. Niwa et al. (49) lehnen eine überwiegend lokal-spezifische Entstehung der freien Cross-links in der Niere ab, weil sie ausschließlich peptidgebundene Formen im Serum Gesunder, sowie gleichzeitig freie und peptidgebundene Formen in urämischen Sera nachweisen konnten.

Jedoch sind vielfältige Mechanismen und Kausalzusammenhänge bei der prärenalen Elimination und Metabolisation von Pyd und Dpd in Betracht zu ziehen (158,218). Dazu zählen auch die therapeutischen Schemata (111, 140, 181, 219), die zu unterschiedlichen Ausscheidungsmustern der Pyridinium-Fraktionen führen. Direkt oder indirekt üben anti-resorptive Therapien vermutlich ihren Einfluß auch auf renale oder knochenenzymatische Vorgänge aus.

5.8 Parathormon

Parathormon war mit 22,8 pmol/l um das Dreifache des oberen Normwertes erhöht. Es korrelierte signifikant mit den Cross-links im Serum.

5.8.1 PTH und Serum-Cross-links

Die signifikante Korrelation zwischen PTH und den Pyridinium-Verbindungen beruht auf ihrer gemeinsamen Eigenschaft, ein Maß für die Knochenresorption zu sein. Beide Werte dokumentieren unabhängig voneinander eine Steigerung in diesem Prozess.

Die Korrelation stellt die Verknüpfung von Anfang und Ende im Ablauf des Knochenabbaus her. PTH fungiert dabei als Induktionsparameter und als ein indirektes Maß der Knochenresorption. Die Cross-links sind dagegen ein Bilanzparameter und ein direktes Maß für den Abbau von Knochenkollagen. PTH und die Cross-links charakterisieren beide, im Gegensatz zu den anderen Knochenstoffwechselkenngößen, wie Vitamin-D-Hormon, BAP oder Calcium, denselben Vorgang der Knochenresorption. Sie treffen supplementäre

Aussagen, obwohl sie sich diesem Prozess im Knochenstoffwechsel aus unterschiedlichen Richtungen annähern. Gemeinsam beschreiben sie den knochenresorptiven Prozess nicht statisch, nicht lokalisiert und nicht punktuell, sondern dynamisch und ossär-universal.

PTH und die Serum-Cross-links zeichnen sich vor allem dadurch aus, daß sie weder exogen zugeführt, noch vollständig in ihrer Expression, z. B. durch eine Therapie, unterdrückt werden. Sie unterliegen beide einem zirkadianen Rhythmus. PTH und Cross-links verfügen gemeinsam über den Vorteil, in einer Probe, zu einem Zeitpunkt und in einer Matrix bestimmt zu werden. Die Cross-links sind im Serum noch weitgehend unbeeinflusst von den unbekanntem Vorgängen im Glomerulum, im Tubulussystem oder am Peritoneum. Dagegen unterscheiden sich beide Parameter hinsichtlich der individuellen Darstellung und Ausprägung, denn sie sind von denselben Einflußfaktoren unterschiedlich betroffen.

Die PTH-Konzentration ist nicht nur ein Resultat endogener Sekretionsvorgänge. Sie ist auch wesentlich durch den eigenen Metabolismus und durch exogene Einflüsse geprägt. Die Therapie mit Vitamin-D-Derivaten und Calcium senkt den Spiegel von PTH (205). Das endogene Element in der Kontrolle der PTH-Sekretion wird dabei über eine pharmakologische Manipulation mit Calcium (207), z. B. durch Calcium-haltige Dialysatflüssigkeit, unterdrückt. Deshalb wurde eine Umkehrung zu erniedrigten PTH-Werten am Morgen beobachtet. Die Substitution mit Vitamin-D-Metaboliten führt ebenfalls zu einem signifikanten Abfall von PTH (180, 182). Diese temporäre PTH-Suppression führt zu einer ausbleibenden Stimulation der Osteoklastenaktivität, wobei sogar ein direkter Effekt nach Vitamin-D-Exposition auf PTH vermutet wird (180).

Zusätzlich wird PTH kontinuierlich aus dem Serum in das Dialysat entfernt (25, 182, 220). Die Peritonealdialyse führt eher, im Gegensatz zur Hämodialyse, zu niedrigeren PTH-Spiegeln im Serum. Sie stellt damit sogar eine Prophylaxe vor exzessiv knochenmetabolischen Abbauvorgängen dar. Eine Aussage über die Qualität ist aber aufgrund der Halbwertszeit von PTH im Blut und dem quantitativ unbekanntem Verhältnis zur endogenen Clearance von PTH nicht möglich. Jedoch stützen die insgesamt moderaten Werte von Cross-links, PTH und Knochendichten in dieser Untersuchung diese Überlegung.

Daher sind nicht nur der PTH-Wert, sondern auch der Korrelationskoeffizient durch einen eher moderaten Wert repräsentiert. Die Tatsache, daß sich trotzdem noch eine Korrelation herstellen läßt, bestätigt erneut die bestehende Verknüpfung beider Knochenstoffwechselfparameter.

Die Korrelation von PTH besteht sowohl zwischen der Konzentration als auch der Menge der Serum-Cross-links. Sie besteht vor und nach Umrechnung der Cross-links auf Kreatinin. Bisher wurde ein Einfluß von Kreatinin auf den Nachweis einer möglichen Korrelation, das Bestehen oder das Nichtbestehen eines Zusammenhangs in Abhängigkeit von einer Kreatininkorrektur vermutet (156). Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung widerlegt damit obige Vermutung.

5.8.2 PTH und Cross-links im Dialysat und Urin

Die mangelnde Korrelationsfähigkeit von PTH und den Cross-links in Dialysat und Urin beweist nicht zwingend, daß ein Bezug nicht existiert. Denn die Cross-links im Serum und die Cross-links im Dialysat und Urin korrelieren sehr wohl untereinander. Dieses ist

wahrscheinlich vielmehr durch die Kombination einer unterschiedlichen Matrix, den Zeitpunkt der Probengewinnung und die Entfernung der Cross-links in das Dialysat bzw. den Urin bedingt. Die Bestimmung von PTH ist Zeitpunkt-, die Messung der Cross-links im Dialysat und Urin dagegen Zeitdauer-bezogen. Der Nachweis einer bestehenden Verknüpfung ist, wie in dieser Untersuchung, dadurch erschwert oder nicht möglich. Die Bestimmung von Cross-links in Dialysat und Urin ist weniger aussagefähig als die im Serum.

5.8.3 Empfehlung

Um Stoffwechselforgänge am Knochen von Peritonealdialysepatienten sicher zu erfassen, sollten die Cross-links und das PTH im Serum gemeinsam bestimmt werden. Ihre diagnostische Einsatzfähigkeit hat sich in dieser Untersuchung gezeigt.

Die Meßwerte der Cross-links im Serum und die Knochendichten in der vorliegenden Untersuchung stehen in keinem Widerspruch zu der Empfehlung, daß ein Richtwert vom Ein- bis Dreifachen des oberen Normwertes für PTH (12, 33, 166) einen moderaten Einfluß auf den Knochenstoffwechsel garantiert. Im Hinblick auf die tendentiell erniedrigten Knochendichten in Verbindung mit einer vermutlich höher anzusetzenden PTH-Konzentration im Serum stellt dieses Konzept der Peritonealdialysetherapie mit obiger Empfehlung jedoch zur Diskussion.

5.9 Knochendichte

Die Knochendichte war absolut, als T-Score bzw. Z-Score in Prozent und als Standardabweichung erniedrigt. Der Femurhalsknochen wies eine eindeutig niedrigere Knochendichte als der Lendenwirbelsäulenknochen auf. Die Knochendichteparameter des Femurhalsknochens, absolut, als T-Score, in Prozent und Standardabweichung, korrelierten signifikant reziprok mit der absoluten Konzentration der Cross-links im Serum.

5.9.1 Knochendichte und Cross-links im Serum

Diese reziproke Korrelation zwischen Knochendichte am Femur mit der Cross-link-Menge im Serum stellt den Zusammenhang zwischen den bereits stattgehabten ossären Resorptionsvorgängen in der Vergangenheit, aktuellen Knochenstoffwechselforgängen und aktueller Knochenmasse her. Beide Parameter weisen auf einen tendentiell erhöhten Knochenabbau hin.

Die fehlenden Korrelationen der übrigen Knochendichtewerte und der absoluten Cross-link-Konzentration im Serum stellen den Aussagewert obiger Korrelation jedoch in Frage. Der Verdacht, die Korrelation sei ein Zufallsergebnis, liegt nahe. Die Stringenz innerhalb dieser Korrelation spricht jedoch gegen diese Vermutung. Die Korrelation wurde durchgängig zwischen den Knochendichteparametern des Femurhalsknochens und der absoluten Cross-link-Konzentration im Serum aufgezeigt.

5.9.2 Knochendichte von Femurhals, absolut, in Prozent und Standardabweichung als T-Score

Der T-Score, auch als „peak bone mass“ bezeichnet (161), stellt die Knochendichten in bezug auf ein Kollektiv 20 - 40 jähriger gesunder Personen dar. Dahingegen setzt der Z-Score die Knochendichten in Beziehung zu einem Kollektiv gleichaltriger Gesunder. Der T-Score beschreibt demnach den Verlust von Knochenmasse über einen ausgedehnten Zeitraum, von einem Beginn im jungen Alter bis zu dem Zeitpunkt der densitometrischen Messung. Er dokumentiert die gesamte zeitliche Entwicklung im Skelettgewebe eines Patienten. Der T-Score beschreibt damit die Entwicklung im Knochen wesentlich deutlicher als der Z-Score, was sich durch einen niedrigeren Knochendichtewert manifestiert.

Für eine Korrelation zwischen erniedrigter Knochendichte und erhöhten Cross-links ist eine Abweichung des Scores von der Norm erforderlich. Da die Knochendichten der Peritonealdialysepatienten nur mäßig erniedrigt waren, genügt diesem Umstand somit eher der T-Score als der Z-Score. Eine weitere Abnahme der Knochendichten macht auch eine Korrelation zwischen Cross-links und Z-Score in der Zukunft möglich.

Da die Sichtweise auf den Knochenstoffwechsel aus völlig unterschiedlichen Perspektiven erfolgt, ist dieser Nachweis für die Bewertung ossär-metabolischer Prozesse äußerst relevant. Die Knochendichte ist als Indikator der Residualknochenmasse eine lokal-spezifische und relativ statische Größe. Sie charakterisiert die Vorgänge retrograd. Die Cross-links sind biochemische, dynamische Parameter, die die „Fließaktivitäten“ des gesamten „bone remodelling cycle“ lokal-unspezifisch wiedergeben. Während die Knochendichte auch eine Kombination ursächlich unterschiedlicher Knochenabbauvorgänge spiegeln kann, geben die Pyridinium-Derivate den gegenwärtigen, hauptsächlich verantwortlichen Erkrankungsprozess wieder. Damit besteht ein deutlicher Unterschied zwischen diesen beiden Parametern, der durch die Korrelation überwunden wird.

Die Kontinuität und Stetigkeit innerhalb ossär-resorptiver Prozesse macht demnach eine gleichzeitige Bewertung abgeschlossener und zukünftiger Entwicklungen durchaus möglich. Zukünftige, erst verspätet densitometrisch erfaßbare Knochendichteänderungen können frühzeitig durch die Cross-links transparent gemacht werden.

Peritonealdialyse verstärkt bei Osteoblasten die Fähigkeit zur Mineralisierung und mindert die Osteoidfläche (221). Eine zunehmende Mineralisation ist jedoch synchron von einer verlangsamten Cross-link-Bildung in vitro begleitet (53), eventuell infolge einer Calcium-abhängigen Hemmung der Lysyloxidase. Unter diesem Aspekt der verstärkten Knochenmineralisierung während einer kontinuierlich anti-resorptiven Dialysetherapie resultiert möglicherweise ein verschnellter Abbau von Cross-links, ohne einen gleichzeitigen kompensatorischen Neuaufbau von Pyridinium-Verbindungen. Daraus resultiert die Tendenz zu fortschreitend sinkenden Knochendichten, wie sie in dieser Untersuchung gemessen wurden.

