

Aus der Klinik für Strahlentherapie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. B. Kimmig)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Beurteilung des Einflusses von Zoledronsäure auf die
Strahlentherapie induzierte Kollagenzerstörung
gemessen an den biochemischen Markern
Hydroxylysylpyridinolin (HP) und
Lysylpyridinolin (LP)**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Milica Reutemann

aus Vršac (Serbien)

Kiel 2009

1. Berichterstatter: PD Dr. P. Niehoff

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Y. Açil

Tag der mündlichen Prüfung: 29. Oktober 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 29. Oktober 2009

gez.: Prof. Dr. Dr. B. Kimmig

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	iii
2	Einleitung	1
2.1	Knochenmetastasen	1
2.1.1	Inzidenz, Ätiologie, Diagnostik	1
2.1.2	Therapie der Knochenmetastasen	2
2.2	Knochen	7
2.2.1	Funktion, Entwicklung und Aufbau	7
2.2.2	Kollagene	9
2.3	Fragestellung	12
3	Material und Methoden	13
3.1	Aufgabenstellung und Studienaufbau	13
3.1.1	Studiendesign	13
3.1.2	Ein- und Ausschlusskriterien	13
3.1.3	Behandlungsablauf und Probenentnahme	14
3.1.4	Patientendaten	16
3.1.5	Bestrahlung	17
3.1.6	Bisphosphonate	17
3.2	Materialien	18
3.2.1	Chemikalien	18
3.2.2	Geräte	19
3.2.3	Sonstige verwendete Materialien	19
3.3	Methodik	19
3.3.1	Allgemeines	19
3.3.2	Lyophilisieren der Proben	20
3.3.3	Hydrolyse der Proben	20
3.3.4	Vorbereitung des CF-1 Säulenmaterials	21
3.3.5	Adsorptionschromatographische Vorreinigung	21

3.3.6	Analyse der Proben durch HPLC	22
3.3.7	Normierung der Pyridinolin-Konzentrationen	23
3.4	Statistische Auswertung	24
4	Ergebnisse	25
4.1	Analyse mittels HPLC	25
4.1.1	Analyse der externen Standards	25
4.1.2	Analyse der Proben	27
4.2	Ergebnisse der HPLC-Analyse	31
4.2.1	Trendanalyse	32
4.2.2	Gruppenvergleich	35
4.2.3	Gesamtdosisanalyse	36
5	Diskussion	38
6	Ausblick	43
7	Zusammenfassung	44
8	Literaturverzeichnis	46
9	Anhang	59
9.1	HP-Werte aller Patienten	59
9.1.1	Gruppe A	59
9.1.2	Gruppe B	60
9.2	LP-Werte aller Patienten	61
9.2.1	Gruppe A	61
9.2.2	Gruppe B	62
10	Danksagung	63
11	Lebenslauf	64

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
A. dest.	Aqua destillata
BAP	Bone alkaline phosphatase, knochenspezifische alkalische Phosphatase
C	Kohlenstoff
Ca	Kalzium
CF	Fibröse Zellulose
CT	Computertomographie
CTX	C-Telopeptid einer α-Kette
CUP	Cancer of unknown primary
dl	Deziliter
ED	Einzel dosis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fe	Eisen
GD	Gesamtdosis
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Gy	Gray
HCl	Salzsäure
HFBA	Heptafluorbuttersäure
HP	Hydroxylysylpyridinolin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICTP	C-Telopeptid des Kollagens Typ I
IL	Interleukin
l	Liter
LP	Lysylpyridinolin
M	molar
max.	maximal
M-CSF	Macrophage-Colony-Stimulating-Factor
MeV	Megaelektronenvolt
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
MRT	Magnetresonanztomographie
mV	Millivolt
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
n.s.	nicht signifikant
NTX	N-Telopeptid
OQ	oberes Quartil

PICP	procollagen I carboxy-terminal propeptide, Prokollagen I Extensionspeptid, C-terminales Ende
PINP	procollagen I N-terminal propeptide, Prokollagen I Extensionspeptid, N-terminales Ende
pmol	Pikomol
PTHrP	parathyroid hormone-related peptide
s	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
sog.	sogenannt
TGF- β	Tumor-Growth-Factor-Beta
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha
UQ	unteres Quartil
vs.	versus
\bar{x}	Mittelwert (arithmetisches Mittel)
z. B.	zum Beispiel

2 Einleitung

2.1 Knochenmetastasen

2.1.1 Inzidenz, Ätiologie, Diagnostik

Das Skelett ist neben Leber und Lunge am häufigsten von Metastasenbildung betroffen. Knochenmetastasen stellen also eine wichtige Komplikation vieler Tumorerkrankungen dar [21, 53, 63, 90]. Der Anteil der Skelettmetastasen an der Gesamtheit aller Karzinome schwankt zwischen 13,1 % und 33,4 % [21]. Mit ca. 60 % sind Knochenmetastasen die häufigste Indikation zur palliativen Strahlenbehandlung [90]. Der Anteil von Skelettmastasen am Gesamtgut aller bestrahlten Patienten liegt dabei zwischen 10 % und 20 % [5, 11, 54].

Knochenmetastasen entstehen durch hämatogene Tumorzell dissemination in das Knochenmark und sind genau genommen Metastasen des Knochenmarks [30, 53]. Die Häufigkeit von Skelettmastasen variiert in Abhängigkeit vom Primärtumor. Am häufigsten finden sich Skelettmastasen beim Mammakarzinom (50 % – 85 %), Prostatakarzinom (50 % – 75 %), Bronchial- und Nierenzellkarzinom (30 % – 50 %) [11, 30].

Nach heutigem Kenntnisstand wirken bestimmte vom Knochen freigesetzte Hormone und Wachstumsfaktoren (z. B. Interleukin-6 (IL-6), tumor-growth-factor- β (TGF- β)) chemotaktisch auf zirkulierende Tumorzellen [21, 42, 63]. So werden durch osteoklastären Abbau der Knochenmatrix Matrixbestandteile, vor allem Abbauprodukte des Kollagens Typ I oder des Bone-Sialoproteins, freigesetzt, die zirkulierende Tumorzellen anlocken und ihr Wachstum im Knochenmark anregen [63]. Tumorzellen selbst sind wiederum in der Lage Hormone, z. B. das parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) und Zytokine (IL-1, IL-8, IL-11, tumor-necrosis-factor- α (TNF- α), macrophage-colony-stimulating-factor (M-CSF)) zu produzieren oder ihre Bildung durch Makrophagen anzuregen und dadurch die Tätigkeit der Osteoklasten zu stimulieren [11, 20, 21, 29, 30, 42, 50, 51, 63, 86]. Auf diese Weise können die im Knochenmark wachsenden Tumorzellen die Skelett- und Kalziumhomöostase stören und sekundäre Knochenveränderungen hervorrufen, die als Tumorosteopathien bezeichnet werden.

Der Metastasierungsprozess im Skelett durchläuft mehrere Phasen, von denen nur die letzte klinisch in Erscheinung tritt. Es wird zwischen der frühen Invasion (Dissemination,

Tumorzelladhäsion), der Extravasation mit Bildung von Mikrometastasen (subklinisch) und den Makrometastasen mit Osteopathie (klinisch) unterschieden [30]. Tumorzellen werden früh im Verlauf einer Tumorkrankheit in das Knochenmark eingeschwemmt. Der Zeitraum zwischen der hämatogenen Tumorzelleinschwemmung in das Knochenmark und dem Auftreten klinischer Symptome ist variabel und kann zwischen Wochen und Jahren liegen [11, 30].

Knochenmetastasen imponieren als solitäre Herde sowie als multiple oder diffuse Metastasen. Es wird zwischen osteolytischen, osteoblastischen und gemischtformigen Knochenmetastasen unterschieden [21, 30].

Die Folge der tumorinduzierten Umbau- und Zerstörungsprozesse des Skeletts sind zu meist Knochenschmerzen (50 % – 90 %) und pathologische Frakturen (10 % – 40 %). Bei einem massiven pathologischen Knochenabbau kann zudem eine Hyperkalzämie entstehen (10 % – 20 %). Weitere mögliche Komplikationen sind spinale Kompressionssyndrome und Knochenmarkskarzinose (< 10 %) [11, 16, 21, 71, 91].

Die Diagnostik der Knochenmetastasen ist eng an die Phasen des Metastasierungsprozesses gebunden [30]. Die bildgebenden Verfahren erfassen die Tumorosteopathie, wenn ausreichende Veränderungen der Knochenstruktur oder des Mineralsalzgehaltes entstanden sind; sie erfassen jedoch nicht das im Markraum wachsende Tumorgewebe der Mikrometastasen. Eine individuelle Kombination aus klinischer Symptomatik, bildgebenden Verfahren (Röntgenaufnahmen, Skelettszintigraphie, Computer- und Magnetresonanztomographie) und ergänzenden Laboruntersuchungen (Calcium, alkalische Phosphatase und evtl. spezifische biochemische Marker des Knochenabbaus, wie z. B. HP und LP) führt in den meisten Fällen zur Diagnose [29, 30, 48].

2.1.2 Therapie der Knochenmetastasen

Die Therapie der Knochenmetastasen ist eine multimodale Therapie und richtet sich in erster Linie nach der klinischen Symptomatik. Dabei stehen die Behandlung der Schmerzsymptomatik und die Wiederherstellung der Skelettfunktion im Vordergrund [11, 86]. Zum Einsatz kommen neben chirurgischen Maßnahmen (z. B. bei pathologischen Frakturen, drohender Spinalkompression durch Befall von Wirbelkörpern) vor allem strahlentherapeutische und supportive (medikamentöse) Maßnahmen [21, 48].

2.1.2.1 Strahlentherapie von Skelettmastasen

Die Strahlentherapie von Knochenmetastasen ist indiziert:

1. zur Analgesie,
2. bei osteolytischen Metastasen zur Stabilisierung frakturgefährdeter oder bereits frakturerter Knochenareale (Rekalzifizierung) und
3. zur Abtötung von Tumorzellen mit dem Ziel der Verkleinerung der Tumormasse (z. B. Verhinderung oder Rückbildung einer Kompression des Myeloms) [21].

Im Allgemeinen werden zwei Fraktionierungsmuster verwendet: zum einen die konventionelle Fraktionierung mit fünf mal 2 Gy bis 3 Gy Einzeldosis pro Woche bis zu einer Gesamtdosis von 30 Gy bis 40 Gy in zwei bis vier Wochen, zum anderen eine stark akzelerierte Fraktionierung mit fünf mal 4 Gy bis einmal 8 Gy in maximal einer Woche [11, 21, 48, 53, 54, 90]. Die Wahl der Dosierung und Fraktionierung richtet sich nach der Prognose und dem therapeutischen Ziel.

Der schmerzlindernde Effekt der Strahlentherapie ist in weiten Grenzen dosisunabhängig [11, 21, 48, 53, 54, 90]. In etwa 70 % bis 90 % der Fälle kann eine Schmerzlinderung, in 30 % bis 60 % eine Schmerzfreiheit erzielt werden. Der analgetische Effekt tritt dabei in der Regel nach einer bis drei Wochen ein und ist unabhängig von der Tumorphistologie [11, 21, 48, 53, 54, 86, 90]. Bei palliativen Patienten mit eingeschränkter Prognose, bei denen die Schmerzbehandlung im Vordergrund steht, ist eine Kurzzeitbestrahlung mit hohen Einzeldosen (etwa mit einmal 8 Gy) gerechtfertigt.

Anders verhält es sich mit der Rekalzifizierung, der Stabilisierung des Knochens nach Radiotherapie. Im Gegensatz zur Analgesie ist die Remineralisation dosisabhängig. Mehrere retrospektive Studien konnten zeigen, dass hinsichtlich der Remineralisation ein konventionell fraktioniertes Therapieschema dem Kurzzeitschema überlegen war [11, 21, 53, 54]. Neben der Fraktionierung spielen die Tumorphistologie (höchste Rekalzifizierungsrate beim Mamma- und Prostatakarzinom, bis zu 70 %), das Ausmaß der Metastasierung (solitär vs. multipel) und der Ort der Metastasierung (Wirbelsäule und Becken remineralisieren besser als Extremitäten, 60 % vs. 40 %) eine wichtige Rolle bei der Ausprägung der Remineralisation [11, 21, 53, 54, 72, 90]. Ein klinisch relevanter Stabilisierungseffekt tritt dabei im Durchschnitt erst zwei bis drei Monate nach der Strahlentherapie ein [11, 21, 53, 54, 90].

Die Folgen der radiogenen Exposition an Knochen hängen von Energie, Dosis, Applikationsform und Art der Strahlung ab [31, 80, 94]. Die Bestrahlung von metastatisch befallenen Knochen führt zunächst zu einer Degeneration und Nekrose von Tumorzellen. Diese werden anschließend durch proliferierendes Bindegewebe ersetzt, welches im weiteren Verlauf mineralisiert und langsam zu vollwertigem Knochen stabilisiert wird [11, 21, 54, 94]. Dieser Vorgang kann, wie oben beschrieben, mehrere Monate dauern. Voraussetzung hierfür sind funktionsfähige Osteoblasten. Aus radiobiologischer Sicht gelten im adulten Knochen die Osteoblasten und die Osteoklasten als Zielzellpopulation; die Osteoklasten sind dabei weniger strahlensensibel als die Osteoblasten [21, 31, 94]. Eine Schädigung der Osteoblasten, die sich in einer gestörten Mineralisation und einer unkontrollierten Resorption des Knochens durch Osteoklasten äußert, kann bereits ab einer Gesamtdosis von 30 Gy eintreten. Ab einer Gesamtdosis von 50 Gy kann es beim gesunden Knochen zu einer irreversiblen Schädigung und einem Untergang der Osteoblasten kommen [31, 54, 94]. Es gibt jedoch Untersuchungen, die zeigen, dass die Toleranz des metastatisch befallenen Knochens deutlich niedriger als die des gesunden Knochens angesetzt werden muss. Sie reduziert sich bei manifester Knochenmetastasierung von 50 Gy auf 42 Gy [54].

Am reifen Knochen können sich mehrere pathologische Ereignisse manifestieren. Diese reichen von einer leichten Osteopenie bis zu einer Osteoradionekrose und pathologischen Frakturen. Diese Veränderungen treten meist erst Monate oder Jahre nach Abschluss der Strahlentherapie auf und sind durch einen gestörten Mineralgehalt und eine veränderte Mikrostruktur des Knochenaufbaus gekennzeichnet [18, 31, 62, 80, 94].

In den letzten Jahren wurden in-vitro- und in-vivo-Untersuchungen durchgeführt, die anhand von Messungen von biochemischen Markern des Kollagenabbaus (HP und LP sowie Hydroxyprolin) zeigen konnten, dass es unter Bestrahlung zu einer direkten Zerstörung der extrazellulären Matrix und des Kollagens im Knochen kommt, was zu einer erhöhten Fragilität des Knochens direkt nach der Bestrahlung führen kann [41, 65, 82]. Dies und die verzögerte Remineralisation nach Bestrahlung könnten eine Erklärung dafür sein, warum es gelegentlich unmittelbar nach der Bestrahlung gehäuft zu Frakturen des Knochens kommt [9, 56, 65, 86].

2.1.2.2 Bisphosphonattherapie

Zur Schmerzreduktion und Rekalzifizierung bei der Behandlung von Knochenmetastasen kommen neben der Strahlentherapie auch systemische Therapieformen zum Einsatz. Neben einer Hormon- bzw. Chemotherapie spielt in den letzten Jahren vor allem die Bisphosphonattherapie eine immer wichtigere Rolle [9, 21, 31, 71, 74, 75, 77, 91].

Das therapeutische Potential der Bisphosphonate umfasst die Antiosteolyse, die Osteoprotektion und die Prävention. Antiosteolyse bedeutet in diesem Zusammenhang die Hemmung einer fortschreitenden Skelettzerstörung durch Tumormetastasen. Osteoprotektion meint den Schutz des Skelettes vor einer tumorinduzierten Destruktion. Die Prävention ist die Fähigkeit die Entwicklung von Knochenmetastasen zu verhindern oder zu verzögern. Diese Effekte konnten in mehreren klinischen Studien mit verschiedenen Bisphosphonaten eindrücklich nachgewiesen werden und rechtfertigen ihren möglichst frühen Einsatz im Verlauf einer Tumorerkrankung. Besonders potent scheint dabei das Bisphosphonat Zoledronsäure zu sein [9, 27, 36, 71, 74, 75, 77, 91].

Bisphosphonate sind eine Klasse von Arzneimitteln mit ausgeprägter osteotroper Wirkung. Sie sind stabile Analoga der natürlich vorkommenden Pyrophosphate, die in biologischen Flüssigkeiten die Bildung und Auflösung von Kalziumphosphatkristallen hemmen, jedoch nur eine sehr kurze Halbwertszeit haben [21, 30, 71, 73, 91].

Im Gegensatz zu den Pyrophosphaten (P-O-P-Bindung) weisen die Bisphosphonate eine P-C-P-Bindung als zentrale chemische Struktur auf. Diese Bindung ist resistent gegenüber enzymatischer Spaltung und sehr stabil gegenüber Hitze sowie den meisten chemischen Reagenzien. Die Bisphosphonate werden im Körper nicht weiter metabolisiert und werden fast unverändert ausgeschieden [9, 16, 30, 36, 66, 71, 91]. Angenommen wird, dass die P-C-P-Gruppe für die hohe Affinität der Bisphosphonate zum Mineral des Knochens verantwortlich ist und ihre spezifische Wirkung auf den Knochen erklärt [30]. Die hemmende Wirkung auf die Knochenresorption und auch die Toxizität ist durch die Seitenketten am Kohlenstoffatom bedingt. Die klinisch angewendeten Bisphosphonate unterscheiden sich vornehmlich durch Änderung der beiden Seitenketten am Kohlenstoffatom [30].

Die Hauptwirkung der Bisphosphonate ist die Hemmung der Knochenresorption. Der genaue Mechanismus ist dabei noch nicht vollständig geklärt; zudem unterscheiden sich die Wirkmechanismen der einzelnen Präparate. Durch die Bindung an die Oberfläche der mineralisierten Knochenmatrix, vor allem in Zonen des Knochenumbaus, reduzieren die

Bisphosphonate zum einen die Löslichkeit des Hydroxylapatits, zum anderen hemmen sie die Anlagerung von Osteoklasten und – wie in einigen (in-vitro-) Versuchen gezeigt werden konnte – auch die Anlagerung von Tumorzellen [16, 20, 31, 71, 73, 91]. Entscheidend für die Hemmung der Knochenresorption scheinen jedoch Angriffspunkte auf zellulärer und molekularer Ebene zu sein. Zielzellen der Bisphosphonatwirkung sind die Osteoklasten, aber auch osteoblastäre Zellen und Makrophagen. Die Wirkung auf die Osteoklasten besteht in einer Verminderung der Aktivität und der Anzahl der Zellen. Werden im Rahmen des Knochenumbaus die Bisphosphonate von den Osteoklasten aufgenommen, so kommt es zu einer Verminderung der zellulären Leistung, wie etwa der Proteinsynthese oder Verminderung der Säureproduktion und Hemmung der Enzymaktivität. Daneben greifen Bisphosphonate in die Differenzierung der Osteoklasten aus ihren Vorläuferzellen (Recruitment) ein und beschleunigen die Apoptose, den programmierten Zelltod [16, 31]. Die Hemmung des Recruitments aus Vorläuferzellen, den Makrophagen, erfolgt auch indirekt über eine Hemmung der Osteoblasten-vermittelten Osteoklastenaktivierung.

Laborchemisch führt die verminderte Aktivität und Anzahl der Osteoklasten zu einer verminderten Ausscheidung von Knochenabbauprodukten, wie etwa den Pyridinolin-Crosslinks (z. B. HP und LP) und zu einer Senkung des Kalziumspiegels im Serum, insbesondere bei der Hyperkalziämie [30, 70, 71, 91].

Bisphosphonate können in oraler und intravenöser Form verabreicht werden. Die Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe ist sehr gering und schwankt zwischen 0,5 % und 5 % [31]. Nach intravenöser Applikation werden die Bisphosphonate sehr schnell eliminiert, die größte Menge wird dabei vom Knochen aufgenommen. Innerhalb des Skeletts werden Regionen mit erhöhtem Turnover bevorzugt. Wenn durch die Osteoklastenenzyme eine Ansäuerung erfolgt, werden die Bisphosphonate aus dem Knochen freigesetzt. Die Halbwertszeit im Skelett kann dabei zehn Jahre und mehr betragen [31]. Generell hat die akute, subakute und chronische Verabreichung der Bisphosphonate wenig Nebenwirkungen. Ursächlich hierfür ist die schnelle Anlagerung an kalzifiziertes Gewebe und die damit verbundene geringe Verweildauer in der systemischen Zirkulation. Beschwerden treten, wenn überhaupt, nach ca. 24 bis 48 Stunden auf und äußern sich bei den meisten Patienten in Grippe-ähnlichen Symptomen wie Fieber, Arthralgien, Myalgien und Knochenschmerzen, Müdigkeit, gastrointestinalen Symptomen sowie Anämie, Dyspnoe oder Ödemen [9, 31, 36, 66, 70, 71, 74, 75, 77, 91, 95].

Eine schwerwiegende Nebenwirkung der Bisphosphonattherapie, die erst in den letzten Jahren vermehrt beschrieben wurde, ist die Osteonekrose des Kiefers. Die genaue Inzidenz ist unbekannt. Die Angaben schwanken je nach Literatur zwischen 0,8 % und 12 % [10, 45, 57, 58, 76]. Der zugrundeliegende Pathomechanismus ist ebenfalls noch ungeklärt. Vermutet wird, dass die Bisphosphonat vermittelte Verminderung des Knochenumsatzes und die Hemmung der Gefäßneubildung im Kieferknochen zu einer Kiefernekrose führen können [44]. In mehreren retrospektiven Untersuchungen konnte eine invasive Zahnbehandlung (Extraktion, chirurgische Intervention am Kiefer) bzw. Schleimhautschäden durch Prothesendruckstellen oder akzidentelle Schleimhauverletzungen als unmittelbarer Auslöser der Kiefernekrose identifiziert werden [24, 44, 45, 52, 57, 58, 64]. Als weitere Risikofaktoren gelten vor allem die intravenöse Verabreichung der Bisphosphonate und die Dauer der Therapie (meist länger als sechs Monate) [52, 57, 58, 61, 64, 93]. Die Therapie der Kiefernekrose ist stadienabhängig und reicht von täglichen Mundspülungen bis hin zu chirurgischen Interventionen [76].

2.2 Knochen

2.2.1 Funktion, Entwicklung und Aufbau

Der Knochen erfüllt wichtige Funktionen im menschlichen Körper, die dem Erhalt des Gesamtorganismus dienen. Er hat Stützfunktion für den Körper, für innere Organe, ist der Ursprung der Hämatopoese und der Ort der Ausreifung von Immunzellen und stellt das wichtigste Mineralreservoir da [23, 31, 32, 46].

Knochengewebe entwickelt sich aus zwei Vorstufen, einer bindegewebigen und einer knorpeligen. Die direkte Knochenbildung aus Bindegewebe oder Mesenchym wird als desmale Ossifikation bezeichnet, das so gebildete Gewebe heißt Bindegewebsknochen. Die desmale Ossifikation ist im Embryonalstadium zu finden, z. B. beim Schädelknochen, bei den meisten Knochen des Gesichtsschädels und beim Schlüsselbein. Die indirekte Entstehung von Knochen aus einem knorpeligen Vorstadium erfolgt durch chondrale Ossifikation. Dabei werden die aus Knorpel vorgeformten Skelettanteile allmählich aufgelöst und durch Knochen ersetzt, daher die Bezeichnung Ersatzknochen. Bei kurzen Skelettstücken beginnt die Verknöcherung von Innen her (enchondrale Ossifikation), bei langen Skelettanteilen bildet sich um die Schaftmitte eine knöcherne Hülse (perichondrale Ossifikation). Ein typisches

Beispiel für die chondrale Ossifikation sind die langen Röhrenknochen. Die chondrale Ossifikation, vor der Geburt der Hauptanteil der Knochenbildung, tritt im späteren Leben immer mehr zurück. Beim Erwachsenen findet sich die enchondrale Knochenbildung praktisch nur noch bei Frakturheilungsprozessen [32].

Makroskopisch lässt sich im Knochen die Kompakta (= Kortikalis) von der Spongiosa unterscheiden. Bei der Kompakta handelt es sich um dicht gepackte Knochensubstanz ohne Einschluss von größeren mineralfreien Arealen; die Spongiosa besteht aus mehr oder weniger lockeren Bälkchen. Die Ausdrücke Kompakta und Spongiosa bezeichnen zwar die Anordnung der Knochensubstanz, sagen aber nichts über deren Herkunft und Zusammensetzung aus [32].

Aus biochemischer Sicht besteht der Knochen eines ausgewachsenen Menschen aus drei wesentlichen Kompartimenten [23, 30, 32, 46], nämlich:

- den stoffwechselaktiven Zellen (Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten und blutbildende Zellen);
- zu 20 % aus der extrazellulären, organischen Knochenmatrix (90 % Kollagen Typ I, 10 % nicht-kollagene Proteine (Proteoglykane und Glycoproteine sowie Fette)). Die organische Knochenmatrix ist für die Elastizität des Knochens verantwortlich;
- zu 80 % aus calciumreichem, anorganischem Knochenmineral (95 % Calciumverbindungen wie Ca-Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), Ca-Carbonatapatit und 5 % andere Mineralien (Carbonate, Fluorid, Magnesium, Kalium, Eisen, Chlor)). Dieses ist für die Stabilität des Knochens verantwortlich.

Die Verbundstruktur von organischen und anorganischen Komponenten bestimmt die mechanischen Eigenschaften des Knochengewebes. Die Kollagenfasern übernehmen dabei in erster Linie die Zugkräfte. Sie sind damit für die Elastizität des Knochens verantwortlich, während der Mineralanteil dem Gewebe die Eigenschaft verleiht, Druckkräfte aufzunehmen und somit die Stabilität des Knochens gewährleistet. Dabei erreicht die Zugfestigkeit etwa zwei Drittel der Druckfestigkeit [32].

Die Osteoblasten sind für die Knochenbildung verantwortlich, sowohl für die Synthese der Komponenten der Knochenmatrix als auch für die Mineralisierung. Bei der Produktion von Osteoid werden einzelne Osteoblasten eingeschlossen und kollagene Fasern der Umgebung ebenfalls eingemauert [32].

Die Osteoklasten entstammen nicht der Linie der mesenchymalen Zellen wie die Osteoblasten. Sie sind Abkömmlinge des hämatopoetischen Systems, wobei Monozyten als Vorläufer gelten. Osteoklasten bewirken die Demineralisierung des Knochens und die Resorption der Knochenmatrix [23, 32, 46].

Unter physiologischen Bedingungen stehen Knochenaufbau- und Knochenabbauvorgänge in einem Fließgleichgewicht. Dies garantiert den Erhalt einer stabilen Knochenmasse. Der Knochen wird ständig remodelliert um sich den ändernden Anforderungen an die Stützfunktion des Skeletts anzupassen [10, 23, 32]. Das Auftreten von Knochenmetastasen kann zu einer Störung dieses Gleichgewichts führen [30, 50, 63].