Die reziproke Korrelation in der vorliegenden Untersuchung weist darauf hin, daß ein aktuell erhöhter Umsatz mit einem Cross-link-Anstieg zu einem vorschnellen Verlust an Skelettmasse führt, der sich später als Knochendichteverlust manifestiert. Ein Umkehrschluß bei einer verminderten Cross-link-Ausscheidung ist zu vermuten. Ein Richtungswechsel innerhalb dieser knochenmetabolischen Vorgänge ist durchaus gegeben und erschwert eine diagnostische Beurteilung. Die Seltenheit und die Langwierigkeit dieser

Prozesse in Kombination mit einer Wiederholung diagnostischer Maßnahmen kompensieren jedoch diese Schwierigkeit und machen sie kalkulierbar.

5.9.3 Kortikaler und trabekulärer Knochen

In dieser Untersuchung wird kortikaler Knochen durch den Femurhalsknochen und trabekulärer Knochen durch den Lendenwirbelsäulenknochen repräsentiert. Die Korrelation der Serum-Cross-links mit dem Femurhals und nicht mit der Lendenwirbelsäule weist darauf hin, daß kortikaler bzw. trabekulärer Knochen von den Resorptionsprozessen unterschiedlich und spezifisch betroffen ist. Daher besteht keine Korrelation zwischen Cross-links im Serum und dem Lendenwirbelsäulenknochen.

Der Reifungsprozess von Cross-link-Verbindungen setzt einen ausreichenden Zeitraum und eine verminderte Hydratation im Knochen voraus (55, 222). Trabekulärer Knochen, der vor allem durch einen unreifen Zustand und durch kontinuierliche Umbauvorgänge charakterisiert ist (55), erfüllt damit diese Bedingungen nicht. Er besitzt einen niedrigeren Anteil an Pyridinium-Cross-links als kortikaler Knochen (55, 59). Er fungiert deshalb weder in dem Maße als Cross-link-Produzent noch als Cross-link-Reservoir wie kortikaler Knochen.

Eine Verminderung der Knochendichte um den gleichen Betrag führt damit je nach Knochentyp, kortikal oder trabekulär, zu unterschiedlichen Cross-link-Mengen. Da trabekulärer Knochen, bedingt durch seine Qualität, jedoch nur eingeschränkt von einem Verlust an Knochendichte und an Cross-links betroffen ist, ist sein proportionaler Anteil bei elementaren Änderungen in Knochenstoffwechselprozessen als eher gering einzustufen. Veränderungen manifestieren sich somit hauptsächlich an kortikalem Knochen.

Es ist bekannt, daß PTH die Anzahl der Resorptionslakunen, jedoch nicht deren Tiefe steigert (223). Kortikaler Knochen bietet diesem Phänomen strukturbedingt eine erhöhte Angriffsfläche. Vermutlich vermag trabekulärer Knochen durch seinen ausgeprägteren Metabolismus (224), einen zahlenmäßigen Defekt schneller und effizienter zu reparieren als einen Tiefendefekt. Deshalb reagiert trabekulärer Knochen auch auf Strukturänderungen dieser Art weniger empfindlich. Das erklärt auch die bisherige Beobachtung, daß an der LWS nur eine Änderungsrate an Knochenmasse von 1 - 2 % pro Jahr gemessen wurde (121).

Es ist daher äußerst problematisch, nicht zwischen kompaktem und spongiösem Knochen zu unterscheiden. Die vorliegende Untersuchung hat diesen Umstand durch die Bestimmung beider Knochentypen an zwei lokal unterschiedlichen ROI berücksichtigt und bestätigt. Das Ergebnis dieser Untersuchung entspricht dabei Beobachtungen in früheren Untersuchungen (162, 163, 169).

5.9.4 Empfehlung

Eine unspezifische allgemeine Beschreibung knochenmetabolischer Vorgänge ist damit unzulässig. Trabekulärer Knochen kompensiert und verschleiert gleichzeitig die Auswirkungen von Störungen im knochenspezifischen Stoffwechsel. Kortikaler Knochen

reagiert dagegen empfindlicher. Diese Eigenschaft prädestiniert ihn in der Entscheidung um die ROI zur Bewertung von Knochenstoffwechselveränderungen.

Darauf basiert auch der Zusammenhang zwischen den Cross-links im Serum und der Knochendichte am kortikalen Femurhalsknochen. Er bestätigt erneut die Serum-Cross-links in ihrer Funktion, ein Maß für die Knochendichteminderung zu sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung weisen auf eine kombinierte Bestimmung der Serum-Cross-links und der Knochendichten hin, um den Knochenabbau von Peritonealdialysepatienten ganzheitlich zu erfassen.

5.10 Vitamin-D-Hormon, Calcidiol und Calcitriol

Der Wert für 25(OH)-Vitamin-D₃ betrug durchschnittlich 15 µg/l und lag im unteren Normbereich. 1, 25(OH)₂-D₃ zeigte mit 16 ng/l einen Wert unterhalb der unteren Normgrenze. Die Vitamin-D-Metaboliten, Calcidiol und Calcitriol, korrelierten nicht mit den Cross-links im Serum, wobei sich dieses Untersuchungsergebnis mit dem Ergebnis von Weets et al. (225) deckt.

Eine mangelhafte Aussagefähigkeit der Meßwerte, bedingt durch fehlerhafte Laboranalysen, ist in dieser Untersuchung ausgeschlossen. Die Bestimmung von Vitamin-D-Hormon bei niereninsuffizienten Patienten wurde bisher als nicht unbedingt stichhaltig beurteilt (178), weil die erhältlichen Assays eine diagnostische Schwäche für Niedrigkonzentrationen bei Niereninsuffizienz und eine mangelnde Routineanwendbarkeit gezeigt haben (175, 178). Die Messung der Vitamin-D-Hormone im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik in Düsseldorf erfüllte jedoch die Anforderungen von einem hohen technischen Standard und der Teilnahme an externen Qualitätskontrollen sowie klinisch-chemischer Qualitätssicherung (178) vollständig. Die Werte sind daher als wahr anzusehen.

Für ein Patientenkollektiv aus Peritonealdialysepatienten sind erniedrigte Serumspiegel von 25(OH)-D₃ und 25(OH)₂-D₃ nicht ungewöhnlich, sondern durchaus logisch und erklärbar. Zwar wurden bisher bei CAPD-Patienten normale Vitamin-D-Serumspiegel gemessen (166, 220). Aber unter einer Nierenersatztherapie zeigten sich ebenfalls, wie auch in der vorliegenden Untersuchung, niedrige 1, 25-(OH)₂-D₃-Spiegel (33).

Die Konzentrationen von Calcitriol und PTH im Plasma sind eng an die Nierenfunktion gebunden (33). Bei einer terminalen Niereninsuffizienz sind die Nieren wahrscheinlich nicht in der Lage, suffizient Calcitriol zu produzieren (26). Gleichzeitig herrscht ein latenter Substratmangel. Es besteht eine pathologische Substratabhängigkeit von 25-Hydroxycholecalciferol bei der Produktion von Calcitriol, da die Aktivität der 1- α -Hydroxylase substratabhängig ist. Calcidiol, gebunden an ein Transportprotein, unterliegt zusätzlich einem PTH-ähnlichen Verlust in die Dialysatflüssigkeit (226).

Die Tatsache, daß die Patienten in dieser Untersuchung keine Anzeichen eines ausgeprägten Knochensubstanzverlustes aufwiesen, beruht vermutlich auf folgenden Überlegungen:

Bei abnehmender glomerulärer Filtrationsrate werden die 1, 25-Dihydroxycholecalciferol-Konzentrationen im Plasma durch ein erhöhtes PTH und seine Wirkung auf die 1- α -Hydroxylase im Normbereich gehalten. Ein Erklärungsansatz bietet auch die Eigenproduktion nicht mehr quantifizierbarer Mengen an Calcitriol, das an den Zielrezeptor bindet und somit einen minimalen Schutz gegen die Entwicklung einer Knochenkrankheit leistet (26). Desweiteren existieren Hinweise auf eine extrarenale Produktion von 1, 25(OH)₂-D₃, sodaß die lokale Vitamin-D-Konzentration im Gewebe nicht notwendigerweise extrazelluläre Vitamin-D-Konzentrationen spiegelt (24). Eine andere Erklärung bieten überdurchschnittlich hohe 25(OH)-D₃-Spiegel, die eine Calcitriol-Synthese simulieren können (26).

Die Untersuchungsergebnisse entsprechen diesen Überlegungen. Damit ist ein Calcitriol-Mangel nicht mit einer abnormalen Knochenmineralisation gleichzusetzen. Er führt nicht unbedingt zu einer exzessiven Cross-link-Ausscheidung. Eine Korrelation ist nicht zwingend, wie diese Untersuchung gezeigt hat.

Dagegen sprechen die Ergebnisse gegen eine mutmaßliche Erhöhung in der Cross-link-Ausscheidung nach Vitamin-D-Substitution, die zu einer Stimulation extraossären Gewebes führt (180).

Die Cross-links und die Vitamin-D-Derivate bilden unterschiedliche Aspekte innerhalb der Knochenstoffwechselforgänge ab. Die Pyridinium-Verbindungen sind ein Endprodukt in einem spezifischen Stoffwechselprozess. Die Vitamin-D-Hormone dagegen nehmen eine komplexe Stellung sowie eine Schlüsselfunktion in zahlreichen Stoffwechselforgängen im Organismus ein. Vitamin-D-Metaboliten verfügen daher nicht über die diskriminatorischen Eigenschaften, durch die sich z. B. PTH auszeichnet. Sie differenzieren die physiologischen oder pathologischen Veränderungen am Knochen nicht.

5.11 Knochenspezifische alkalische Phosphatase

Die Konzentration der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase betrug durchschnittlich 10 μ g/l und lag damit im unteren Normbereich. Die BAP zeigte keine Korrelation mit den Cross-links im Serum, was das Untersuchungsergebnis von Kagebayashi et al. (211) bestätigt.

Dieses Ergebnis ist vor allem dafür ein Indiz, inwieweit die Stoffwechselforgänge von Knochenresorption und Knochenformation bereits entkoppelt sind. Es spiegelt ein Ungleichgewicht im „bone-remodelling“ wieder. Die Gesamtbetrachtung der Knochenstoffwechselformparameter Cross-links im Serum, PTH und Knochendichte, gemeinsam mit der BAP, verweist auf eine Dyssynchronisation in den Aktivitäten von Osteoblasten und Osteoklasten. Die Ausprägung von Knochenformation und Knochenresorption ist dabei weder zeitlich noch örtlich aufeinander abgestimmt, sondern voneinander unabhängig.

Die insgesamt erniedrigten Knochendichten der vorliegenden Untersuchung und die durchschnittlich niedrige BAP sprechen gemeinsam für eine geringe Stimulation der Knochenneubildung. Im Hinblick auf die moderate Steigerung der Cross-links im Serum ist eine Anbindung der Knochenformation an die Knochenresorption durch einen Coupling-Prozess ausgeschlossen. Sie folgt in ihrem Ausmaß weder den Resorptionsvorgängen, noch läuft sie überall adäquat an. Denn dann würden die BAP-Werte deutlich höher

ausfallen und in einem proportionalen Verhältnis zu den Cross-links stehen. Die vorliegende Untersuchung gibt das nicht her. Sie betont dagegen eher den Aspekt der Eigenständigkeit von BAP innerhalb der Knochenstoffwechsellvorgänge.

BAP unterliegt als Indexmarker der osteoblastären Aktivität und der Knochenformation einem durch Vitamin-D gesteuerten molekularbiologisch-genetischen Einfluß. Normalerweise wird eine Stimulation mit Vitamin-D-Hormon durch einen Anstieg der BAP beantwortet (227). Die niedrige Konzentration der BAP legt die Vermutung nahe, daß die latente Vitamin-D-Mangel-Situation und die niedrig-normalen Vitamin-D-Spiegel eine übliche Antwort dieser Art nicht provozieren können. Es ist durchaus auch möglich, daß die Osteoblasten in ihrer Zellfunktion infolge der renalen Insuffizienz bzw. der Dialysetherapie derart geschädigt sind, daß sie eine Vitamin-D-vermittelte Stimulation nicht adäquat beantworten können. Um die osteoblastären Aktivität sicher zu beurteilen, bietet sich für die Zukunft eine histologische Untersuchung an.

Die niedrige Konzentration von BAP entspricht vor allem einer erniedrigten Knochenformationsrate. Sie kann aber auch durch den Verlust von BAP in die Dialysatflüssigkeit bedingt sein, der bei diesem Patientenkollektiv nicht sicher auszuschließen ist. Denn im Vergleich mit der HD wird die PD mit einem weitaus größeren Verlust an Mittel- und Großmolekülen in Verbindung gebracht (220). Da auch andere Untersuchungen auf den Verlust hochmolekularer Substanzen in die instillierte Dialysatflüssigkeit verweisen (28, 228, 229, 230) sind demnach Konzentrationsänderungen unter Anwendung des PD-Verfahrens durchaus möglich. Die Bestimmung von BAP im Dialysat ist zur Klärung dieser Überlegung erforderlich.

5.12 Calcium

Die Serumkonzentration von ionisiertem Calcium bei pH 7,4 war 1,20 mmol/l und lag damit auf der unteren Grenze des Normbereiches. Korrelationen zwischen Calcium und den Cross-links waren nicht nachweisbar.

Dieses Ergebnis verhielt sich erwartungsgemäß, wenn man sowohl die Eigenschaften von Calcium als auch ein Untersuchungskollektiv aus Peritonealdialysepatienten als Aspekte in den Vorüberlegungen berücksichtigt. Andere Studien kommen zu einem ähnlichen Ergebnis (163, 225).

Calcium eignet sich nicht als Knochenstoffwechselmarker für PD-Patienten. Calcium und die Cross-links werden zwar beide im Serum bestimmt. Jedoch steht der Universalcharakter von Calcium in einem ausgeprägten Kontrast zu der spezifischen Eigenschaft der Cross-links, einzig den Vorgang der Knochenresorption zu dokumentieren.

Eine Einzelmessung von Calcium hat keinen diagnostischen Wert {2454}. Die Korrelationsfähigkeit von Calcium ändert sich mit altersabhängigen Knochenstoffwechselveränderungen (22). Zudem entweicht Calcium durch einen positiven Massentransfer aus Calcium-haltigen Dialysatflüssigkeiten über das Peritoneum in das Blut (182), womit der Meßwert zu einer veränderlichen Größe wird. Die facettenreiche Beteiligung an biologischen Stoffwechsellvorgängen macht Calcium für Störungen, endogen wie exogen, anfällig.

Damit disqualifiziert sich Calcium als verlässlicher Parameter für die Beurteilung von Knochenstoffwechselfvorgängen bei Peritonealdialysepatienten. Die vorliegende Untersuchung veranschaulicht diesen Sachverhalt anhand der normalen Calcium-Werte und der mangelhaften Korrelationen mit den Cross-links im Serum überaus deutlich.

6 Zusammenfassung und Nachwort

6.1 Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse

Der Nachweis der freien Pyridinium-Cross-links Pyd und Dpd ist gleichzeitig in Serum, Dialysat und Urin von Peritonealdialysepatienten erbracht worden. Die Verwendung eines Immuno-Assays hat sich dabei bewährt.

Es besteht ein zirkadianes Ausscheidungsmuster der Cross-links in die Dialysat-flüssigkeit, das auch auf Serum übertragbar ist. Dieses chronobiologische Verhalten macht eine zeitpunktorientierte Diagnostik und Therapie obligat.

Die Filtrationskapazität des Peritoneums für die Cross-links und Kreatinin entspricht sich. Es besteht kein Hinweis auf eine Autoproduktion der Cross-links an der Peritonealmembran. Die Beurteilung der Cross-links im Serum, vor und nach Bezug auf den zugehörigen Kreatininwert im Serum, erlaubt eine Unterscheidung zwischen Retention und Resorption.

Die Cross-links im Serum besitzen eine größere diskriminatorische Fähigkeit als die Cross-links in Dialysat oder Urin. Die freie Fraktion der Cross-links ist nicht ausschließlich das Resultat einer veränderten Peptiddegradation im Nierengewebe.

Die Cross-links im Serum, PTH und die Knochendichte dokumentieren gemeinsam eine gesteigerte Knochenresorption. Der diagnostische Aussagewert von Knochendichten wird durch Messungen an kortikalem Knochen und in der Darstellung als T-Score erhöht.

Die Vitamin-D-Hormone, alkalische Knochenphosphatase und Calcium eignen sich aufgrund mangelhafter diskriminatorischer Eigenschaften und Korrelationen nicht für eine Bewertung des Knochenstoffwechsels.

6.2 Nachwort

Die Cross-links im Serum besitzen einen Informationsgehalt für den Knochenstoffwechsel und für den Abbau von Knochenmasse. Sie erfüllen durchaus den Anspruch an die Routinediagnostik, aktuelle, situative Vorgänge am Knochen darzustellen.

Um zulässige Aussagen für eine Gruppe, einen Trend oder für ein Individuum zu formulieren, ist eine kombinierte Bestimmung der verschiedenen Parameter notwendig. Die Pyridinium-Verbindungen stellen kein ausschließliches diagnostisches Mittel zur Beurteilung von Knochenveränderungen, die durch erkennbare Normabweichungen oder durch die Entwicklung klinischer Symptome charakterisiert sind, dar.

Dieser Umstand beruht ursächlich auf folgenden Zusammenhängen:

Knochengewebe ist kein statisches Organ, sondern ein beeindruckend organisiertes System dynamischer Prozesse und Mechanismen. Die Masse an Knochensubstanz ist hoch, und die Knochenstoffwechselprozesse nehmen einen enormen und fast unvorstellbaren

Umfang ein. Trotzdem dauert es oft Monate bis Jahre, damit sich latente pathologische Veränderungen auch als solche manifestieren. Die endogenen und exogenen Einflußgrößen wirken dabei in ihrer Komplexität und Vielfalt auf die Evaluation dieser Vorgänge fördernd und hemmend zugleich.

Die Peritonealdialysepatienten in diesem Untersuchungskollektiv wurden individuell betreut. Für jeden Einzelnen wurde ein optimiertes und effektives Dialysetherapieschema ausgearbeitet. Daher haben sich renal-induzierte Veränderungen im Knochengewebe und in seinem Metabolismus nicht regelhaft manifestiert.

Die gemeinsame Bestimmung von Cross-links und ergänzenden Knochenstoffwechselfparametern erweist sich jedoch in der quantitativen wie qualitativen Diagnostik von Knochenstoffwechselveränderungen als befriedigend. Gemeinsam genügen sie den Ansprüchen einer praktischen Nutzung im Arzt-Patienten-Alltag und gestatten eine verantwortungsvolle Steuerung und Überwachung der Erkrankung.

Die unkomplizierten und einfachen Nachweismethoden implizieren außerdem eine regelmäßige Wiederholung der diagnostischen Maßnahmen. Das ermöglicht eine kontinuierliche Verlaufskontrolle. Darüberhinaus werden mögliche diagnostische Defizite der Knochenstoffwechselfparameter verringert oder sogar ausgeglichen. Die Vorgänge im Knochen werden somit transparent, und eine Evaluation und Beurteilung knochenmetabolischer Vorgänge sind gewährleistet.

Trotz aller diagnostischen Fortschritte setzen die Individualität jedes einzelnen Patienten und die Heterogenität von Stoffwechselprozessen auch heute noch bei dem jeweiligen Untersucher ein hohes Maß an Geduld in der Diagnostik und in der Behandlung von Knochenstoffwechselveränderungen voraus.

7 Abkürzungsverzeichnis

ACPD	automated continuous peritoneal dialysis
AP	Alkalische Phosphatase
BAP	Alkalische Knochenphosphatase
BC	batch collection berechnet als Summe der Einzelprodukte aus Dialysatproben bzw. Urin, nmol (Pyd + Dpd)/l mit der jeweilig zugehörigen Auslauf- bzw. Ausscheidungsmenge in l
BMC	bone mineral content
BMD	bone mineral density
BRU	bone remodelling units
CAPD	continuous ambulant peritoneal dialysis
CCPD	continuous cyclic peritoneal dialysis
CPD	continuous cyclic dialysis
Dpd	Deoxypyridinolin
DXA	dual-X-ray-absorptiometry
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
HD	Hämodialyse
HPLC	high-performance liquid chromatography-Assay
NIPD	nocturnal intermittent peritoneal dialysis
NPCR	normalized protein catabolic rate
PD	Peritonealdialyse
PET	peritoneal equilibration test
PTH	Parathormon
Pyd	Pyridinolin
RO	Renale Osteopathie
ROI	region of interest
SERABS	(Pyd + Dpd) in nmol/l im Serum
SEREL	nmol (Pyd + Dpd)/mmol Kreatinin im Serum
sHPT	sekundärer Hyperparathyreoidismus
SUMABS	nmol (Pyd + Dpd)/24 h,
SUMREL	nmol (Pyd + Dpd) in nmol/mmol Kreatinin aus allen Dialysatproben einer BC, dividiert durch die Anzahl der Dialysatproben dieser BC
URIN	(Pyd + Dpd) in nmol/mmol Kreatinin im Urin