2.2.2 Kollagene

Kollagen ist ein wesentlicher Bestandteil der extrazellulären Matrix von Binde- und Stützgeweben (Knochen und Knorpel). Die Familie der Kollagene stellt eine heterogene Gruppe von Proteinen dar und macht ca. 25 % – 30 % des gesamten Proteingehalts des menschlichen Organismus aus [23, 32, 46]. Zusammen mit dem Elastin und Keratin zählt wird es zu den Sklero- oder Gerüstproteinen gezählt. Bislang sind mindestens 19 biochemisch und strukturell unterschiedliche Kollagentypen bekannt [46].

Im menschlichen Körper kommt Kollagen Typ I, ein fibrilläres Kollagen, mit einem Anteil von 90 % vor [6, 49]. Es ist der wichtigste Faserbestandteil von Knochen und Haut, aber auch von Sehnen, Bändern, Faserknorpel, Hornhaut und Dentin. Es wird von spezialisierten Zellen, bevorzugt von Fibroblasten, aber auch von Chondroblasten, Osteoblasten und glatten Muskelzellen gebildet. Die Kollagen Typ I Fasern sind besonders zugfest und verleihen dem Gewebe, z. B. Knochen, eine hohe mechanische Widerstandskraft. Diese ist abhängig von der Menge, der Anordnung und der Quervernetzung der kollagenen Fasern [32].

Die Primärstruktur des Kollagens ist eine Polypeptidkette, unabhängig vom Kollagentyp. Diese besteht aus der Aminosäuresequenz $(\text{Glycin-x-y})_n$. Dabei stehen x und y für jede beliebige Aminosäure, wobei an der Position x meist Prolin (in ca. 12 % aller Fälle), an der Position y meist Hydroxyprolin (in ca. 10 % aller Fälle) stehen. Jede dritte Position der Polypeptidsequenz muss mit Glycin besetzt sein. Sobald Glycin durch eine andere Aminosäure ersetzt wird kommt es zu einer Störung der späteren Trippelhelixstruktur des Kollagens. Die Synthese der einzelnen Polypeptidketten erfolgt an den membran-

gebundenen Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums. Bereits während der Synthese am Ribosomen finden Hydroxylierungsaktionen statt. Dabei werden Prolin- und Lysinreste der Polypeptidketten durch spezifische Hydroxylasen in entsprechende Hydroxyverbindungen überführt, was für die Stabilisierung der späteren Trippelhelix von Bedeutung ist. Die Hydroxylase ist ein Enzym das zur Gruppe der Monooxygenasen gehört und Sauerstoff, Ascorbinsäure, Fe^{2+} und α -Ketoglutarat als Cofaktor benötigt. Störungen der Kollagenbiosynthese können bei Sauerstoff- bzw. bei Vitamin-C-Mangel eintreten. Manche Hydroxylysinreste werden anschließend noch mit Disacchariden aus Galaktose und Glukose glykosiliert. Am Ende des Syntheseprozesses liegen die Polypeptidketten als sog. Pro- α -Ketten im endoplasmatischen Retikulum vor und sind mit N- und C-terminalen Propeptiden versehen. Durch Ausbildung von Disulfidbindungen zwischen den C-terminalen Propeptiden wird die Trippelhelixbildung eingeleitet. Jeweils drei Pro- α -Ketten formieren dabei über Wasserstoffbrücken ein dreisträngiges Helixmolekül, das sog. Prokollagen. Am N- und C-terminalen Ende enthält das Prokollagenmolekül nichthelikale Peptidbereiche, sog. Telo peptide, die für die Quervernetzung der Moleküle verantwortlich sind. Das Prokollagen wird nun durch Exozytose mittels sekretorischer Vesikel in den Extrazellulärraum ausgeschleust. Im Extrazellulärraum spalten spezifische Peptidasen die Propeptide am Prokollagenmolekül ab und es entsteht das sog. Tropokollagen. Anschließend lagern sich Tropokollagenmoleküle parallel zusammen und bilden Primärfilamente. Dabei sind benachbarte Moleküle nicht bündig angeordnet, sondern um 67 nm, d. h. um etwa ein Fünftel ihrer Länge gegeneinander versetzt. Mehrere Primärfilamente bilden anschließend die sog. Mikrofibrillen. Im letzten Schritt erfolgt die Stabilisierung der Fibrillen durch Quervernetzung von Tropokollagenmolekülen. Diese entstehen durch intra- und intermolekulare kovalente Bindungen zwischen Lysin- und Hydroxylysinresten. Die Bindungen entstehen durch ein Enzym des Extrazellulärraums, der Lysyloxidase, welches durch Oxidation der Lysin- und Hydroxylysinreste die entsprechenden Aldehyde bildet. Durch erneute Reaktion mit Lysin- oder Hydroxylysinresten entstehen difunktionelle intramolekulare Quervernetzungs-komponenten, die mit benachbarten Kollagenmolekülen spontan tri- und tetrafunktionelle intermolekulare Vernetzungen bilden [23, 32, 46]. Vertreter dieser trifunktionellen Quervernetzungen, sog. Crosslinks des reifen Kollagens (Pyridinoline), sind das Hydroxylylsylpyridinolin (HP) und das Lysylpyridinolin (LP). Die chemische Struktur von HP und LP ist in Abbildung 1 dargestellt.

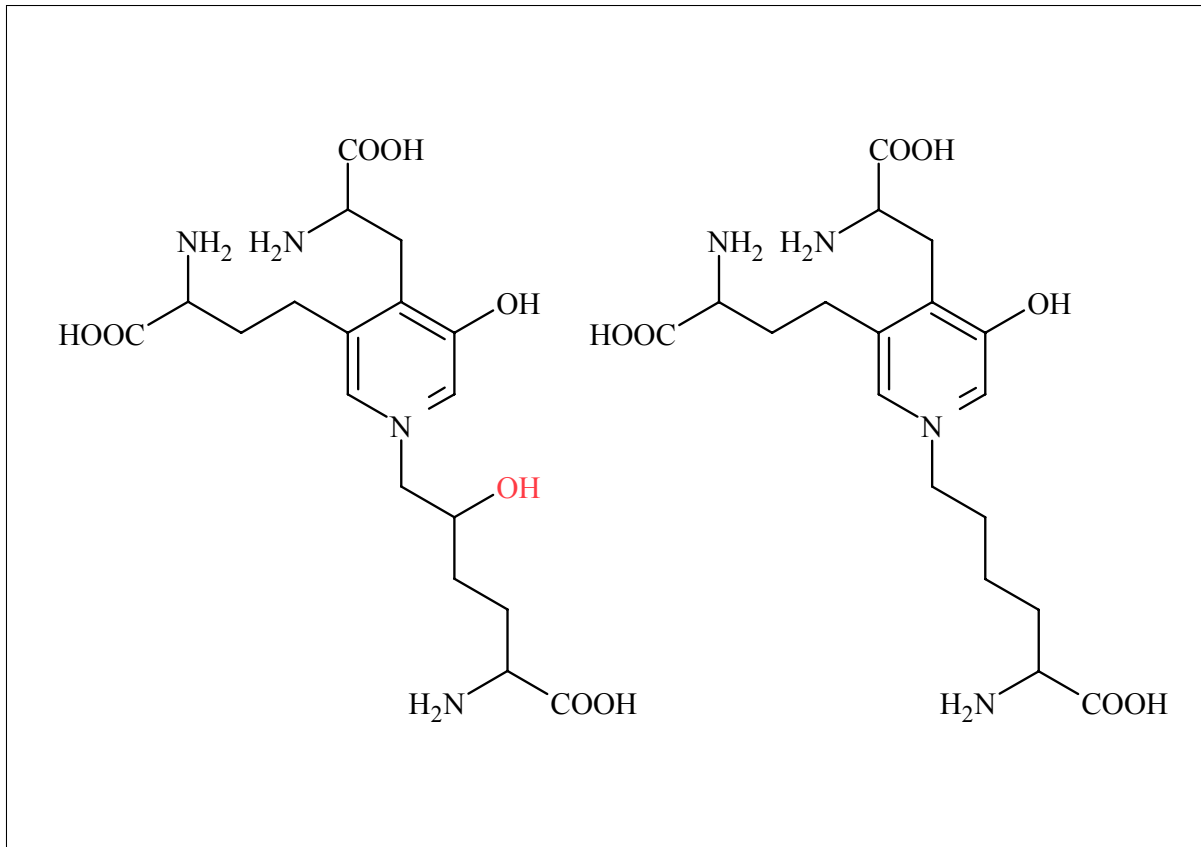


Abbildung 1: Chemische Struktur von HP (links) und LP (rechts).

Sowohl HP als auch LP kommen im Knochen vor. Während HP außer im Knochen auch in Knorpel, Sehnen und Blutgefäßen vorhanden ist, ist LP fast ausschließlich im Knochen und im Dentin zu finden [1, 3, 12, 13, 47, 65, 67, 82, 83, 85]. Weder HP noch LP sind in der Haut zu finden. Bei Abbau des Kollagens im Knochen (z. B. bei ossären Metastasen) werden diese Quervernetzungen freigesetzt. Im Gegensatz zu Hydroxyprolin, einem weiteren wichtigen Marker des Kollagenabbaus, werden HP und LP im Körper nicht weiter verstoffwechselt und vollständig renal eliminiert. Im Urin kommen die Pyridinoline in freier (ca. 40 % – 45 %) und peptidgebundener (ca. 55 % – 60 %) Form vor [1, 3, 6, 12, 13, 19, 37, 39, 40, 43, 65, 67, 81, 83, 85, 88, 89]. Aufgrund dieser oben genannten Eigenschaften sind HP und LP viel versprechende Marker der Knochenresorption. Ihr Nachweis im Urin findet bereits Verwendung in der Diagnostik und Therapiekontrolle von nicht malignen Krankheiten des Knochenstoffwechsels wie etwa Osteoporose, M. Paget, rheumatoider Arthritis, Osteomalazie und Hyperparathyreoidismus. In der Diagnostik und Verlaufkontrolle primärer und sekundärer Knochentumoren (Osteosarkome, Knochenmetastasen) spielen sie ebenfalls eine zunehmend wichtige Rolle

[1, 3, 6, 12, 13, 19, 28, 37, 40, 43, 49, 65, 67, 78, 81, 83, 84, 85, 88, 89]. Der quantitative Nachweis erfolgt mittels High Performance Liquid Chromatographie (HPLC) und anschließender Fluoreszenzdetektion [2, 8, 35]. Dieses analytische Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit zur Beurteilung des quantitativen Kollagenschadens im Rahmen der Strahlentherapie von Knochenmetastasen angewandt.

2.3 Fragestellung

Die osteoprotektive Wirkung von Bisphosphonaten, insbesondere von Zoledronsäure, bei Knochenmetastasen konnte bereits in mehreren Studien eindrücklich bewiesen werden [15, 74, 75, 77]. Springer und Mitarbeiter konnten in ihrer Arbeit [82] zeigen, dass es bei der in-vitro-Bestrahlung von Zähnen und Zahnpulpa vermutlich zu einer direkten radiogenen Kollagenzerstörung kommt. Diese Vermutung konnte in den Dissertationen von Gaßling [4, 41] und Weppner [92] an in vitro bestrahltem Knochengewebe bzw. durch in vivo durchgeführte Messungen von biochemischen Markern des Knochenabbaus bei Patienten mit Knochenmetastasen bestätigt werden. Zusätzlich konnte in der Arbeit von Weppner [92] eine Tendenz zu vermindertem Kollagenabbau während der Strahlentherapie bei gleichzeitiger Gabe von Bisphosphonaten beobachtet werden.

Die vorliegende Arbeit, die mit der Unterstützung der Firma Novartis Pharma GmbH (Nürnberg, Deutschland) durchgeführt wurde, sollte die folgenden Fragen klären:

1. Wie ist der Einfluss von Zoledronsäure auf die Urinausscheidung von HP und LP während der Bestrahlung?
2. Gibt es Unterschiede in der Ausscheidung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Erstgabe des Bisphosphonats?
3. Hat die Zoledronsäuregabe einen osteoprotektiven Effekt während der Bestrahlung?

3 Material und Methoden

3.1 Aufgabenstellung und Studienaufbau

3.1.1 Studiendesign

Ziel der vorliegenden Studie war es, anhand der biochemischen Marker HP und LP im Urin den Einfluss von Bisphosphonaten auf den Knochenstoffwechsel und Kollagenabbau unter Strahlentherapie von Knochenmetastasen zu untersuchen. Die Studie wurde als offene, prospektiv randomisierte klinische Studie angelegt. Es handelte sich um eine therapeutische Prüfung an erkrankten Patienten.

Analysiert wurden die Daten zweier Patientengruppen. Eine Gruppe erhielt die Bisphosphonatgabe spätestens nach dem zweiten Bestrahlungstag; die andere Gruppe erhielt die Bisphosphonatgabe am Ende bzw. nach Abschluss der Bestrahlung.

3.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Auswahl der Probanden für beide Gruppen erfolgte nach festen Ein- und Ausschlusskriterien.