8 Quellenverzeichnis

- (1) Popovich, R.P., Moncrief, J., Decherd, J.F., Bomar, J.B., and Pyle, W.K. The definition of a novel portable/wearable equilibrium peritoneal dialysis technique. *Trans.Am.Soc.Artif.Intern.Organs* (5):64, Abstract, 1976.
- (2) Popovich, R.P., Moncrief, J.W., Decherd, J.F., Pyle, W.K., Moris, S., and Lindley, J.D. Clinical development of the low dialysis clearance hypothesis via equilibrium peritoneal dialysis. *Proc.Annual Contract. (Conf. 10):123-125*, 1977.
- (3) Popovich, R.P., Moncrief, J.W., Nolph, K.D., Ghods, A.J., Twardowski, Z.J., and Pyle, W.K. Continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Ann.Intern.Med.* 88(4):449-456, 1978.
- (4) Oreopoulos, D.G., Robson, M., Izatt, S., Clayton, S., and deVeber, G.A. A simple and safe technique for continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Trans.Am.Soc.Artif.Intern.Organs* 24:484-489, 1978.
- (5) Schaffner, A.D. and Zaruba, K. [The importance of CAPD in kidney replacement therapy] Bedeutung der CAPD für die Nierenersatztherapie. *Schweiz.Rundsch.Med.Prax.* 83(14):414-425, 1994.
- (6) Wolf, C.J., Polsky, J., Ntoso, K.A., Koethe, J.D., and Gerhardt, R.E. Adequacy of dialysis in CAPD and cyclor PD; the PET is enough. *Adv.Perit.Dial.* 1992; 8: 208-11-11, 1992.
- (7) Teehan, B.P. and Hakim, R. Continuous ambulatory peritoneal dialysis--quo vadis? [editorial]. *J.Am.Soc.Nephrol.* 1995 Aug; 6(2): 139-43, 1995.
- (8) Woodrow, G., Turney, J.H., Cook, J.A., Gibson, J., Fletcher, S., Stewart, A.J., and Brownjohn, A.M. Nocturnal intermittent peritoneal dialysis. *Nephrol.Dial.Transplant.* 9(4):399-403, 1994.
- (9) Maiorca, R., Cancarini, G., Brunori, G., Zubani, R., Camerini, C., and Manili, L. Which treatment for which patient in the future? Possible modifications in. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1995; 10 Suppl 7: 20-6, 1995.
- (10) Krapf, R. and Zabetakis, P.M. Prescription planning for peritoneal dialysis: a practice challenge. *Perit.Dial.Int.* 1995; 15:5 Suppl): S53-8, 1995.
- (11) Harty, J. and Gokal, R. Does CAPD provide adequate dialysis? [editorial]. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1995; 10(7): 1115-7, 1995.
- (12) Gokal, R. What is new in CAPD? (highlights of the 7th Congress of the International Society of Peritoneal Dialysis, June 1995). *Nephrol.Dial.Transplant.* 11(4):734-736, 1996.
- (13) Diaz Buxo, J.A. Enhancement of peritoneal dialysis: the PD Plus concept. *Am.J.Kidney Dis.* 1996 Jan; 27(1): 92-8, 1996.
- (14) Taylor, A.K., Lueken, S.A., Libanati, C., and Baylink, D.J. Biochemical markers of bone turnover for the clinical assessment of bone metabolism. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* 20(3):589-607, 1994.
- (15) Russell, G. Introduction to bone biology and regulatory mechanisms. Martin, S.M. and Halloran, S.P. Anonymous London:Proceedings of the XVI International Congress of Clinical Chemistry 1996, The Association of Clinical Biochemists, 16. :16, 1997.
- (16) Martin, T.J. Endocrine and paracrine factors in the regulation of bone metabolism. Martin, S.M. and Halloran, S.P. Anonymous London:Proceedings of the XVI International Congress of Clinical Chemistry 1996, The Association of Clinical Biochemists, 1-2. :1-2, 1996.
- (17) Tohme, J.F., Seibel, M.J., Silverberg, S.J., Robins, S.P., and Bilezikian, J.P. Biochemical markers of bone metabolism. *Z.Rheumatol.* 1991 May-Jun; 50(3): 133-41, 1991.
- (18) Wallach, S., Carstens, J.H., Jr., Avioli, L.V., and Feinblatt, J.D. Physical and biochemical factors in bone metabolism [editorial]. *Calcif.Tissue Int.* 50(1):1-4, 1992.
- (19) Engler, H., Thürlimann, B., and Riesen, W.F. Biochemical markers of bone remodelling. *Onkologie* (19):126-131, 1996.
- (20) Delling, G., Dreyer, T., Hahn, M., Roser, K., Vogel, M., Welkerling, H., and Wolf, E. [The pathomorphology of metabolic osteopathies--the information potentials of iliac crest biopsies, the pathophysiology and the latest ideas on the structure of the spongiosa] Pathomorphologie metabolischer Osteopathien--Aussagemöglichkeiten an Beckenkammbiopsien, Pathophysiologie und neuere Vorstellungen zur Spongiosastruktur. *Internist.Berl.* 31(12):737-744, 1990.
- (21) Pfeilschifter, J. Der Knochenstoffwechsel und seine Aktivitätsparameter. *Internist.Berl.* (31):727-736, 1990.
- (22) Eastell, R., Simmons, P.S., Colwell, A., Assiri, A.M., Burritt, M.F., Russell, R.G., and Riggs, B.L. Nyctohemeral changes in bone turnover assessed by serum bone Gla-protein concentration and urinary deoxypyridinoline excretion: effects of growth and ageing. *Clin.Sci.Colch.* 83(3):375-382, 1992.

- (23) Delling, G. Morphologie and Klassifikation der renalen Osteopathie. *Internist. Prax.* 28:729-740, 1988.
- (24) Binswanger, U. [Treatment of renal osteopathy] Behandlung der renalen Osteopathie. *Schweiz.Med.Wochenschr.* 119(31-32):1089-1094, 1989.
- (25) Hamdy, N.A. The spectrum of renal bone disease. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1995; 10 Suppl 4: 14-8; discussion 37-43, 1995.
- (26) Haussler, M.R. and McCain, T.A. Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action (second of two parts). *N.Engl.J.Med.* 297(19):1041-1050, 1977.
- (27) Bullough, P.G., Bansal, M., and DiCarlo, E.F. The tissue diagnosis of metabolic bone disease. Role of histomorphometry. *Orthop.Clin.North Am.* 21(1):65-79, 1990.
- (28) Joffe, P., Heaf, J.G., and Jensen, L.T. Type I procollagen propeptide in patients on CAPD: its relationships with. *Nephrol.Dial.Transplant.* 1995 Oct; 10(10): 1912-7, 1995.
- (29) Slatopolsky, E. and Delmez, J.A. Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Am.J.Kidney Dis.* 23(2):229-236, 1994.
- (30) Portale, A.A. and Morris, R.C., Jr. Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism in chronic renal insufficiency. *Miner.Electrolyte Metab.* 17(4):211-220, 1991.
- (31) Marks, K.H., Kilav, R., Naveh Many, T., and Silver, J. Calcium, phosphate, vitamin D, and the parathyroid. *Pediatr.Nephrol.* 10(3):364-367, 1996.
- (32) Melton, L.J.3., Khosla, S., Atkinson, E.J., O'Fallon, W.M., and Riggs, B.L. Relationship of bone turnover to bone density and fractures. *J.Bone Miner.Res.* 12(7):1083-1091, 1997.
- (33) Drueke, T., Krause, R., Mehls, O., Reichel, H., Ritz, E., Schmidt Gayk, H., and Stein, G. Kongresszeitung, Prävention der renalen Osteopathie. Anonymous Anonymous Georg Thieme Verlag, Stuttgart:Dr. med. Heinz Jürgen Deuber, Hoffmann-La-Roche AG, Grenzach-Wyhlen. :1-8, 1995.
- (34) Seibel, M.J., Woitge, H.W., and Ziegler, R. Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels I:Grundlagen. *Klin.Lab.* 39(10):717-727, 1993.
- (35) Delmas, P.D. Biochemical markers of bone turnover. *Acta Orthop.Scand.Suppl.* 266:176-182, 1995.
- (36) Beck Jensen, J.E., Kollerup, G., Sorensen, H.A., Pors Nielsen, S., and Sorensen, O.H. A single measurement of biochemical markers of bone turnover has limited utility in the individual person. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 57(4):351-359, 1997.
- (37) Rosen, H.N., Dresner Pollak, R., Moses, A.C., Rosenblatt, M., Zeind, A.J., Clemens, J.D., and Greenspan, S.L. Specificity of urinary excretion of cross-linked N-telopeptides of type I collagen as a marker of bone turnover. *Calcif.Tissue Int.* 54(1):26-29, 1994.
- (38) Schmidt Gayk, H., Roth, H.J., Becker, S., Reichel, H., Boneth, H.G., and Knuth, U.A. Noninvasive parameters of bone metabolism. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 4(4):334-338, 1995.
- (39) Garnero, P. and Delmas, P.D. New developments in biochemical markers for osteoporosis. *Calcif.Tissue Int.* 59 Suppl 1:S2-9, 1996.
- (40) van Daele, P.L., Birkenhager, J.C., and Pols, H.A. Biochemical markers of bone turnover: an update. *Neth.J.Med.* 44(2):65-72, 1994.
- (41) Jensen, J.E., Sorensen, H.A., Kollerup, G., Jensen, L.B., and Sorensen, O.H. Biological variation of biochemical bone markers. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.Suppl.* 219(Zaehlung), 1994.
- (42) Anonymous Pyridinium crosslinks as markers of bone resorption [editorial]. *Lancet* 1992 Aug 1; 340:8814): 278-9, 1992.
- (43) Eyre, D. New biomarkers of bone resorption [editorial]. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 74(3):470A-470C, 1992.
- (44) Seibel, M.J., Woitge, H.W., and Ziegler, R. Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels II:Klinische Anwendung. *Klin.Lab.* 39(11):839-850, 1993.
- (45) Robins, S.P. and Duncan, A. Cross-linking of collagen. Location of pyridinoline in bovine articular cartilage at two sites of the molecule. *Biochem.J.* 215(1):175-182, 1983.
- (46) James, I.T., Walne, A.J., and Perrett, D. The measurement of pyridinium crosslinks: a methodological overview. *Ann.Clin.Biochem.* 33(Pt 5):397-420, 1996.
- (47) Robins, S.P. and Duncan, A. Pyridinium crosslinks of bone collagen and their location in peptides isolated from rat femur. *Biochim.Biophys.Acta* 914(3):233-239, 1987.
- (48) Risteli, L., Risteli, J., and Moniz, C. Measuring collagen degradation. *Eur.J.Clin.Invest.* 23(6):339-340, 1993.
- (49) Niwa, T., Shiobara, K., Hamada, T., Miyazaki, T., Tsukushi, S., Uema, K., and Tsuzuki, T. Serum pyridinolines as specific markers of bone resorption in hemodialyzed patients. *Clin.Chim.Acta* 235(1):33-40, 1995.
- (50) Withold, W. Pyridinium cross-links. In: *Labor und Diagnose: Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik.* edited by Thomas, L.Marburg:Med. Verl.-Ges. 1997,p. 1-11.

- (51) Robins, S.P. Cross-linking of collagen. Isolation, structural characterization and glycosylation of pyridinoline. *Biochem.J.* 215(1):167-173, 1983.
- (52) Fujimoto, D., Moriguchi, T., Ishida, T., and Hayashi, H. The structure of pyridinoline, a collagen crosslink. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 84(1):52-57, 1978.
- (53) Eyre, D.R. Crosslink maturation in bone collagen. In: *The chemistry and biology of mineralized connective tissues*, edited by Veis, A. Amsterdam:Elsevier, 1981, p. 51-55.
- (54) Demers, L.M. New biochemical marker for bone disease: is it a breakthrough? [editorial]. *Clin.Chem.* 38(11):2169-2170, 1992.
- (55) Eyre, D.R., Dickson, I.R., and Van Ness, K. Collagen cross-linking in human bone and articular cartilage. Age-related changes in the content of mature hydroxypyridinium residues. *Biochem.J.* 252(2):495-500, 1988.
- (56) Barber, M., Bordoli, R.S., Elliott, G.J., Fujimoto, D., and Scott, J.E. The structure(s) of pyridinoline(s). *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 109(3):1041-1046, 1982.
- (57) Fujimoto, D., Suzuki, M., Uchiyama, A., Miyamoto, S., and Inoue, T. Analysis of pyridinoline, a cross-linking compound of collagen fibers, in human urine. *J.Biochem.Tokyo.* 94(4):1133-1136, 1983.
- (58) Bettica, P., Baylink, D.J., and Moro, L. Galactosyl hydroxylysine and deoxypyridinoline: a methodological comparison. *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 31(7):459-465, 1993.
- (59) Robins, S.P., Duncan, A., and Riggs, B.L. Direct measurement of free hydroxy-pyridinium crosslinks of collagen in urine as new markers of bone resorption in osteoporosis. Christiansen, C. and Overgaard, K. *Osteoporosis 1990*. Copenhagen:Osteopress, 465-468. (*Osteoporosis 1990*):465-468, 1990.
- (60) Seibel, M.J., Zipf, A., and Ziegler, R. [Pyridinium cross-links in the urine. Specific markers of bone resorption. *Dtsch.Med.Wochenschr.* 1994 Jun 24; 119:25-26, 1994.
- (61) Robins, S.P., Stewart, P., Astbury, C., and Bird, H.A. Measurement of the cross linking compound, pyridinoline, in urine as an index of collagen degradation in joint disease. *Ann.Rheum.Dis.* 45(12):969-973, 1986.
- (62) Eyre, D.R. The specificity of collagen cross-links as markers of bone and connective tissue degradation. *Acta Orthop.Scand.Suppl.* 266:166-170, 1995.
- (63) Grenard, P., Blanquier, B., and Ricard Blum, S. Urinary excretion of the collagen cross-link pyridinoline increases during liver fibrogenesis. *J.Hepatol.* 26(6):1356-1362, 1997.
- (64) Seibel, M.J., Robins, S.P., and Bilezikian, J.P. Urinary pyridinium crosslinks of collagen. Specific markers of bone resorption in metabolic bone disease. *TEM* 3(7):263-270, 1992.
- (65) Eastell, R., Hampton, L., Colwell, A., Green, J.R., Assiri, A.M., Hesp, R., Russell, R.G., and Reeve, J. Urinary collagen crosslinks are highly correlated with radioisotopic measurements of bone resorption. Christiansen, C. and Overgaard, K. *Anonymous Copenhagen:Osteopress*, 469-470. (*Osteoporosis 1990*):469-470, 1990.
- (66) Delmas, P.D., Schlemmer, A., Gineyts, E., Riis, B., and Christiansen, C. Urinary excretion of pyridinoline crosslinks correlates with bone turnover measured on iliac crest biopsy in patients with vertebral osteoporosis. *J.Bone Miner.Res.* 6(6):639-644, 1991.
- (67) Robins, S.P. Collagen crosslinks in metabolic bone disease. *Acta Orthop.Scand.Suppl.* 266:171-175, 1995.
- (68) Kollerup, G. Urinary excretion of collagen cross-links : Pyridinoline and Deoxypyridinoline, biochemical markers of bone resorption. *Dan.Med.Bull.* 43(2), 1996.
- (69) Robins, S.P., Black, D., Paterson, C.R., Reid, D.M., Duncan, A., and Seibel, M.J. Evaluation of urinary hydroxypyridinium crosslink measurements as resorption markers in metabolic bone diseases. *Eur.J.Clin.Invest.* 21(3):310-315, 1991.
- (70) Abbiati, G., Rigoldi, M., Frignani, S., Colombo, L., and Mussini, E. Determination of pyridinium crosslinks in plasma and serum by high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.B.Biomed.Appl.* 656(2):303-310, 1994.
- (71) Seibel, M.J., Gartenberg, F., Silverberg, S.J., Ratcliffe, A., Robins, S.P., and Bilezikian, J.P. Urinary hydroxypyridinium cross-links of collagen in primary hyperparathyroidism. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 74(3):481-486, 1992.
- (71) Guerrero, R., Diaz Martin, M.A., Diaz Diego, E.M., Disla, T., Rapado, A., and de la Piedra, C. New biochemical markers of bone resorption derived from collagen breakdown in the study of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos.Int.* 6(4):297-302, 1996.
- (72) Castelain, S., Kamel, S., Picard, C., Desmet, G., Seibert, J.L., and Brazier, M. A simple and automated HPLC method for determination of total hydroxyproline in urine. Comparison with excretion of pyridinolines. *Clin.Chim.Acta* 235(1):81-90, 1995.