Einschlusskriterien waren:

1. Alter > 18 Jahre
2. Histologisch gesicherte Tumorerkrankung
3. Nachweis mindestens einer schmerzhaften Knochenmetastase im Röntgen, CT, MRT
4. Erwartetes Überleben > 12 Monate
5. Schriftliches Einverständnis der Patienten
6. Keine eingeschränkte Nierenfunktion mit einer GFR < 30 ml/min
7. Normale Serumcalciumkonzentration (nicht $< 2,0$ mmol/l und nicht $> 3,0$ mmol/l)

Ausschlusskriterien waren:

1. Eingeschränkte Nierenfunktion mit einer Kreatininclearance < 30 ml/min
2. Eine bestehende Schwangerschaft oder Stillen

3. Serumcalciumkonzentration $< 8,0$ mg/dl (2,0 mmol/l) oder Serumcalciumkonzentration $> 12,0$ mg/dl (3,0 mmol/l)
4. Bekannte Überempfindlichkeit gegen Zoledronsäure oder andere Bisphosphonate oder enthaltene Wirkstoffe
5. Zahnärztliche Eingriffe (Implantate, Extraktionen) oder invasive Zahnbehandlungen sechs Wochen vor Einschluss in die Studie
6. Zahn- oder Kieferentzündungen
7. Kieferknochennekrose oder verzögerte Wundheilung nach Zahnbehandlung

Die Randomisierung der Patienten in die jeweiligen Gruppen erfolgte prospektiv bei der Erstvorstellung in der Ambulanz bzw. bei stationärer Aufnahme in der Klinik für Strahlentherapie nach Überprüfung der Bestrahlungsindikation und der Ein- und Ausschlusskriterien. Zur Randomisierung wurde eine Zufallszahlentabelle benutzt. Berücksichtigt wurden zwei Merkmale mit jeweils zwei Ausprägungen, und zwar Alter und Geschlecht. Die beiden Gruppen wurden mit Gruppe A und Gruppe B bezeichnet.

- Gruppe A: Bisphosphonatgabe am Ende bzw. nach abgeschlossener Bestrahlung
- Gruppe B: Bisphosphonatgabe vor der Bestrahlung bzw. innerhalb der ersten beiden Bestrahlungstage

Alle Patienten wurden vor Studienbeginn ausführlich über den Sinn, den Inhalt und die Durchführung der Studie informiert sowie über mögliche Risiken und Nebenwirkungen des verabreichten Bisphosphonats aufgeklärt. Alle Patienten haben schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie erklärt.

Die Studie wurde vom der Ethik-Kommission des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, unter der Nummer A146/06 genehmigt.

3.1.3 Behandlungsablauf und Probenentnahme

Eine schematische Übersicht über den Behandlungsablauf und die Probenentnahmen findet sich in den Abbildungen 2 und 3.

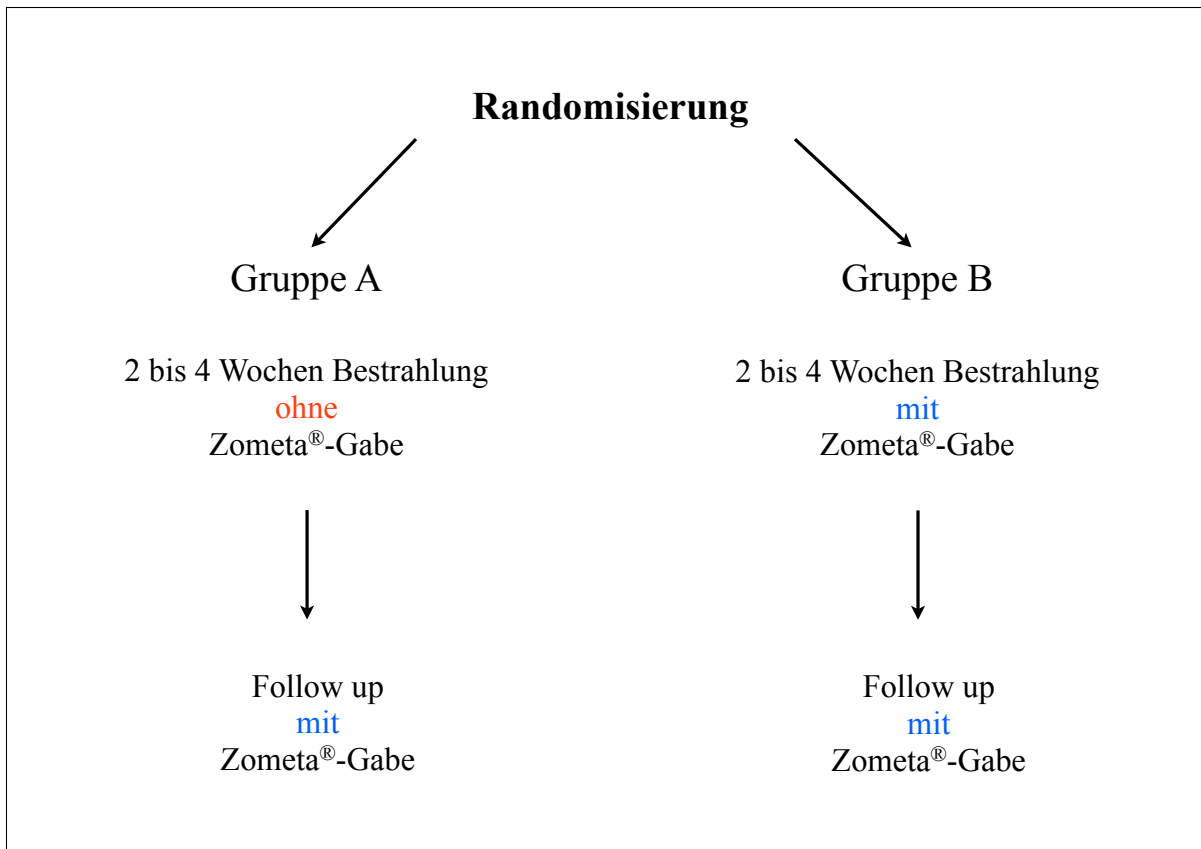


Abbildung 2: Behandlungsablauf

Woche:	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	Studienende
Analysen:	I	I	I	I	I				I				I	
	┌	Bestrahlung			└				Follow up				└	

Abbildung 3: Probenentnahme

In beiden Gruppen wurden von jedem Patienten jeweils eine Urinprobe vor der ersten Bestrahlung, eine Urinprobe wöchentlich während der Bestrahlung und jeweils eine Urinprobe zu den vereinbarten Wiedervorstellungsterminen bzw. bei erneuter Bisphosphonatgabe gesammelt. Die Urinproben wurden nach Abnahme bis zur weiteren Analyse bei -21 °C gelagert.

3.1.4 Patientendaten

Insgesamt wurden die Daten von 40 Patienten ausgewertet. Eine Übersicht über die Zusammensetzung der beiden Gruppen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Patientencharakteristika

	Gruppe A	Gruppe B	Gesamt
Geschlecht [Anzahl]			
Männer	11	10	21
Frauen	9	10	19
Alter [Jahre]			
Minimales	46	46	46
Maximales	82	84	84
Durchschnitt	64	62	63
Metastasen [Anzahl]			
Solitäre Knochenmetastasen	5	6	11
Multiple Knochenmetastasen	15	14	29
Weitere Metastasen	10	7	17
Tumorentitäten [Anzahl]			
Mammakarzinom	5	6	11
Bronchialkarzinom	5	4	9
Prostatakarzinom	4	2	6
Nierenzellkarzinom	2	2	4
Sonstige Karzinome	4	6	10

Unter den sonstigen Karzinomen fanden sich in jeweils zwei Fällen ein Blasen- und ein Pankreaskarzinom sowie jeweils als Einzelfall ein malignes Melanom, ein Schilddrüsenkarzinom, ein Rektumkarzinom, ein Sarkom, ein Cancer of unknown primary (CUP) und ein Karzinom der Glandula submandibularis.

Insgesamt 17 Patienten hatten neben Knochen- weitere Organmetastasen. Am häufigsten fanden sich dabei Leber- (acht Patienten), Lungen- (sechs Patienten) Lymphknoten- (vier Patienten) und Hirnmetastasen (drei Patienten). Acht der 17 Patienten hatten dabei mehr als einen weiteren Organbefall.

Es wurden insgesamt 188 Urinproben analysiert (90 Proben aus Gruppe A, 98 Proben aus Gruppe B). 140 dieser Proben wurden vor und während der Bestrahlung (63 Proben

aus Gruppe A, 77 Proben aus Gruppe B) und 48 Proben nach Abschluss der Therapie (27 Proben aus Gruppe A, 21 Proben aus Gruppe B) gesammelt.

3.1.5 Bestrahlung

Die Bestrahlung der Patienten erfolgte in der Klinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Direktor: Prof. Dr. Dr. B. Kimmig). Nach individueller, CT-optimierter oder konventioneller Bestrahlungsplanung wurden alle Patienten am Linearbeschleuniger (Clinac 2100 bzw. Clinac 600 des Herstellers Varian Medical Systems Inc. (Palo Alto, USA) oder SL 25 der Firma Elekta (Stockholm, Schweden)) mit einer Energie von 6 MeV bzw. 15 MeV Photonen bzw. 6 MeV Elektronen bestrahlt. Bestrahlt wurde je nach Zielvolumen entweder über ein Stehfeld oder über opponierende Felder.

Insgesamt 21 Patienten wurden mit einer Gesamtdosis von 30 Gy und einer Einzeldosis von 3 Gy bestrahlt (zwölf Patienten in Gruppe A und neun Patienten in Gruppe B). Zwölf Patienten wurden mit einer Gesamtdosis von 40 Gy und einer Einzeldosis von 2 Gy (fünf Patienten in Gruppe A und sieben Patienten in Gruppe B), sechs Patienten mit einer Gesamtdosis zwischen 35 Gy und 37,5 Gy und einer Einzeldosis von 2,5 Gy (jeweils drei Patienten Gruppe A und Gruppe B) bestrahlt. Nur ein Patient aus Gruppe B wurde mit einer Gesamtdosis von 28 Gy und 2 Gy ED bestrahlt.

Bestrahlt wurde in 31 Fällen die Wirbelsäule, in zehn Fällen das Becken (einschließlich Hüfte, Iliosakralgelenk, Sitzbein), in zehn Fällen die Extremitäten (Femur und Humerus), in zwei Fällen die Rippen und in einem Fall das Schulterblatt. Bei 16 Patienten wurde aufgrund multipler Knochenmetastasen mehr als ein (zwei bis max. vier) Zielvolumen bestrahlt. Die Bestrahlung der Knochenmetastasen erfolgte bei vier Patienten parallel zur Bestrahlung des Primärtumors (in allen vier Fällen Bronchialkarzinom). Bei einem dieser vier Patienten wurde zusätzlich eine Ganzhirnbestrahlung durchgeführt.

3.1.6 Bisphosphonate

Alle Patienten haben das Bisphosphonat Zoledronsäure in Form des zugelassenen Medikaments Zometa[®] der Firma Novartis Pharma GmbH, in der Dosierung von 4 mg, als Infusion (in 500 ml NaCl 0,9 %) bekommen. Der Abstand zwischen den einzelnen Gaben

betrug mindestens vier Wochen.

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Produkt	Hersteller
Acetonitril	Mallinckrodt-Baker, Deventer, Niederlande
CF-1 (fibröse Cellulose)	Whatman, Maidstone, England
Chloroform	Merck, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Merck
Essigsäure	Merck
Ethanol (95 %)	Merck
HFBA (Heptafluorbuttersäure)	Merck
Natriumacetat	Merck
Natriumazid	Merck
n-Butanol	Merck
Salzsäure (37 % rauchend)	Merck
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

3.2.2 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Geräte

Produkt	Hersteller
Chromatographiesäule (Poly-Prep-Chromatography-Column), 40 mm x 8 mm, Filter mit 2 μ m Poren	Bio-Rad, München, Deutschland
Clinac 600, Clinac 2100	Varian Medical Systems Inc., Palo Alto, USA
Fluoreszenzdetektor (Type RF 1002)	Gynothek, Germering, Deutschland
HPLC Anlage	Gynothek
Gefriertrockner (Vacuum centrifuge, Maxi dry lyo)	HETO, Allerød, Dänemark
SL 25	Elekta, Stockholm, Schweden
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland

3.2.3 Sonstige verwendete Materialien

- Externer Standard für die HP und LP Bestimmung, Osseinhydrolysat, Deutsche Gelatine Fabriken Stoess AG, Eberbach
- Zoledronsäure (Zometa[®]) 4 mg/5 ml Konzentrat zur Herstellung einer Infusionslösung, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg

3.3 Methodik

3.3.1 Allgemeines

Die Analysen wurden in den wissenschaftlichen Laboratorien der Klinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel (Direktor: Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang), unter der Leitung von Prof. Dr. Y. Açil mit den dort etablierten Methoden [2] durchgeführt.

Die Abbauprodukte des reifen Kollagens, die so genannten Quervernetzungs-komponenten HP und LP lassen sich durch die präzise hochempfindliche Flüssigkeitschromatographie HPLC (High-Performance-Liquid-Chromatography) im Urin nachweisen. Die HPLC ist eine sehr leistungsfähige chromatographische Technik zur Auftrennung und Analyse von Stoffgemischen. Aufgrund der natürlichen Fluoreszenz von HP und LP können deren Konzentrationen in den Urinproben nach Auftrennung durch die HPLC mittels Fluoreszenz-Detektion bestimmt werden. Dazu müssen die Urinproben vorbereitet werden.

Die schematische Darstellung des Versuchablaufs ist in Abbildung 4 dargestellt:

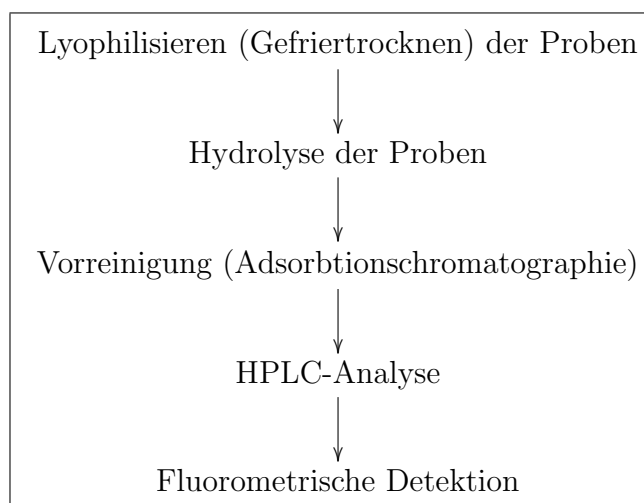


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchablaufs

3.3.2 Lyophilisieren der Proben

Zunächst müssen die Urinproben von Wasser befreit werden. Dafür werden von jeder Urinprobe 3 ml entnommen, bei -70°C tiefgefroren und anschließend über Nacht gefriergetrocknet.

3.3.3 Hydrolyse der Proben

Da etwa 55 % – 60 % der Pyridinoline im Urin in proteingebundener Form vorkommen [1, 3, 65], müssen diese für die weitere Analyse zunächst vom Protein abgespalten werden. Dies erfolgt mittels saurer Hydrolyse. Dazu werden die gefriergetrockneten Proben mit jeweils 3 ml einer 6 M Salzsäure versetzt und anschließend bei 110°C über 24 Stunden hydrolysiert.

3.3.4 Vorbereitung des CF-1 Säulenmaterials

Um die hydrolysierten Proben von störenden anorganischen Stoffen (Salzen) und organischen Verbindungen (Ammoniak, Aminosäuren, Kohlenhydrate) zu befreien, werden diese nach dem Prinzip der Adsorptionschromatographie mit 10 % CF-1 (fibröse Zellulose) als Adsorptionsmaterial behandelt. Für die Durchführung der Adsorptionschromatographie muss zunächst die 10 % CF-1 vorbereitet werden. Dazu werden 100 g CF-1 in 3 Liter 1 M Natriumacetat gelöst und mit einem Magnetrührer 20 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Die Zellulose setzt sich nach ca. 10 Minuten am Boden ab. Der Überstand wird mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Sediment wird in einem Büchner-Trichter nahezu trocken genutscht. Der Filterkuchen wird anschließend in 3 Liter 0,5 M NaOH gelöst und mit einem Magnetrührer 20 Minuten gerührt, abgesetzt und der Überstand abgesaugt. Anschließend wird das Sediment erneut nahezu trocken genutscht. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Der Filterkuchen wird dann in 3 Liter bidestilliertem Wasser resuspendiert, 20 Minuten gerührt und der Überstand abgesetzt. Danach wird der Überstand abgesaugt und das Sediment erneut trocken abgenutscht. Im nächsten Schritt wird die Zellulose in 3 Liter 0,5 M HCl gelöst, 5 Minuten gerührt, abgesetzt, abgesaugt und anschließend trocken genutscht. Dieser Vorgang wird zweimal wiederholt. Nun wird der Filterkuchen in 3 Liter 0,1 M HCl und 95 %igem Ethanol resuspendiert, 20 Minuten gerührt, abgesetzt, abgesaugt, abfiltriert und trocken genutscht. Anschließend wird CF-1 in 3 Liter bidestilliertem Wasser gewaschen, 20 Minuten gerührt, abgesetzt, abgesaugt und trocken genutscht. Dieser Vorgang wird ebenfalls zweimal wiederholt. Der Filterkuchen wird über Nacht in 3 Liter 0,1 M Natriumacetat und 3 mM EDTA gelagert. Abschließend wird das Filtermaterial erneut in 3 Liter bidestilliertem Wasser gelöst, 20 Minuten gerührt, abgesetzt, abgesaugt und trocken genutscht. Die so vorbereitete fibröse Zellulose wird in 10 ml Chloroform (Konservierungsstoff) bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.3.5 Adsorptionschromatographische Vorreinigung

Aus dem Überstand des Hydrolysates wird 1 ml für die Adsorptionschromatographie entnommen. Es werden 1 ml der Probe mit 1 ml Eisessig, 5 ml 10 %ige CF-1 (CF-1 in n-Butanol/Essigsäure/Aqua dest. im Verhältnis 4:1:1 = Laufmittel) und 2 ml n-Butanol gemischt. Dieses Gemisch wird im nächsten Schritt auf eine Polyprep-Chromatographiesäule

gegeben. Das so gewonnene Eluat wird nochmals auf die Säule aufgetragen. Die Säule wird anschließend mit 2 x 5 ml Laufmittel gewaschen und das daraus entstandene Eluat verworfen. Mit Hilfe von 1 x 3 ml bidestilliertem Wasser, das auf die Säule aufgetragen wird, erfolgt dann die Desorption der Quervernetzungs-komponenten. Die n-Butanolschicht, die sich auf der Oberfläche des Eluats bildet, wird vorsichtig mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Pyridinoline HP und LP befinden nun im verbliebenen Eluat. Das Eluat wird bei -70° C tiefgefroren und anschließend gefriergetrocknet. Im nächsten Schritt werden die Pyridinoline in 1 ml Laufmittel A (1000 ml A. dest. + 2,0 ml Heptafluorbuttersäure + Natriumazid) gelöst. Die Proben werden abschließend in 1,5 ml Analyseflaschen umgefüllt. 200 μ l des Probevolumens werden schließlich mittels HPLC analysiert.

3.3.6 Analyse der Proben durch HPLC

Die HPLC ist ein Verfahren der hochempfindlichen Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie. Sie stellt ein Trennverfahren dar, bei dem die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Eluent) unter hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert wird. Je nach Art der Wechselwirkung zwischen stationärer Phase, mobiler Phase und Probe können bei der Flüssigkeitschromatographie Adsorptions-, Verteilungs-, Ionenaustausch-, Ausschluss- und Affinitätschromatographie als Trennmechanismen unterschieden werden.

Die Analyse der Pyridinoline erfolgt bei Raumtemperatur und mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,7 ml/min. Die Fluoreszenzdetektion wird bei einer Extinktion von $\lambda = 297$ nm und einer Emission von $\lambda = 397$ nm durchgeführt.

Folgende Laufmittel werden zum Aufbau des Konzentrationsgradienten verwendet:

- Laufmittel A: 3,0 ml 0,22 % HFBA + 1000 ml A. dest. + Natriumazid
- Laufmittel B: 1,5 ml 0,22 % HFBA + 100 ml A. dest. + 400 ml Acetonitril

Die Laufmittel werden über einen Degaser ständig entgast. Der Gradient wird, wie in Abbildung 5 gezeigt, in vier Stufen gebildet:

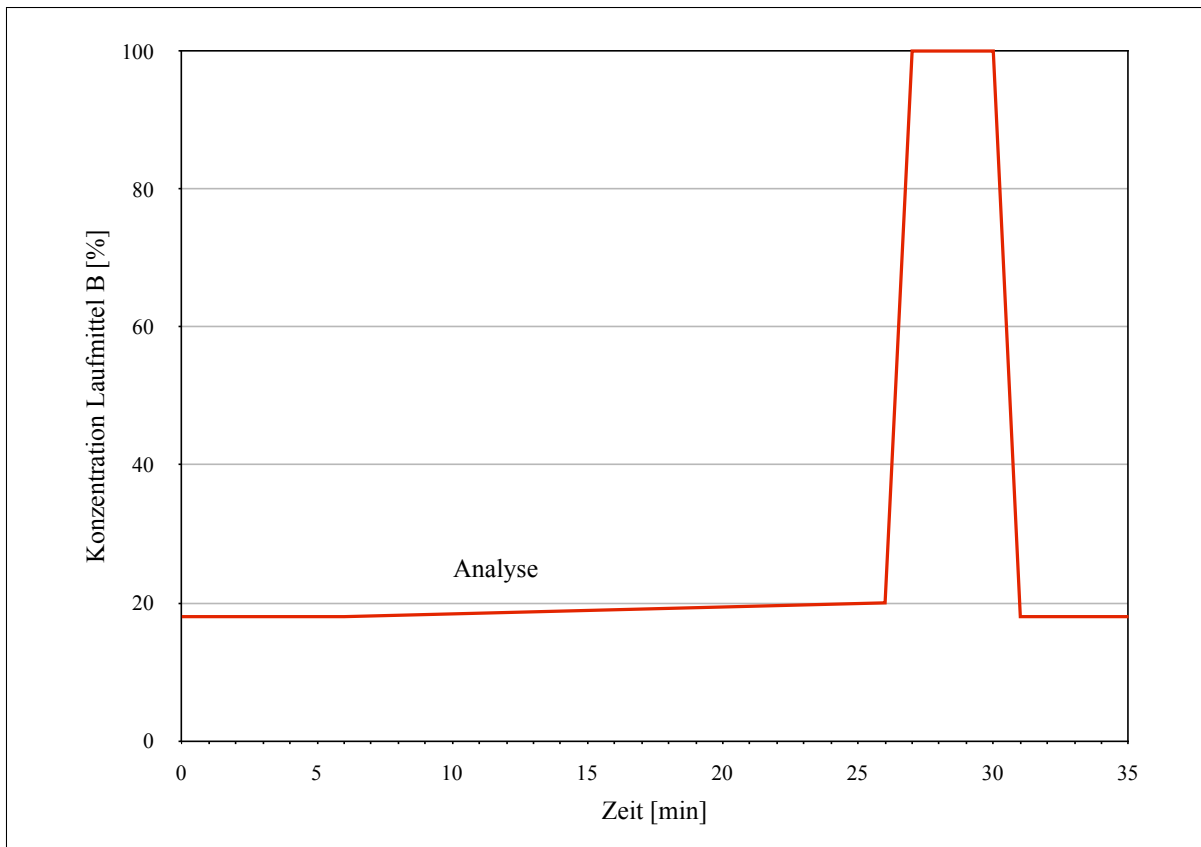


Abbildung 5: Darstellung der Laufmittelkonzentration von A und B in % über die Zeit.

Zu Beginn sind 82 % des Laufmittels A und 18 % des Laufmittels B vorhanden. Die Konzentration des Laufmittels B steigt innerhalb von 20 Minuten auf 20 % an. Anschließend erreicht Laufmittel B in einer Minute eine Konzentration von 100 %. Die Reinigung der Säule wird mit 100 %igem Laufmittel B in vier Minuten erreicht. Laufmittel B reduziert sich in der letzten Phase innerhalb von einer Minute auf 18 %. Das Verhältnis zwischen den Laufmitteln A und B beträgt bis zur nächsten Analyse 82 % : 18 %. Die unbekannt Konzentrationen der Pyridinoline im pmol-Bereich konnten mit Hilfe der externen Standards ermittelt und ferner die Trennleistung der Säule kontrolliert werden [2].

3.3.7 Normierung der Pyridinolin-Konzentrationen

Nach Ermittlung der HP- und LP-Konzentrationen im Urin (in pmol/ml) mittels HPLC erfolgte anschließend die Normierung der Werte. Als Normierungsparameter wurde Kreatinin im Urin (in mmol/ml) verwandt. Für die Auswertung der Untersuchung wurden nur die normierten HP- und LP-Konzentrationen (in nmol/mmol Kreatinin) berücksichtigt.

3.4 Statistische Auswertung

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden deskriptiv statistische Methoden angewandt. Die jeweiligen Berechnungen wurden mit der Software SPSS 14.0 für Windows durchgeführt. Zur graphischen Darstellung wurden Boxplots verwendet. Als Bezugsgrößen wurden hierbei das arithmetische Mittel (Mittelwert), der Median, das Maximum und Minimum sowie das obere und untere Quartil herangezogen. Das Verhältnis der beiden Gruppen zueinander wurde mit dem U-Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney überprüft. Das Signifikanzniveau p wurde bei 5 %, also mit $p < 0,05$, festgesetzt. Zur Vereinfachung wurden in den Tabellen und Abbildungen Signifikanzen wie folgt gekennzeichnet: $p \geq 0,05$: n.s.

4 Ergebnisse

Die Patienten der beiden untersuchten Gruppen wurden je nach Tumorentität und therapeutischer Zielsetzung (Analgesie, Stabilisierung des metastatisch befallenen Knochens) nach unterschiedlichen Bestrahlungskonzepten behandelt. Dabei variierten neben der Bestrahlungsdauer (zwischen zwei und vier Wochen) auch die Einzeldosis (ED zwischen 2 Gy und 3 Gy) sowie die Gesamtdosis (GD zwischen 28 Gy und 40 Gy), so dass während der Bestrahlung zwischen zwei und maximal sechs Urinproben genommen wurden.

Um die beiden Gruppen besser vergleichen zu können, wurden für die graphischen Darstellungen der Ergebnisse nur die ersten drei Entnahmezeitpunkte während der Bestrahlung sowie die ersten beiden Entnahmezeitpunkte nach Ende der Bestrahlung berücksichtigt. Für die statistische Auswertung wurden lediglich die ersten drei Entnahmezeitpunkte während der Bestrahlung betrachtet, da zum ersten Entnahmezeitpunkt nach Bestrahlung bereits alle Patienten eine Bisphosphonatgabe erhalten hatten und sich damit die beiden Gruppen A und B nicht mehr unterschieden.

Die fünf Entnahmezeitpunkte wurden wie folgt bezeichnet:

1. P0: Probe vor Beginn der Bestrahlung
2. P1: Probe am Ende der ersten Bestrahlungswoche
3. P2: Probe am Ende der zweiten Bestrahlungswoche
4. P1F: Probe zwei bis vier Wochen nach Abschluss der Bestrahlung
5. P2F: Probe sechs bis acht Wochen nach Abschluss der Bestrahlung

4.1 Analyse mittels HPLC

4.1.1 Analyse der externen Standards

Zunächst wurden aus isolierten Standards von HP und LP Verdünnungsreihen hergestellt und zur Kalibrierung von HP und LP als externe Standards auf die HPLC-Säule aufgetragen und analysiert. Die graphische Darstellung der Verdünnungsreihen ist in Abbildung 6 zu sehen. Das Chromatogramm der HPLC-Analyse der HP- und LP-Standards ist in Abbildung 7 dargestellt.