- (73) Pratt, D.A., Daniloff, Y., Duncan, A., and Robins, S.P. Automated analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in tissue and urine using solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal.Biochem.* 207(1):168-175, 1992.
- (74) Eyre, D.R., Koob, T.J., and Van Ness, K.P. Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography. *Anal.Biochem.* 137(2):380-388, 1984.
- (75) Bank, R.A., Beekman, B., Verzijl, N., deRoos, J.A.D.M., Sakkee, A.N., and TeKoppele, J.M. Sensitive fluorimetric quantitation of pyridinium and pentosidine crosslinks in biological samples in a single high-performance liquid chromatographic run. *Journal.Of.Chromatography.B.* 703(1-2):37-44, 1997.
- (76) Black, D., Duncan, A., and Robins, S.P. Quantitative analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in urine using ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal.Biochem.* 169(1):197-203, 1988.
- (77) Pratt, D.A., Daniloff, Y., Duncan, A., and Robins, S.P. Automated analysis of the pyridinium crosslinks of collagen in tissue and. *Anal.Biochem.* 1992 Nov 15; 207(1): 168-75, 1992.
- (78) Kato, S., Toyama, J., Kodama, I., Koike, A., and Abe, T. Role of platelet activating factor in ischaemia-reperfusion injury of. *Cardiovasc.Res.* 1993 Aug; 27(8): 1430-4, 1993.
- (79) Colwell, A. and Eastell, R. The renal clearance of free and conjugated pyridinium cross-links of collagen. *J.Bone Miner.Res.* 11(12):1976-1980, 1996.
- (80) Abbiati, G., Bartucci, F., Longoni, A., Fincato, G., Galimberti, S., Rigoldi, M., and Castiglioni, C. Monitoring of free and total urinary pyridinoline and deoxypyridinoline in healthy volunteers: sample relationships between 24-h and fasting early morning urine concentrations. *Bone Miner.* 21(1):9-19, 1993.
- (81) Robins, S.P., Duncan, A., and McLaren, A.M. Structural specificity of an ELISA for the collagen crosslink, pyridinoline: Implications for the measurement of free pyridinium crosslinks as indices of resorption in metabolic bone diseases. *J Bone Miner Res* 6, Suppl. 1:S244, 642, 1991.
- (82) Walne, A.J., James, I.T., and Perrett, D. The stability of pyridinium crosslinks in urine and serum [letter]. *Clin.Chim.Acta* 1995 Aug 31; 240(1): 95-7, 1995.
- (83) Kent, G.N. Standardization of marker assays--pyridinoline/deoxypyridinoline. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.Suppl.* 227(Zaehlung), 1997.
- (84) Robins, S.P., Stead, D.A., and Duncan, A. Precautions in using an internal standard to measure pyridinoline and deoxypyridinoline in urine [letter; comment]. *Clin.Chem.* 40(12):2322-2323, 1994.
- (85) Beardsworth, L.J., Eyre, D.R., and Dickson, I.R. Changes with age in the urinary excretion of lysyl- and hydroxyllysylpyridinoline, two new markers of bone collagen turnover. *J.Bone Miner.Res.* 5(7):671-676, 1990.
- (86) Calabresi, E., Lasagni, L., Franceschelli, F., Bartolini, L., Serio, M., and Brandi, M.L. Use of an internal standard to measure pyridinoline and deoxypyridinoline in urine [letter] [see comments]. *Clin.Chem.* 40(2):336-337, 1994.
- (87) Colwell, A., Russell, R.G., and Eastell, R. Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxy pyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption. *Eur.J.Clin.Invest.* 23(6):341-349, 1993.
- (88) Abbiati, G., Rigoldi, M., Mussini, E., and Castiglioni, C. An HPLC isocratic method for pyridinoline (HP) and deoxypyridinoline (LP) analysis: a new approach to their standard quantification. Christiansen, C. and Overgaard, K. Anonymous Copenhagen:Osteopress, 616-618. (Osteoporosis 1990):616-618, 1990.
- (89) McGuinness, B.J., Casserly, U.M., Power, M.J., and Fottrell, P.F. Purification of collagen crosslinks; potential biomarkers for bone disorders. *Biochem.Soc.Trans.* 23(2):386S, 1995.
- (90) Kamel, S., Brazier, M., Desmet, G., Picard, C., Mennecier, I., and Sebert, J. High-performance liquid chromatographic determination of 3-hydroxypyridinium derivatives as new markers of bone resorption. *J.Chromatogr.* 574(2):255-260, 1992.
- (91) Gerrits, M.I., Thijssen, J.H., and van Rijn, H.J. Determination of pyridinoline and deoxypyridinoline in urine, with special attention to retaining their stability. *Clin.Chem.* 41(4):571-574, 1995.
- (92) Kollerup, G., Thamsborg, G., Bhatia, H., and Sorensen, O.H. Quantitation of urinary hydroxypyridinium cross-links from collagen by high-performance liquid chromatography. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 52(7):657-662, 1992.
- (93) Robins, S.P., Duncan, A., Wilson, N., and Evans, B.J. Standardization of pyridinium crosslinks, pyridinoline and deoxypyridinoline, for use as biochemical markers of collagen degradation. *Clin.Chem.* 42(10):1621-1626, 1996.
- (94) Robins, S.P., Woitge, H., Hesley, R., Ju, J., Seyedin, S., and Seibel, M.J. Direct, enzyme-linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J.Bone Miner.Res.* 9(10):1643-1649, 1994.

- (95) Pearce, D., Fisher, E., Randall, A., Will, R., Kent, G.N., and Garcia Webb, P. Urinary levels of Pyridinoline and deoxypyridinoline may be influenced by turnover of non-osseous tissues in patients with joint disease [letter]. *Br.J.Rheumatol.* 34(12):1186-1187, 1995.
- (96) Withold, W., Friedrich, W., and Reinauer, H. Comparison of biochemical markers of bone resorption in patients with metabolic and malignant bone diseases. *Ann.Clin.Biochem.* 33(Pt 5):421-427, 1996.
- (97) Seibel, M.J., Woitge, H., Scheidt Nave, C., Zipf, A., Duncan, A., Nicol, P., Ziegler, R., and Robins, S.P. Population screening for bone resorption using pyridinium crosslinks of collagen : Comparison of direct ELISA with HPLC assays. *Calcif.Tissue Int.* 52,Suppl.1:S6, 1993.
- (98) Seyedin, S.M., Kung, V.T., Daniloff, Y.N., Hesley, R.P., Gomez, B., Nielsen, L.A., Rosen, H.N., and Zuk, R.F. Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption. *J.Bone Miner.Res.* 8(5):635-641, 1993.
- (99) Hata, K. and Miura, M. Evaluation of an immunoassay method for the determination of urinary collagen crosslink excretion. *Ann.Clin.Biochem.* 31(Pt 4):374-375, 1994.
- (100) Hanson, D.A., Weis, M.A., Bollen, A.M., Maslan, S.L., Singer, F.R., and Eyre, D.R. A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J.Bone Miner.Res.* 7(11):1251-1258, 1992.
- (101) Bonde, M., Qvist, P., Fledelius, C., Riis, B.J., and Christiansen, C. Immunoassay for quantifying type I collagen degradation products in urine evaluated [see comments]. *Clin.Chem.* 40(11 Pt 1):2022-2025, 1994.
- (102) Kamel, S., Brazier, M., Neri, V., Picard, C., Samson, L., Desmet, G., and Seibert, J.L. Multiple molecular forms of pyridinoline cross-links excreted in human urine evaluated by chromatographic and immunoassay methods. *J.Bone Miner.Res.* 10(9):1385-1392, 1995.
- (103) Delmas, P.D., Gineyts, E., Bertholin, A., Garnero, P., and Marchand, F. Immunoassay of pyridinoline crosslink excretion in normal adults and in Paget's disease. *J.Bone Miner.Res.* 8(5):643-648, 1993.
- (104) Calabresi, E., Lasagni, L., Franceschelli, F., de Leonardis, V., Becorpi, A., Serio, M., and Brandi, M.L. Comparison of immuno- and HPLC-assays for the measurement of urinary collagen cross-links. *J.Endocrinol.Invest.* 17(8):625-629, 1994.
- (105) Engler, H. and Riesen, W. Pyridinium-Crosslinks : Sind die Resultate der freien PYD-, DPD-Bestimmung als Knochen-Resorptionsmarker vergleichbar zu denjenigen der Gesamt-PYD-, DPD-Konzentration? *Klin.Lab.* 41(11):893-895, 1995.
- (106) Abbiati, G., Rigoldi, M., Arrigoni, M., Longoni, A., and Fincato, G. Weekly monitoring of free and total urinary pyridinoline and deoxypyridinoline in healthy volunteers. Christiansen, C. and Overgaard, K. Anonymous Copenhagen:Osteopress, 613-615. (*Osteoporosis 1990*):521-522, 1990.
- (107) Robins, S.P. Collagen derived products, crosslinks and other measurements. Martin, S.M. and Halloran, S.P. Anonymous London:Proceedings of the XVI International Congress of Clinical Chemistry 1996, The Association of Clinical Biochemists, 17. :17, 1996.
- (108) Daniloff, Y.N., Harris, D., Shepard, K., and Seyedin, S. Appearance of hydroxypyridine crosslinks in urine. *Connect.Tissue Res.* 27:187, 1991.
- (109) Black, D., Farquharson, C., and Robins, S.P. Excretion of pyridinium cross-links of collagen in ovariectomized rats as urinary markers for increased bone resorption. *Calcif.Tissue Int.* 44(5):343-347, 1989.
- (110) Hata, K., Miura, M., Fukumoto, S., and Matsumoto, T. Assay of serum pyridinoline: a potential marker for bone resorption. *Clin.Chim.Acta* 235(2):221-227, 1995.
- (111) Garnero, P., Gineyts, E., Arbault, P., Christiansen, C., and Delmas, P.D. Different effects of bisphosphonate and estrogen therapy on free and peptide-bound bone cross-links excretion. *J.Bone Miner.Res.* 10(4):641-649, 1995.
- (112) Schmidt Gayk, H., Druke, T., and Ritz, E. Non-invasive circulating indicators of bone metabolism in uraemic patients: can they replace bone biopsy? [editorial]. *Nephrol.Dial.Transplant.* 11(3):415-418, 1996.
- (113) Delmas, P.D. Biochemical measurement of bone metabolism - theoretical and practical aspects. Martin, S.M. and Halloran, S.P. Anonymous London:Proceedings of the XVI International Congress of Clinical Chemistry 1996, The Association of Clinical Biochemists, 16-17. :16-17, 1996.
- (114) Nakamura, H., Mori, T., Genma, R., Suzuki, Y., Natsume, H., Andoh, S., Kitahara, R., Nagasawa, S., Nishiyama, K., and Yoshimi, T. Urinary excretion of pyridinoline and deoxypyridinoline measured by immunoassay in hypothyroidism. *Clin.Endocrinol.Oxf.* 44(4):447-451, 1996.
- (115) Seibel, M.J., Duncan, A., and Robins, S.P. Urinary hydroxy-pyridinium crosslinks provide indices of cartilage and bone involvement in arthritic diseases. *J.Rheumatol.* 16(7):964-970, 1989.
- (116) Seibel, M.J., Cosman, F., Shen, V., Gordon, S., Dempster, D.W., Ratcliffe, A., and Lindsay, R. Urinary hydroxypyridinium crosslinks of collagen as markers of bone resorption and estrogen efficacy in postmenopausal osteoporosis. *J.Bone Miner.Res.* 8(7):881-889, 1993.