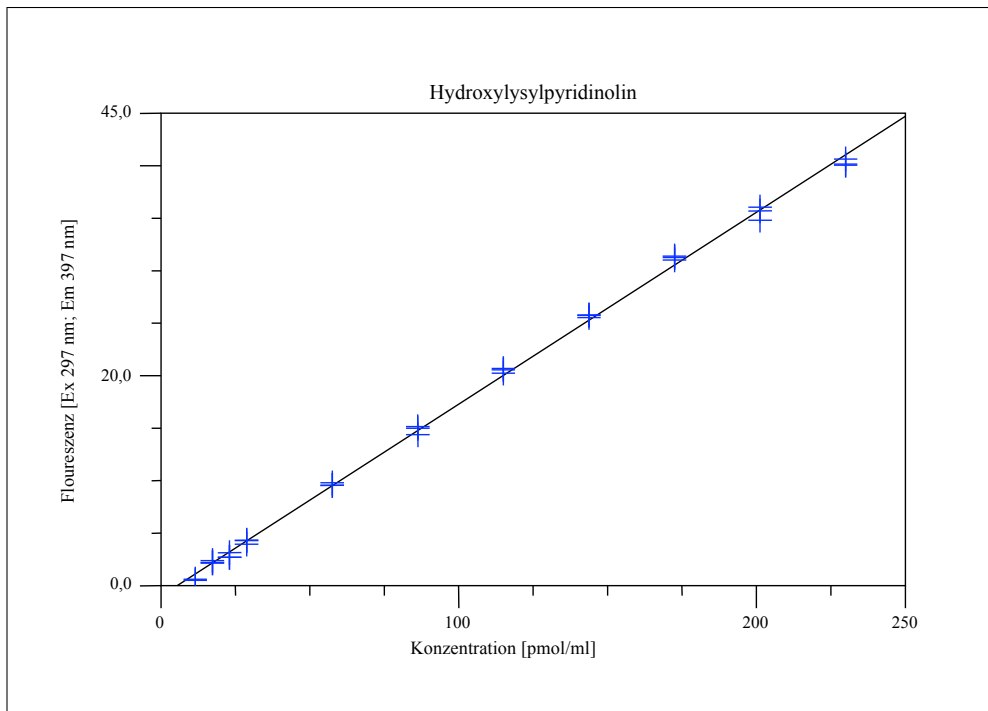


Abbildung 6a

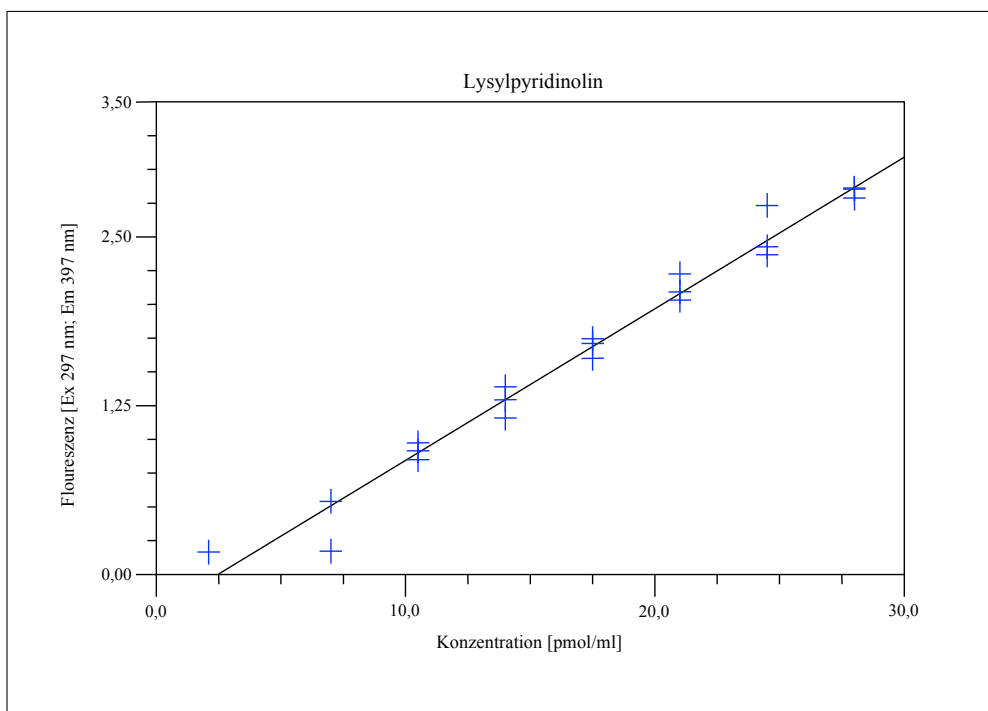


Abbildung 6b

Abbildung 6: Die Abbildungen 6a und 6b zeigen die Kalibrierung von HP und LP als externe Standards. HP und LP wurden in unterschiedlichen Verdünnungsreihen auf die HPLC-Säule aufgetragen und analysiert. Die Fluoreszenz ist bei einer Extinktion von $\lambda = 297 \text{ nm}$ und einer Emission von $\lambda = 397 \text{ nm}$ dargestellt.

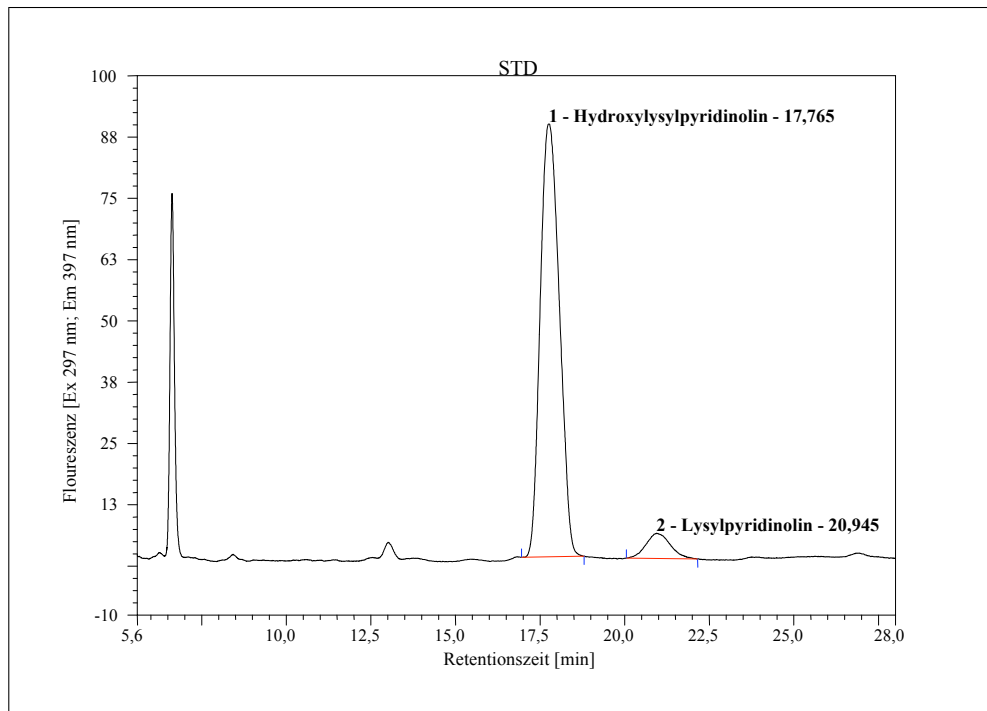


Abbildung 7: Chromatogramm der HPLC-Analyse des HP- und LP-Standards. Die Fluoreszenz ist bei einer Extinktion von $\lambda = 297 \text{ nm}$ und einer Emission von $\lambda = 397 \text{ nm}$ dargestellt. Der HP-Peak beginnt bei ca. 17 Minuten nach Injektion, der LP-Peak ca. 20 Minuten nach Injektion. Die Flächen unter den Kurven entsprechen dabei den detektierten, nicht normierten Konzentrationen von HP und LP in pmol/ml.

4.1.2 Analyse der Proben

Insgesamt wurden 188 Urinproben (90 Proben aus Gruppe A, 98 Proben aus Gruppe B) auf ihre Konzentrationen von HP und LP mittels HPLC untersucht. 140 dieser Proben wurden vor und während der Bestrahlung (63 Proben aus Gruppe A, 77 Proben aus Gruppe B) und 48 Proben nach Abschluss der Therapie (27 Proben aus Gruppe A, 21 Proben aus Gruppe B) gesammelt. Es wurden jeweils $200 \mu\text{l}$ der (wie in den Kapiteln 3.3.2 bis 3.3.5 beschrieben) verarbeiteten Urinproben analysiert. In 187 Proben konnten beide Marker bestimmt werden, in einer Probe konnte LP nicht nachgewiesen werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen exemplarisch die Eluationsprofile der quantitativen Analyse von HP und LP jeweils zu den drei Entnahmezeitpunkten (P0, P1 und P2) am Beispiel eines Patienten aus Gruppe A (Bisphosphonatgabe am Ende der Bestrahlung, Abbildung 8) und einer Patientin aus Gruppe B (Bisphosphonatgabe vor der 1. Bestrahlung, Abbildung 9).

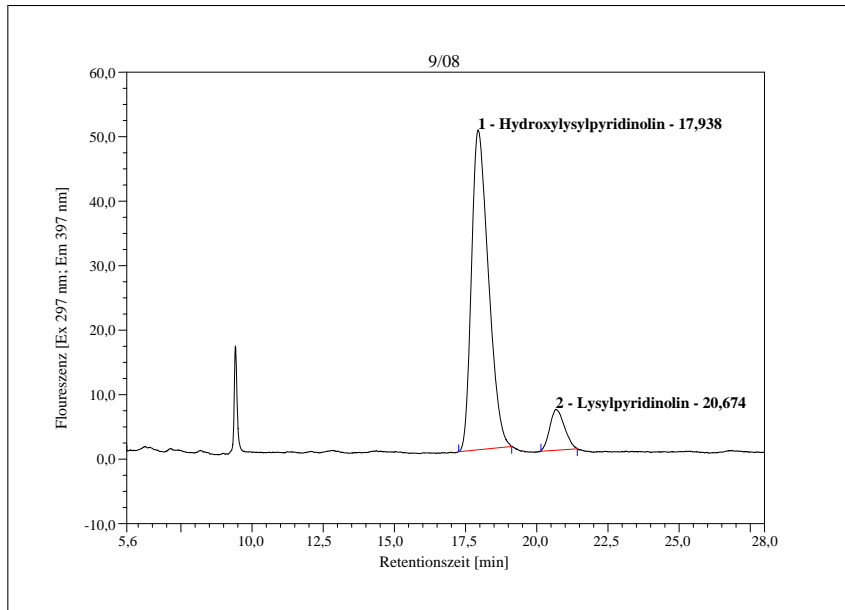


Abbildung 8a

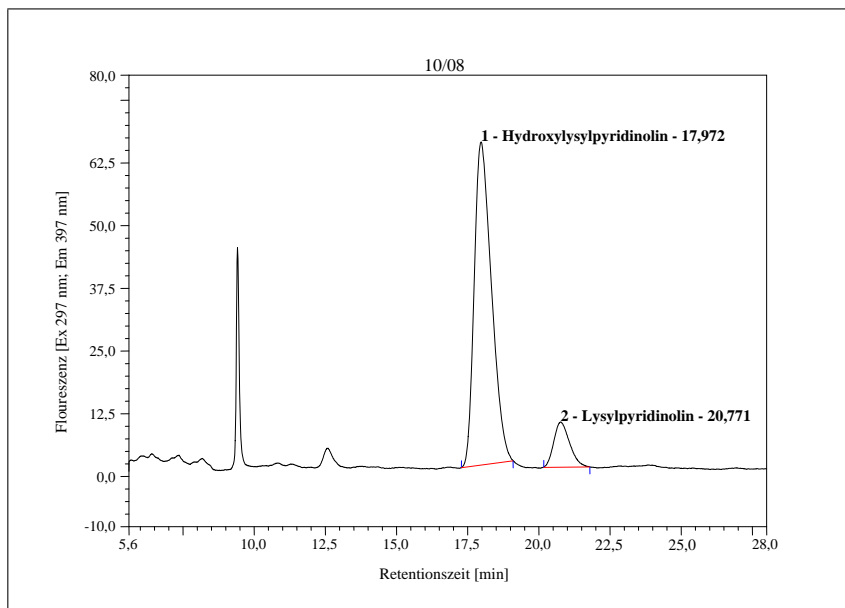


Abbildung 8b

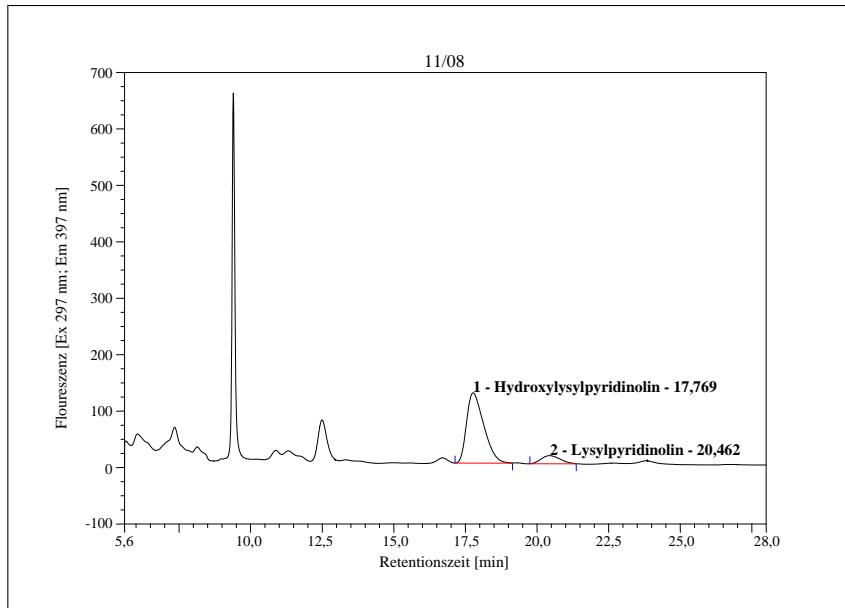


Abbildung 8c

Abbildung 8: Die Abbildungen 8a bis 8c zeigen Chromatogramme der HPLC-Analysen der Urinproben eines Patienten aus Gruppe A zu den Entnahmezeitpunkten P0 (vor der ersten Bestrahlung), P1 (Ende der ersten Bestrahlungswoche) und P2 (Ende der Bestrahlung und vor der ersten Bisphosphonatgabe). Die Flächen unter den Kurven entsprechen den detektierten, nicht normierten HP- und LP-Konzentrationen in pmol/ml. Der HP-Peak beginnt jeweils bei ca. 18 Minuten nach Injektion gefolgt vom LP-Peak nach ca. 20 Minuten. Unter Beachtung der unterschiedlichen Skalierung ist ein Anstieg der HP- und LP-Konzentrationen unter der Bestrahlung zu sehen.