- (117) McLaren, A.M., Hordon, L.D., Bird, H.A., and Robins, S.P. Urinary excretion of pyridinium crosslinks of collagen in patients with osteoporosis and the effects of bone fracture. *Ann.Rheum.Dis.* 51(5):648-651, 1992.
- (118) James, I., Perrett, D., Spector, T.D., Skingle, L., Hart, D., and Thompson, P.W. The affect of age on urinary pyridinium crosslink excretion in normal postmenopausal women. *Clin.Rheumatol.* 10(4):457, 1991.
- (119) Arbault, P., Grimaux, M., Pradet, V., Preaudat, C., Seguin, P., and Delmas, P.D. Assessment of urinary pyridinoline excretion with a specific enzyme-linked immunosorbent assay in normal adults and in metabolic bone diseases. *Bone* 16(4):461-467, 1995.
- (120) Robins, S.P., Seibel, M.J., and McLaren, A.M. Collagen markers in urine in human arthritis. In: *Methods in cartilage research*, edited by Maroudas, A. and Kuettner, K. London:Academic Press, 1990,p. 348-351.
- (121) Uebelhart, D., Schlemmer, A., Johansen, J.S., Gineyts, E., Christiansen, C., and Delmas, P.D. Effect of menopause and hormone replacement therapy on the urinary excretion of pyridinium cross-links. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 72(2):367-373, 1991.
- (122) Colwell, A., Russell, R.G., and Eastell, R. Factors affecting the assay of urinary 3-hydroxy pyridinium crosslinks of. *Eur.J.Clin.Invest.* 1993 Jun; 23(6): 341-9, 1993.
- (123) Yamauchi, M., Young, D.R., Chandler, G.S., and Mechanic, G.L. Cross-linking and new bone collagen synthesis in immobilized and recovering primate osteoporosis. *Bone* 9(6):415-418, 1988.
- (124) Isdale, A. and Helliwell, P.S. Athletes and osteoarthritis--is there any relationship? [letter; comment] [see comments]. *Br.J.Rheumatol.* 30(1):67-68, 1991.
- (125) McLaren, A.M., Isdale, A.H., Whiting, P.H., Bird, H.A., and Robins, S.P. Physiological variations in the urinary excretion of pyridinium crosslinks. *Br.J.Rheumatol.* 1993 Apr; 32(4): 307-12, 1993.
- (126) Acil, Y., Brinckmann, J., Notbohm, H., Muller, P.K., and Batge, B. Changes with age in the urinary excretion of hydroxylslypyridinoline (HP) and lysylpyridinoline (LP). *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 56(3):275-283, 1996.
- (127) Colwell, A., Eastell, R., Assiri, A.M., and Russell, R.G. Effect of diet on deoxypyridinoline excretion. Christiansen, C. and Overgaard, K. Anonymous Copenhagen:Osteopress, 590-591. (*Osteoporosis* 1990):590-591, 1990.
- (128) Colwell, A., Hamer, A., Blumsohn, A., and Eastell, R. To determine the effects of ultraviolet light, natural light and ionizing radiation on pyridinium cross-links in bone and urine using high-performance liquid chromatography. *Eur.J.Clin.Invest.* 26(12):1107-1114, 1996.
- (129) Bollen, A.M. and Eyre, D.R. Urinary pyridinoline excretion as a measure of bone growth in children. *Connect.Tissue Res.* 27:186, 1991.
- (130) Thijssen, J.H., Vecht-Hart, C.M., Gerrits, M.I., and van Rijn, H.J. Presymptomatic excretion of pyridinium crosslinks in osteoporotic and non-osteoporotic women. Martin, S.M. and Halloran, S.P. Anonymous London:Proceedings of the XVI International Congress of Clinical Chemistry 1996, The Association of Clinical Biochemists, 206. :206, 1996.
- (131) Schlemmer, A., Hassager, C., Pedersen, B.J., and Christiansen, C. Posture, age, menopause, and osteopenia do not influence the circadian variation in the urinary excretion of pyridinium crosslinks. *J.Bone Miner.Res.* 9(12):1883-1888, 1994.
- (132) Panteghini, M. and Pagani, F. Biological variation in urinary excretion of pyridinium crosslinks: recommendations for the optimum specimen. *Ann.Clin.Biochem.* 33(Pt 1):36-42, 1996.
- (133) Yoshihara, K., Nemoto, S., and Nagata, M. Urinary excretion level of hydroxylslypyridinoline as an index of bone resorption. *Biol.Pharm.Bull.* 17(6):840-842, 1994.
- (134) Wishart, J.M., Need, A.G., Horowitz, M., Morris, H.A., and Nordin, B.E. Effect of age on bone density and bone turnover in men. *Clin.Endocrinol.Oxf.* 42(2):141-146, 1995.
- (135) Arbault, P., Grimaux, M., Pradet, V., Preaudat, C., Seguin, P., and Delmas, P.D. Assessment of urinary pyridinoline excretion with a specific enzyme-linked immunosorbent assay in normal adults and in metabolic bone diseases. *Bone* 16(4):461-467, 1995.
- (136) Bettica, P., Moro, L., Robins, S.P., Taylor, A.K., Talbot, J., Singer, F.R., and Baylink, D.J. Bone-resorption markers galactosyl hydroxylsine, pyridinium crosslinks, *Clin.Chem.* 1992 Nov; 38(11): 2313-8, 1992.
- (137) Uebelhart, D., Schlemmer, A., Johansen, J.S., Gineyts, E., Christiansen, C., and Delmas, P.D. Effect of menopause and hormone replacement therapy on the urinary. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1991 Feb; 72(2): 367-73, 1991.
- (138) Eastell, R., Robins, S.P., Colwell, T., Assiri, A.M., Riggs, B.L., and Russell, R.G. Evaluation of bone turnover in type I osteoporosis using biochemical markers specific for both bone formation and bone resorption. *Osteoporos.Int.* 3(5):255-260, 1993.

- (139) Robins, S.P., Woitge, H., Hesley, R., Ju, J., Seyedin, S., and Seibel, M.J. Direct, enzyme-linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J.Bone Miner.Res.* 1994 Oct; 9(10): 1643-9, 1994.
- (140) Garnero, P., Shih, W.J., Gineyts, E., Karpf, D.B., and Delmas, P.D. Comparison of new biochemical markers of bone turnover in late postmenopausal osteoporotic women in response to alendronate treatment. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 79(6):1693-1700, 1994.
- (141) Kim, J., Weissman, S., Bank, S., Mirmiran-Yazdy, A., Stark, B., and Bailey, B. Elevated urinary levels of pyridinium cross links (PCL) in patients with pancreatic disorders and their correlation with the severity of pancreatitis. *Gastroenterology* 110, Supplement(4):A404, 1996.
- (142) Harvey, R.D., McHardy, K.C., Reid, I.W., Paterson, F., Bewsher, P.D., Duncan, A., and Robins, S.P. Measurement of bone collagen degradation in hyperthyroidism and during thyroxine replacement therapy using pyridinium cross-links as specific urinary markers. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 72(6):1189-1194, 1991.
- (143) Seibel, M.J., Gartenberg, F., Silverberg, S.J., Ratcliffe, A., and Robins, S.P. Urinary hydroxypyridinium cross-links of collagen in primary hyperparathyroidism. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1992 Mar; 74(3): 481-6, 1992.
- (144) Risteli, L., Risteli, J., and Moniz, C. Measuring collagen degradation. *Eur.J.Clin.Invest.* 23(6):339-340, 1993.
- (145) Schlemmer, A., Hassager, C., Jensen, S.B., and Christiansen, C. Marked diurnal variation in urinary excretion of pyridinium cross-links in premenopausal women. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 74(3):476-480, 1992.
- (146) Eastell, R., Calvo, M.S., Burritt, M.F., Offord, K.P., Russell, R.G., and Riggs, B.L. Abnormalities in circadian patterns of bone resorption and renal calcium conservation in type I osteoporosis. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 74(3):487-494, 1992.
- (147) Hassager, C., Risteli, J., Risteli, L., Jensen, S.B., and Christiansen, C. Diurnal variation in serum markers of type I collagen synthesis and degradation in healthy premenopausal women. *J.Bone Miner.Res.* 7(11):1307-1311, 1992.
- (148) McLaren, A.M., Isdale, A.H., Whiting, P.H., Bird, H.A., and Robins, S.P. Physiological variations in the urinary excretion of pyridinium crosslinks of collagen. *Br.J.Rheumatol.* 32(4):307-312, 1993.
- (149) Arrigoni, M., Abbiati, G., Galimberti, S., Longoni, A., and Bartucci, F. Free and total urinary pyridinoline (HP) and deoxypyridinoline (LP) analysis: comparison between 24 hrs collection and fastin early morning urine samples values. Christiansen, C. and Overgaard, K. Anonymous Copenhagen:Osteopress, 596-598. (*Osteoporosis* 1990):596-598, 1990.
- (150) Fincato, G., Bartucci, F., Rigoldi, M., Abbiati, G., Colombo, M., Bartolini, O., Brandi, M.L., and de Leonardis, V. Urinary Excretion of pyridinoline and deoxypyridinoline: Circadian rhythm in healthy premenopausal women. *J.interdiscipl.Cycle Res.* 24(1):72-78, 1993.
- (151) Douglas, A.S., Miller, M.H., Reid, D.M., Hutchison, J.D., Porter, R.W., and Robins, S.P. Seasonal differences in biochemical parameters of bone remodelling. *J.Clin.Pathol.* 49(4):284-289, 1996.
- (152) Lakatos, P., Blumsohn, A., Eastell, R., Tarjan, G., Shinoda, H., and Stern, P.H. Circadian rhythm of in vitro bone-resorbing activity in human serum. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1995 Nov; 80(11): 3185-90, 1995.
- (153) Kung, V.T., Gomez, B., Jr., Lundgard, R., Seyedin, S., Clark, B., and Riggs, L. An immunoassay for the measurement of free pyridinoline in serum: a marker of bone resorption. *J.Bone Miner.Res.* 8(Suppl.):S151, 1993.
- (154) James, I., Crowley, C., and Perrett, D. Assay of pyridinium crosslinks in serum using narrow-bore ion-paired reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J.Chromatogr.* 612(1):41-48, 1993.
- (155) Urena, P., Ferreira, A., Kung, V.T., Morieux, C., Simon, P., Ang, K.S., Souberbielle, J.C., Segre, G.V., Druke, T.B., and de Vernejoul, M.C. Serum pyridinoline as a specific marker of collagen breakdown and bone metabolism in hemodialysis patients. *J.Bone Miner.Res.* 10(6):932-939, 1995.
- (156) Ibrahim, S., Mojiminiyi, S., and Barron, J.L. Pyridinium crosslinks in patients on hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephrol.Dial.Transplant.* (10):2290-2294, 1995.
- (157) Ibrahim, S., Mojiminiyi, S., and Barron, J.L. High-performance liquid chromatographic determination of pyridinium crosslinks in serum, urine and dialysate of patients in chronic renal failure. *Ann.Clin.Biochem.* 33(Pt 1):31-35, 1996.
- (158) Hein, G., Franke, S., Muller, A., Braunig, E., Eidner, T., and Stein, G. The determination of pyridinium crosslinks in urine and serum as a possible marker of cartilage degradation in rheumatoid arthritis. *Clin.Rheumatol.* 16(2):167-172, 1997.

- (159) Nemoto, R., Nakamura, I., Nishijima, Y., Shiobara, K., Shimizu, M., Takehara, T., Ohta, T., and Kiyoki, M. Serum pyridinoline crosslinks as markers of tumour-induced bone resorption. *Br.J.Urol.* 80(2):274-280, 1997.
- (160) Spacek, P., Hulejova, H., and Adam, M. Determination of pyridinium crosslinks in serum and optimization of sample preparation. *J.Chromatogr.B.Biomed.Appl.* 689(2):404-408, 1997.
- (161) Dambacher, M.A. and Ruegsegger, P. [Bone density measurements and their indications] Knochendichtemessungen und ihre Indikationen. *Orthopade.* 23(1):38-44, 1994.
- (162) Johnson, D.W., McIntyre, H.D., Brown, A., Freeman, J., and Rigby, R.J. The role of DEXA bone densitometry in evaluating renal osteodystrophy in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Perit.Dial.Int.* 16(1):34-40, 1996.
- (163) Pasadakis, P., Thodis, E., Manavis, J., Mourvati, E., Panagoutsos, S., and Vargemezis, V. The identification of bone mineral density in CAPD in comparison with HD. *Adv.Perit.Dial.* 1995; 11: 247-53-53, 1995.
- (164) Katagiri, M., Ohtawa, T., Fukunaga, M., and Harada, T. Evaluation of bone loss and the serum markers of bone metabolism in patients with hyperparathyroidism. *Surg.Today* 25(7):598-604, 1995.
- (165) Notelovitz, M. Osteoporosis: screening, prevention, and management. *Fertil.Steril.* 59(4):707-725, 1993.
- (166) Hutchinson, A.J., Whitehouse, R.W., Boulton, H.F., Adams, J.E., Mawer, E.B., Freemont, T.J., and Gokal, R. Correlation of bone histology with parathyroid hormone, vitamin D₃, and radiology in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 44:1071-1077, 1993.
- (167) Banzer, D. and Felsenberg, D. [Computerized tomography determination of bone mineral content in quantitative diagnosis of osteoporosis] Computertomographische Knochenmineralgehaltsbestimmung zur quantitativen Osteoporosediagnostik. *Orthopade.* 18(1):12-17, 1989.
- (168) Hassager, C. and Christiansen, C. Measurement of bone mineral density [editorial]. *Calcif.Tissue Int.* 57(1):1-5, 1995.
- (169) Mitlak, B.H. and Nussbaum, S.R. Diagnosis and treatment of osteoporosis. *Annu.Rev.Med.* 44:265-277, 1993.
- (170) Fischer, M., Felsenberg, D., and Kempers, B. Methoden der Knochendichtemessung heutiger Stand. *Klinikerarzt* 22(1):15-23, 1993.
- (171) Demers, L.M. and Kleerekoper, M. Recent advances in biochemical markers of bone turnover [editorial; *Clin.Chem.* 1994 Nov; 40:11 Pt 1): 1994-5, 1994.
- (172) Akesson, K. Biochemical markers of bone turnover. A review. *Acta Orthop.Scand.* 66(4):376-386, 1995.
- (173) Cunningham, J. The prevention of secondary hyperparathyroidism. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 2(4):552-557, 1993.
- (174) Norman, R.E. Multivariate analysis of the vitamin D endocrine system: evidence for the essentiality of both 24 R, 25-dihydroxy-vitamin D₃ and 1 α , 25-dihydroxy-vitamin D₃. *Adv.Exp.Med.Biol.* :645-659, 1980.
- (175) Henning, H.V. [Vitamin D and D hormones] Vitamin D und D-Hormone. *Internist.Berl.* 33(12):838-842, 1992.
- (176) Slatopolsky, E. and Delmez, J.A. Pathogenesis of secondary hyperparathyroidism. *Miner.Electrolyte Metab.* 21(1-3):91-96, 1995.
- (177) Tanaka, Y. and DeLuca, H.F. Stimulation of 24,25-dihydroxyvitamin D₃ production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Science* 183(130):1198-1200, 1974.
- (178) Iqbal, S.J. Vitamin D metabolism and the clinical aspects of measuring metabolites [see comments]. *Ann.Clin.Biochem.* 31(Pt 2):109-124, 1994.
- (179) Popovtzer, M.M. and Rubinger, D. 24,25(OH)₂D₃ in Kombination mit 1 α (OH)D₃ : eine effektive Therapie der renalen Osteopathie. *Nieren- und Hochdruckkrankheiten* 21(8):325-330, 1992.
- (180) Sirtori, P., Sosio, C., Resmini, G., and Rubinacci, A. Effect of short course of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on biochemical markers of bone remodelling in postmenopausal women. *Pharmacol.Res.* 33(6):353-359, 1996.
- (181) Kamel, S., Brazier, M., Rogez, J.C., Vincent, O., Maamer, M., Desmet, G., and Sebert, J.L. Different responses of free and peptide-bound cross-links to vitamin D and calcium supplementation in elderly women with vitamin D insufficiency. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 81(10):3717-3721, 1996.
- (182) Joffe, P., Ladefoged, S.D., Cinton, C., Jensen, L.T., and Hyldstrup, L. Acute effect of oral, intraperitoneal, and intravenous 1 alpha-hydroxycholecalciferol on markers of bone metabolism. *Nephrol.Dial.Transplant.* 9(5):524-531, 1994.
- (183) Akizawa, T., Fukagawa, M., Koshikawa, S., and Kurokawa, K. Recent progress in management of secondary hyperparathyroidism of chronic renal failure. *Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.* 2(4):558-565, 1993.

- (184) Delmas, P.D. Biochemical markers of bone turnover. *Acta Orthop.Scand.Suppl.*266 66:176-182, 1995.
- (185) Delmas, P.D. What do we know about biochemical bone markers? *Baillieres.Clin.Obstet.Gynaecol.* 1991 Dec; 5(4): 817-30, 1991.
- (186) Rick, W. In: *Klinische Chemie und Mikroskopie*, Anonymous Berlin:Springer-Verlag, 1990,p. 289
- (187) Rick, W. In: *Klinische Chemie und Mikroskopie*, Anonymous Berlin:Springer-Verlag, 1990,p. 312-313.
- (188) Werner, E., Malluche, H.H., Kutschera, J., Hodgson, M., and Schoeppe, W. Intestinal calcium absorption and whole-body calcium retention in various stages of renal insufficiency. *Calcif.Tissue Res.* 21 Suppl:210-215, 1976.
- (189) Coburn, J.W., Koppel, M.H., Brickman, A.S., and Massry, S.G. Study of intestinal absorption of calcium in patients with renal failure. *Kidney Int.* 3(4):264-272, 1973.
- (190) Gomez, B., Jr., Ardakani, S., Evans, B.J., Merrell, L.D., Jenkins, D.K., and Kung, V.T. Monoclonal antibody assay for free urinary pyridinium cross-links. *Clin.Chem.* 42(8 Pt 1):1168-1175, 1996.
- (191) Withold, W., Schallenberg, A., and Reinauer, H. Performance characteristics of different immunoassays for determination of parathyrin (1-84) in human plasma samples. *Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 33(5):307-313, 1995.
- (192) Rick, W. In: *Klinische Chemie und Mikroskopie*, Anonymous Berlin:Springer-Verlag, 1990,p. 393
- (193) Rick, W. In: *Klinische Chemie und Mikroskopie*, Anonymous Berlin:Springer-Verlag, 1990,p. 317
- (194) Rick, W. In: *Klinische Chemie und Mikroskopie*, Anonymous Berlin:Springer-Verlag, 1990,p. 293-294.
- (195) Hausamen, T.-U., Helger, R., Rick, W., and Gross, W. Optimal conditions for the determination of serum alkaline phosphatase by a new kinetic method. *Clin.Chim.Acta* 15:241-245, 1967.
- (196) Anonymous Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, Standardisierung von Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten. *Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.* 10(4):182-192, 1972.
- (197) Anonymous Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie, Standardisierung von Methoden zur Bestimmung von Enzymaktivitäten in biologischen Flüssigkeiten. *Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.* 8(6):658-660, 1970.
- (198) Persijn, J.P. and van der Slik, W. A new method for the determination of gamma-glutamyltransferase in serum. *J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 14(9):421-427, 1976.
- (199) Szasz, G. New substrates for measuring gamma-glutamyl transpeptidase activity. *Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.* 12(5):228, 1974.
- (200) Szasz, G. g-Glutamyl-Transpeptidase. In: *Methoden der enzymatischen Analyse*, edited by Bergmeyer, H.U.Weinheim:Verlag Chemie, 1974,p. 757-762.
- (201) Helger, R., Rindfrey, H., and Hilgenfeldt, J. [Direct estimation of creatinine in serum and in urine without deproteinization using a modified Jaffe method] Eine Methode zur direkten Bestimmung des Creatinins in Serum und Harn ohne Enteiweissung nach einer modifizierten Jaffe-Methode. *Z.Klin.Chem.Klin.Biochem.* 12(7):344-349, 1974.
- (202) Jaff, M.Z. *Phys.Chem.* (10):391, 1886.
- (203) Mazzaferro, S., Coen, G., Ballanti, P., Bondatti, F., Bonucci, E., Pasquali, M., Sardella, D., Tomei, E., and Taggi, F. Osteocalcin, iPTH, alkaline phosphatase and hand X-ray scores as predictive indices of histomorphometric parameters in renal osteodystrophy. *Nephron* 56(3):261-266, 1990.
- (204) Russell, R.G. The assessment of bone metabolism in vivo using biochemical approaches. *Horm.Metab.Res.* 29(3):138-144, 1997.
- (205) Brazier, M., Kamel, S., Maamer, M., Agbomson, F., Elesper, I., Garabedian, M., Desmet, G., and Sebert, J.L. Markers of bone remodeling in the elderly subject: effects of vitamin D insufficiency and its correction. *J.Bone Miner.Res.* 10(11):1753-1761, 1995.
- (206) Zang, L.Y. and Misra, H.P. Superoxide radical production during the autoxidation of 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium perchlorate. *J.Biol.Chem.* 267(25):17547-17552, 1992.
- (207) Blumsohn, A., Herrington, K., Hannon, R.A., Shao, P., Eyre, D.R., and Eastell, R. The effect of calcium supplementation on the circadian rhythm of bone resorption. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 79(3):730-735, 1994.
- (208) el Hajj Fuleihan, G., Klerman, E.B., Brown, E.N., Choe, Y., Brown, E.M., and Czeisler, C.A. The parathyroid hormone circadian rhythm is truly endogenous--a general clinical research center study. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 82(1):281-286, 1997.
- (209) Ledger, G.A., Burritt, M.F., Kao, P.C., O'Fallon, W.M., Riggs, B.L., and Khosla, S. Role of parathyroid hormone in mediating nocturnal and age-related increases in bone resorption. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 80(11):3304-3310, 1995.
- (210) Ebeling, P.R., Jones, J.D., Burritt, M.F., Duerson, C.R., Lane, A.W., Hassager, C., Kumar, R., and Riggs, B.L. Skeletal responsiveness to endogenous parathyroid hormone in postmenopausal osteoporosis. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 75(4):1033-1038, 1992.