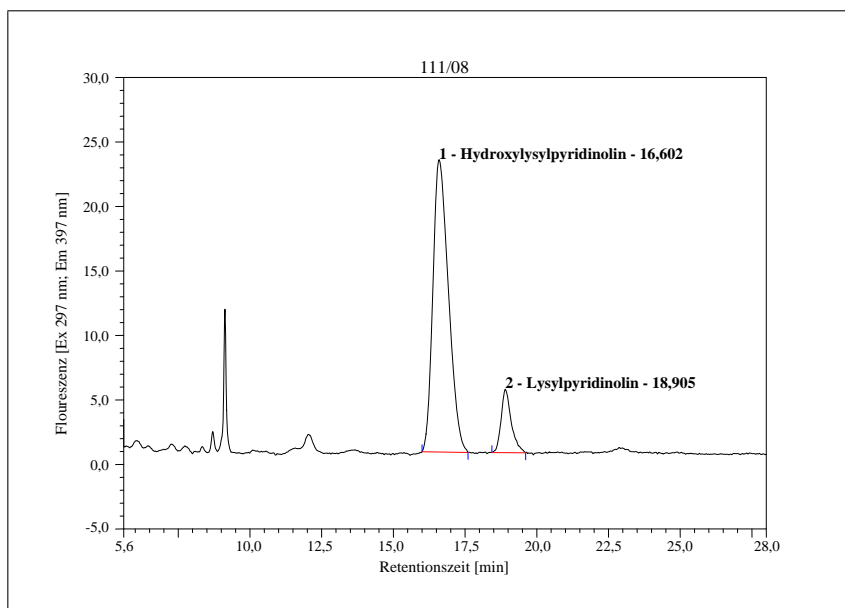


Abbildung 9a

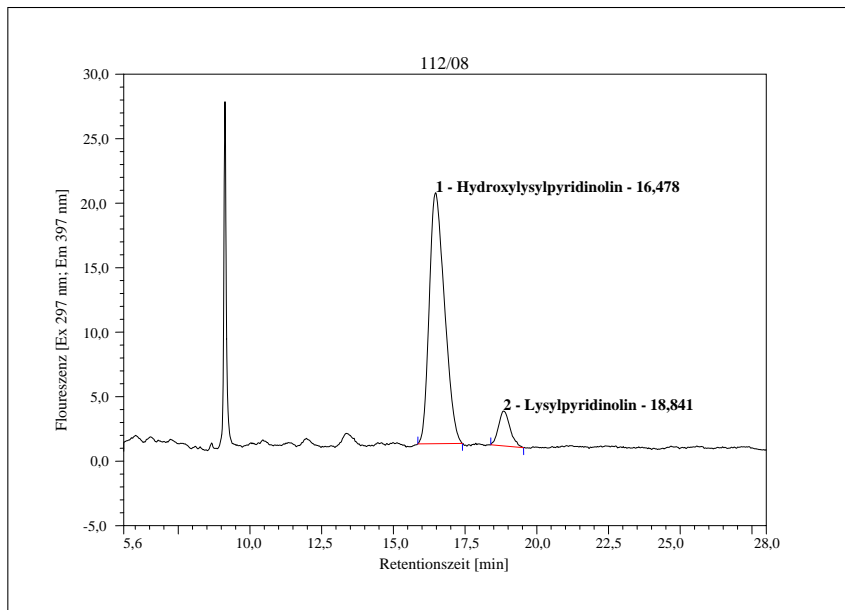


Abbildung 9b

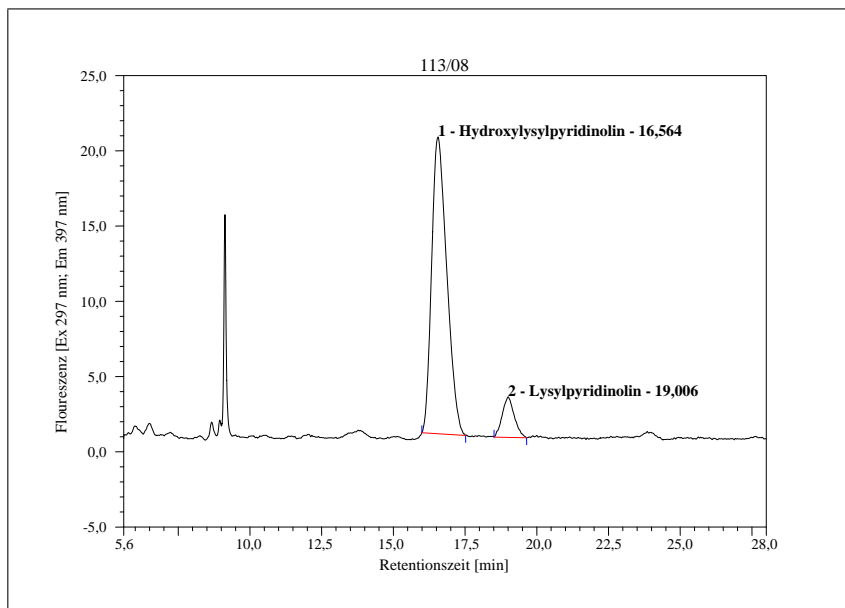


Abbildung 9c

Abbildung 9: Die Abbildungen 9a bis 9c zeigen Chromatogramme der HPLC-Analysen der Urinproben einer Patientin aus Gruppe B zu den Entnahmezeitpunkten P0 (vor der ersten Bestrahlung und vor der ersten Bisphosphonatgabe), P1 (Ende der ersten Bestrahlungswoche) und P2 (Ende der zweiten Bestrahlungswoche). Die Flächen unter den Kurven entsprechen den detektierten, nicht normierten HP- und LP-Konzentrationen in pmol/ml. Der HP-Peak beginnt jeweils bei ca. 16 Minuten nach Injektion gefolgt vom LP-Peak nach ca. 19 Minuten. Unter Beachtung der unterschiedlichen Skalierung ist ein Absinken der HP- und LP-Konzentrationen unter der Bestrahlung nach erfolgter Bisphosphonatgabe zu sehen.

4.2 Ergebnisse der HPLC-Analyse

Um die Ergebnisse graphisch übersichtlich darstellen und Tendenzen herausarbeiten zu können, wurden die erfassten Einzelergebnisse gemittelt. Sämtliche Einzelmessergebnisse aller Patienten sind im Anhang in den Tabellen 8 bis 11 aufgelistet.

Die ermittelten statistischen Werte (Median, Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (s), Standardfehler (SEM), maximaler und minimaler Wert, oberes (OQ) und unteres Quartil (UQ)) sind für HP und LP getrennt nach den Gruppen A und B für die jeweiligen Entnahmezeitpunkte in den Tabellen 4 und 5 zusammengefasst.

Tabelle 4: Verlauf der Urinkonzentrationen von HP und LP (in nmol/mmol Kreatinin) in Gruppe A (Bisphosphonatgabe am Ende bzw. nach Abschluss der Bestrahlung) zu den Entnahmezeitpunkten (ZP) P0 (vor der Bestrahlung), P1 (Ende der ersten Bestrahlungswoche), P2 (Ende der zweiten Bestrahlungswoche), P1F (zwei bis vier Wochen nach Ende der Bestrahlung) und P2F (sechs bis acht Wochen nach Ende der Bestrahlung). Dargestellt sind die Anzahl der analysierten Proben (n), Median, Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (s), Standardfehler (SEM), maximaler (Max) und minimaler Wert (Min), unteres (UQ) und oberes Quartil (OQ).

Gruppe A	ZP	n	Median	\bar{x}	s	SEM	Max	Min	OQ	UQ
HP	P0	18	76,1	94,0	54,5	12,8	208,9	29,8	128,7	56,6
	P1	19	92,2	112,9	75,4	17,3	287,6	32,7	155,0	57,7
	P2	16	89,1	87,6	51,5	12,9	237,5	34,0	109,2	42,5
	P1F	14	85,4	91,5	67,8	18,1	231,0	23,4	112,2	33,5
	P2F	9	69,3	89,6	63,0	21,0	188,0	25,1	124,7	42,6
LP	P0	18	19,4	19,3	9,7	2,3	39,1	5,2	25,0	10,5
	P1	19	19,4	24,0	13,7	3,1	49,8	5,0	32,9	13,5
	P2	16	12,4	16,6	11,1	2,8	49,5	4,7	21,4	9,4
	P1F	14	14,7	15,5	12,3	3,3	45,7	3,4	19,1	5,6
	P2F	9	11,8	15,6	11,3	3,8	34,3	5,6	25,0	6,0

Tabelle 5: Verlauf der Urinkonzentrationen von HP und LP (in nmol/mmol Kreatinin) in Gruppe B (Bisphosphonatgabe vor bzw. zu Beginn der Bestrahlung) zu den Entnahmezeitpunkten (ZP) P0 (vor der Bestrahlung), P1 (Ende der ersten Bestrahlungswoche), P2 (Ende der zweiten Bestrahlungswoche), P1F (zwei bis vier Wochen nach Ende der Bestrahlung) und P2F (sechs bis acht Wochen nach Ende der Bestrahlung). Dargestellt sind die Anzahl der analysierten Proben (n), Median, Mittelwert (\bar{x}), Standardabweichung (s), Standardfehler (SEM), maximaler (Max) und minimaler Wert (Min), unteres (UQ) und oberes Quartil (OQ).

Gruppe B	ZP	n	Median	\bar{x}	s	SEM	Max	Min	OQ	UQ
HP	P0	19	126,6	134,4	72,0	16,5	254,3	36,1	185,2	76,6
	P1	20	95,5	119,6	85,2	19,1	354,2	30,8	148,4	64,6
	P2	15	71,2	115,7	126,6	32,7	421,9	11,0	119,0	45,2
	P1F	11	98,6	111,8	54,1	17,1	194,3	36,6	158,7	72,6
	P2F	8	95,4	125,7	57,7	20,4	227,5	70,7	172,4	86,4
LP	P0	19	25,4	30,4	18,3	4,2	65,5	4,6	46,9	18,2
	P1	20	15,9	24,9	22,3	5,0	79,3	7,8	27,6	10,8
	P2	15	13,6	19,2	21,2	5,5	75,8	2,9	15,2	9,3
	P1F	10	16,8	20,0	11,1	3,5	43,9	7,4	26,8	11,4
	P2F	8	20,8	22,8	12,0	4,2	39,3	11,0	30,7	12,6

4.2.1 Trendanalyse

Es wurde analysiert, welchen Einfluss die Bisphosphonatgabe auf die Urinkonzentrationen von HP und LP während sowie nach der Bestrahlung hatte und ob es dabei einen (statistisch signifikanten) Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen A und B gab.

Um Tendenzen zu erkennen, wurde zunächst der Verlauf der Mittelwerte der kreatinin-normierten HP- und LP-Konzentrationen während und nach Abschluss der Bestrahlung getrennt in den Gruppen A und B betrachtet (Abbildungen 10 und 11).

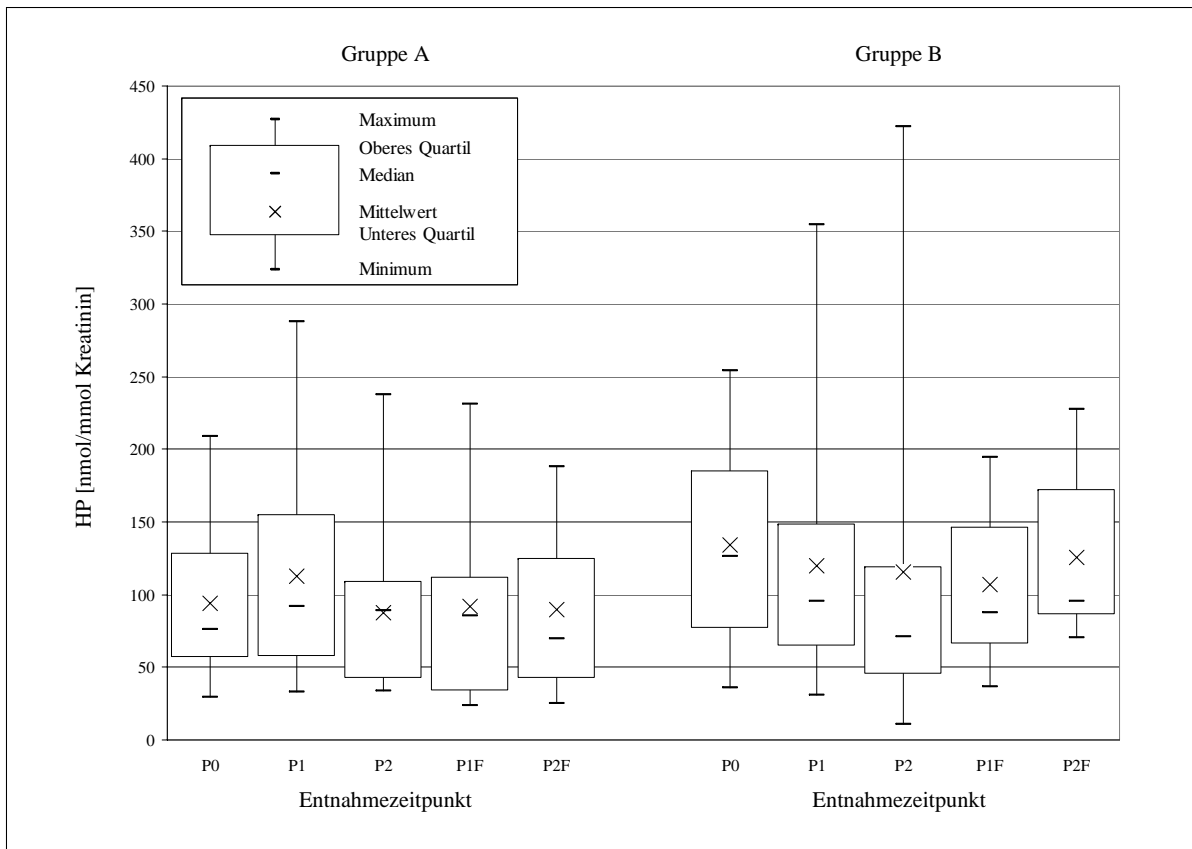


Abbildung 10: Urinkonzentrationen von HP getrennt nach Gruppe A (Bisphosphonatgabe am Ende der Bestrahlung) und Gruppe B (Bisphosphonatgabe vor der Bestrahlung) zu den Entnahmekzeitpunkten P0 (vor der Bestrahlung), P1 (Ende der ersten Bestrahlungswoche), P2 (Ende der zweiten Bestrahlungswoche), P1F (zwei bis vier Wochen nach Ende der Bestrahlung) und P2F (sechs bis acht Wochen nach Ende der Bestrahlung); jeder Boxplot zeigt den Median, Mittelwert, die Quartile und die Extremwerte (Minimum und Maximum). Zu sehen ist eine Tendenz zu sinkenden HP-Konzentrationen während der Bestrahlung (Entnahmekzeitpunkt P0 bis P2) in Gruppe B.