- (211) Kagebayashi, Y., Samma, S., Yoshida, K., Ozono, S., Motomiya, Y., Hirao, Y., Fujii, Y., Kishimoto, T., Dohi, K., and Okajima, E. [Serum and urinary pyridinium cross-links in patients with predialysis chronic renal failure]. *Nippon.Jinzo.Gakkai.Shi.* 38(6):248-253, 1996.
- (212) Kabanda, A., Goffin, E., Bernard, A., Lauwerys, R., and van Ypersele de Strihou, C. Factors influencing serum levels and peritoneal clearances of low molecular. *Kidney Int.* 1995 Dec; 48(6): 1946-52, 1995.
- (213) Krediet, R.T. and Arisz, L. Fluid and solute transport across the peritoneum during continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) [editorial]. *Perit.Dial.Int.* 9(1):15-25, 1989.
- (214) Digenis, G.E., Dombros, N.V., Christophoraki, M., Grapsa, I., Savidis, N., Datseris, J., Samuilidou, E., Zerefos, N., and Tourkantonis, A. Procollagen type-I in the serum and dialysate of continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Perit.Dial.Int.* 13 Suppl 2(1991-), 1993.
- (215) Digenis, G.E., Dombros, N.V., Balaskas, E.V., Christophoraki, M., Kontessis, P., Papantoniou, V., Zerefos, N., and Tourkantonis, A. Procollagen-I and collagen-I in the serum and dialysate of CAPD patients: changes over time. *Perit.Dial.Int.* 15(8):371-374, 1995.
- (216) Blumsohn, A., Hannon, R.A., and Eastell, R. Random and seasonal variability in markers of bone turnover and bone mineral density in men and premenopausal women. *Martin, S.M. and Halloran, S.P.* Anonymous London: Proceedings of the XVI International Congress of Clinical Chemistry 1996, The Association of Clinical Biochemists, 204. :204, 1996.
- (217) Rucklidge, G.J., Riddoch, G.I., Williams, L.M., and Robins, S.P. Autoradiographic studies of the renal clearance of circulating type I collagen fragments in the rat. *Coll.Relat.Res.* 8(4):339-348, 1988.
- (218) Apone, S., Lee, M.Y., and Eyre, D.R. Osteoclasts generate cross-linked collagen N-telopeptides (NTx) but not free pyridinolines when cultured on human bone. *Bone* 21(2):129-136, 1997.
- (219) Kollerup, G., Sorensen, H.A., Hyldstrup, L., and Storm, T. Assessment of different markers of bone resorption in postmenopausal osteoporotic women treated with pamidronate. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.* 57(6):479-486, 1997.
- (220) Delmez, J.A., Slatopolsky, E., Martin, K.J., Gearing, B.N., and Harter, H.R. Minerals, vitamin D, and parathyroid hormone in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 21(6):862-867, 1982.
- (221) Delmez, J.A., Fallon, M.D., Bergfeld, M.A., Gearing, B.K., Dougan, C.S., and Teitelbaum, S.L. Continuous ambulatory peritoneal dialysis and bone. *Kidney Int.* 30(3):379-384, 1986.
- (222) Bonar, L.C., Lees, S., and Mook, H.A. Neutron diffraction studies of collagen in fully mineralized bone. *J.Mol.Biol.* 181(2):265-270, 1985.
- (223) McSheehy, P.M. and Chambers, T.J. Osteoblastic cells mediate osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 118(2):824-828, 1986.
- (224) Adami, S., Passeri, M., Ortolani, S., Brogгинi, M., Carratelli, L., Caruso, I., Gandolini, G., Gnassi, L., Laurenzi, M., Lombardi, A., and et al Effects of oral alendronate and intranasal salmon calcitonin on bone mass and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone* 17(4):383-390, 1995.
- (225) Weets, I., Gerlo, E., and Velkeniers, B. Urinary pyridinoline crosslinks in post-menopausal women with osteoporosis: correlation with other markers and effect of treatment. *Martin, S.M. and Halloran, S.P.* Anonymous London: Proceedings of the XVI International Congress of Clinical Chemistry, The Association of Clinical Biochemists, 212. :212, 1996.
- (226) Gokal, R., Ramos, J.M., Ellis, H.A., Parkinson, I., Sweetman, V., Dewar, J., Ward, M.K., and Kerr, D.N. Histological renal osteodystrophy, and 25 hydroxycholecalciferol and aluminum levels in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 23(1):15-21, 1983.
- (227) Kyeyune Nyombi, E., Lau, K.H., Baylink, D.J., and Strong, D.D. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates both alkaline phosphatase gene transcription and mRNA stability in human bone cells. *Arch.Biochem.Biophys.* 291(2):316-325, 1991.
- (228) Struijk, D.G., Krediet, R.T., Koomen, G.C., Boeschoten, E.W., Hoek, F.J., and Arisz, L. A prospective study of peritoneal transport in CAPD patients. *Kidney Int.* 45(6):1739-1744, 1994.
- (229) Kagan, A., Bar Khayim, Y., Schafer, Z., and Fainaru, M. Kinetics of peritoneal protein loss during CAPD: II. Lipoprotein leakage and its impact on plasma lipid levels. *Kidney Int.* 37(3):980-990, 1990.
- (230) Blumenkrantz, M.J., Gahl, G.M., Kopple, J.D., Kamdar, A.V., Jones, M.R., Kessel, M., and Coburn, J.W. Protein losses during peritoneal dialysis. *Kidney Int.* 19(4):593-602, 1981.
- (231) Garnero, P., Gineyts, E., Riou, J.P., and Delmas, P.D. Assessment of bone resorption with a new marker of collagen degradation in patients with metabolic bone disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 79(3):780-785, 1994.
- (232) Risteli, J., Elomaa, I., Niemi, S., Novamo, A., and Risteli, L. Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptide of type I collagen: a new serum marker of bone collagen degradation. *Clin.Chem.* 39(4):635-640, 1993.

- (233) Uebelhart, D., Gineyts, E., Chapuy, M.C., and Delmas, P.D. Urinary excretion of pyridinium crosslinks: a new marker of bone resorption in metabolic bone disease. *Bone Miner.* 8(1):87-96, 1990.
- (234) Delmas, P.D. Biochemical markers of bone turnover: methodology and clinical use in osteoporosis. *Am.J.Med.* 91(5B):59S-63S, 1991.
- (235) Ohishi, T., Kushida, K., Takahashi, M., Kawana, K., Yagi, K., Kawakami, K., Horiuchi, K., and Inoue, T. Urinary bone resorption markers in patients with metabolic bone disorders. *Bone* 15(1):15-20, 1994.

Die freien Pyridinium-Cross-links Pyridinolin (Pyd) und Deoxypyridinolin (Dpd) wurden in Serum, Dialysat und Urin von 64 terminal chronisch-niereninsuffizienten Patienten der Peritonealdialyseambulanz, Klinik für Nephrologie und Rheumatologie, Medizinische Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit einem Immunoassay bestimmt. Das Ziel war die Untersuchung, Einschätzung und Beurteilung des Knochenstoffwechsels von Peritonealdialysepatienten sowie die Erstellung von Datenmaterial und Konzepten für zukünftige Untersuchungsverfahren. Die Cross-links wurden im Hinblick auf Entstehung, Ausscheidung und Kreatinin-Clearance sowie in Bezug auf die konventionellen Knochenstoffwechselfparameter Parathormon, Knochendichte, 25(OH)-Vitamin-D₃, 1, 25(OH)₂-Vitamin-D₃, alkalische Knochenphosphatase und ionisiertes Calcium untersucht.

Pyd und Dpd wurden gleichzeitig in Serum, Dialysat und Urin mit einem Immuno-Assay nachgewiesen. Die Wiederauffindungsraten im Aufstockungsversuch (n=6) für Pyd und Dpd mit Standard F (750 nmol/l) im Serum waren $95,5 \pm 6,4$ % ($x \pm SD$).

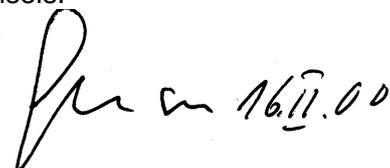
Es besteht ein zirkadianes Ausscheidungsmuster der Cross-links in die Dialysatflüssigkeit. Der Zeiteffekt ($p < 0,05$) war signifikant im Gesamtvergleich über die Dialysatproben A, B, C (n=59) mit $p=0,018$, über die Dialysatproben A, B, C, D (n=58) mit $p=0,045$ und über die Dialysatproben A, B, C, D, E (n=25) mit $p=0,003$. Das chronobiologische Verhalten ist auf Serum übertragbar. Daraus folgt eine zeitpunktorientierte Diagnostik morgens und eine Therapie abends.

Die Filtrationskapazität des Peritoneums für die Cross-links und Kreatinin entspricht sich. Die Clearances von Cross-links und Kreatinin im Dialysat korrelierten signifikant miteinander, $r=0,559$, $p=0,0001$, $n=67$. Es besteht kein Hinweis auf eine Autoproduktion der Cross-links an der Peritonealmembran. Die Beurteilung der Cross-links im Serum, vor und nach Bezug auf den zugehörigen Kreatininwert im Serum, erlaubt eine Unterscheidung zwischen Retention und Resorption.

Die Cross-links im Serum besitzen eine größere diskriminatorische Fähigkeit als die Cross-links in Dialysat oder Urin. Die Cross-links im Serum waren gegenüber dem Anteil im Dialysat um das 2,9-fache und gegenüber dem Anteil im Urin um das 1,9-fache erhöht. Die freie Fraktion der Cross-links stellt nicht das Ergebnis einer veränderten Peptiddegradation im Nierengewebe dar.

Die Cross-links im Serum, PTH und die Knochendichte von kortikalem Knochen als T-Score weisen auf eine gesteigerte Knochenresorption hin. PTH war mit $22,8 \pm 26,2$ pmol/l (n=79) um das 3-fache des oberen Normwertes erhöht. PTH korrelierte signifikant mit den Cross-links im Serum, als Konzentration mit $r=0,38$, $p=0,003$, $n=80$ und als kreatininkorrigierte Menge mit $r=0,271$, $p=0,020$, $n=73$. Die erniedrigten Knochendichteparameter für den Femurhals und die Serumkonzentration der Cross-links zeigten eine signifikant negativ-lineare Korrelationen mit $r=-0,310$, $p=0,029$, $n=50$, $r=-0,330$, $p=0,017$, $n=52$ sowie $r=-0,304$, $p=0,028$, $n=52$, respektive.

25(OH)-Vitamin-D₃, 1, 25(OH)₂-Vitamin-D₃, alkalische Knochenphosphatase und ionisiertes Calcium eignen sich aufgrund ihrer fehlenden diskriminatorischen Eigenschaften und den mangelhaften Korrelationen nicht für die Bewertung des Knochenstoffwechsels.



Nathalie Pausner 16.11.00