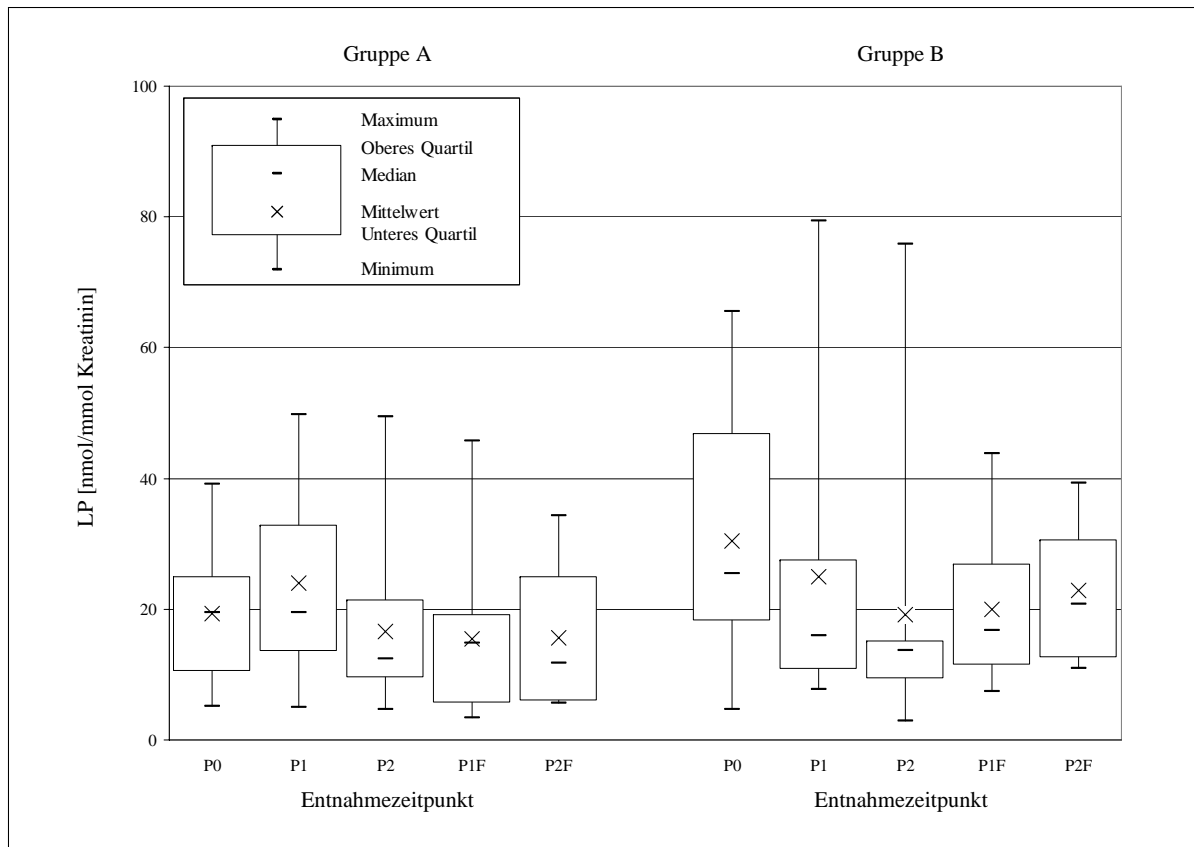


Abbildung 11: Urinkonzentrationen von LP getrennt nach Gruppe A (Bisphosphonatgabe am Ende der Bestrahlung) und Gruppe B (Bisphosphonatgabe vor der Bestrahlung) zu den Entnahmezeitpunkten P0 (vor der Bestrahlung), P1 (Ende der ersten Bestrahlungswoche), P2 (Ende der zweiten Bestrahlungswoche), P1F (zwei bis vier Wochen nach Ende der Bestrahlung) und P2F (sechs bis acht Wochen nach Ende der Bestrahlung); jeder Boxplot zeigt den Median, Mittelwert, die Quartile und die Extremwerte (Minimum und Maximum). Zu sehen ist eine Tendenz zu sinkenden LP-Konzentrationen während der Bestrahlung (Entnahmezeitpunkt P0 bis P2) in Gruppe B.

Während der Bestrahlung war in Gruppe A keine eindeutige Tendenz zu erkennen. Nach einem Anstieg der HP- bzw. LP-Konzentration am Ende der ersten Bestrahlungswoche (Entnahmezeitpunkt P1) um 20 % bzw. 24 %, kam es am Ende der zweiten Bestrahlungswoche (Entnahmezeitpunkt P2) zu einem Absinken der Konzentrationen um 23 % bzw. 31 %.

In Gruppe B war eine klare Tendenz zu sinkenden HP- und LP-Konzentrationen im Verlauf der Bestrahlung zu erkennen. Diese Tendenz war dabei bei LP stärker ausgeprägt als bei HP. Am Ende der ersten Bestrahlungswoche (Entnahmezeitpunkt P1) waren in Gruppe B die Mittelwerte der HP- bzw. LP-Konzentrationen um 11 % bzw. 18 % gesunken. Am Ende der zweiten Bestrahlungswoche (Entnahmezeitpunkt P2) waren die HP- und LP-Konzentrationen um weitere 3 % bzw. 13 % gesunken.

4.2.2 Gruppenvergleich

Die unterschiedlichen Verläufe der durchschnittlichen HP- und LP-Konzentrationen der beiden Gruppen A und B während der Bestrahlung wurden anschließend miteinander verglichen und auf statistische Signifikanz untersucht (Tabelle 6).

Tabelle 6: Untersuchung der Signifikanzen im Verlauf der HP- und LP-Konzentrationen während der Bestrahlung. Dargestellt sind die absolute Anzahl und in Klammern der prozentuale Anteil derjenigen Patienten in Gruppe A (keine Bisphosphonatgabe während der Bestrahlung) und Gruppe B (Bisphosphonatgabe vor bzw. zu Beginn der Bestrahlung) bei denen es zu einem Anstieg der HP- bzw. LP-Konzentrationen zu den einzelnen Entnahmezeitpunkten kam (P0: vor der Bestrahlung, P1: Ende der ersten Bestrahlungswoche, P2: Ende der zweiten Bestrahlungswoche). Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt.

Gruppe	Entnahmezeitpunkt		
	P1 — P0	P2 — P1	P2 — P0
HP			
A	11/17 (65 %)	7/15 (47 %)	7/14 (50 %)
	n.s.	n.s.	n.s.
B	6/19 (32 %)	5/15 (33 %)	3/14 (21 %)
LP			
A	12/17 (71 %)	4/15 (27 %)	6/14 (43 %)
	n.s.	n.s.	n.s.
B	7/19 (37 %)	4/15 (27 %)	4/14 (29 %)

Während in Gruppe A zum Entnahmezeitpunkt P1 bei 65 % bzw. 71 % der Patienten ein Anstieg der HP- bzw. LP-Konzentrationen festzustellen war, wurde in Gruppe B nur bei 32 % bzw. 37 % der Patienten ein Anstieg der HP- bzw. LP-Konzentrationen beobachtet. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant. Beim Vergleich der HP- und LP-Konzentrationen zum Entnahmezeitpunkt P2 mit den Ausgangskonzentrationen konnte in Gruppe A bei 50 % der Patienten ein Anstieg der HP- und bei 43 % der Patienten ein Anstieg der LP-Konzentration festgestellt werden. In Gruppe B war dies lediglich bei 21 % bzw. 29 % der Patienten der Fall. Dieser Unterschied war ebenfalls statistisch nicht signifikant.

Insgesamt konnte beobachtet werden, dass es während der Bestrahlung (Vergleich Entnahmezeitpunkt P0 und Entnahmezeitpunkt P2) in beiden Gruppen zu einer Abnahme

der HP- und LP-Konzentrationen kam. Der HP-Konzentrationsabfall war in Gruppe B doppelt so hoch wie in Gruppe A (14 % gegenüber 7 %). Für LP fiel das Verhältnis noch deutlicher aus: 37 % gegenüber 14 %. Statistisch war dieser Unterschied wiederum nicht signifikant.

Zum Entnahmezeitpunkt P1F (2-4 Wochen nach Abschluss der Bestrahlung) haben alle Patienten gruppenunabhängig mindestens eine Bisphosphonatgabe erhalten. Dies spiegelt sich auch im Verlauf der HP- und LP-Konzentration nach Abschluss der Bestrahlung wieder. In beiden Gruppen haben sich die Werte, ohne erkennbare Tendenz in eine Richtung, auf dem Niveau der Werte zum Entnahmezeitpunkt P2 eingependelt. Auffallend war nur, dass die Mittelwerte der HP- und LP-Konzentrationen zu den Entnahmezeitpunkten P1F und P2F in beiden Gruppen niedriger waren als die jeweiligen Mittelwerte zum Entnahmezeitpunkt P0.

Wurden die Ausgangsmittelwerte der HP- und LP-Konzentrationen (Entnahmezeitpunkt P0) mit den Mittelwerten zum Entnahmezeitpunkt P2F verglichen, so war zu erkennen, dass es in beiden Gruppen insgesamt zu einem Absinken der Konzentrationen kam (Gruppe A: HP 5 % und LP 20 %; Gruppe B: HP 7 % und LP 25 %). Der Konzentrationsabfall von LP war in beiden Gruppen etwa um das vierfache höher als der Abfall der HP-Konzentration.

4.2.3 Gesamtdosisanalyse

Um einen möglichen Einfluss der Gesamtdosis auf den Verlauf der HP- und LP-Konzentrationen während der Bestrahlung zu sehen, wurden die beiden Gruppen A und B jeweils in zwei Untergruppen aufgeteilt. Differenziert wurde nach der Gesamtdosis ($GD \leq 30$ Gy und $GD > 30$ Gy). Es war dabei zu keinem Entnahmezeitpunkt weder innerhalb der jeweiligen Gruppen noch zwischen den Gruppen A und B ein signifikanter Unterschied feststellbar (Tabelle 7). Die Tendenzen in den betrachteten Untergruppen entsprachen im Wesentlichen denen des Gesamtkollektivs.

Tabelle 7: Signifikanzen im Verlauf der HP- und LP-Konzentrationen während der Bestrahlung, unter Berücksichtigung der applizierten Gesamtdosis ($GD \leq 30$ Gy und $GD > 30$ Gy). Dargestellt sind die absolute Anzahl und in Klammern der prozentuale Anteil derjenigen Patienten in Gruppe A (keine Bisphosphonatgabe während der Bestrahlung) und Gruppe B (Bisphosphonatgabe vor bzw. zu Beginn der Bestrahlung) bei denen es in den Subgruppen zu einem Anstieg der HP- bzw. LP-Konzentrationen zu den einzelnen Entnahmezeitpunkten kam (P0: vor der Bestrahlung, P1: Ende der ersten Bestrahlungswoche, P2: Ende der zweiten Bestrahlungswoche). Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt.

Gruppe	Dosis	Entnahmezeitpunkt		
		P1 — P0	P2 — P1	P2 — P0
HP				
A	≤ 30 Gy	7/10 (70 %)	4/9 (44 %)	3/7 (43 %)
		n.s.	n.s.	n.s.
	> 30 Gy	4/7 (57 %)	3/6 (50 %)	4/7 (57 %)
B	≤ 30 Gy	5/10 (50 %)	2/6 (33 %)	1/6 (18 %)
		n.s.	n.s.	n.s.
	> 30 Gy	1/9 (11 %)	3/9 (33 %)	2/8 (25 %)
LP				
A	≤ 30 Gy	5/10 (50 %)	2/9 (22 %)	2/7 (29 %)
		n.s.	n.s.	n.s.
	> 30 Gy	7/7 (100 %)	2/6 (33 %)	4/7 (57 %)
B	≤ 30 Gy	6/10 (60 %)	2/6 (33 %)	2/6 (33 %)
		n.s.	n.s.	n.s.
	> 30 Gy	1/9 (11 %)	2/9 (22 %)	2/8 (25 %)

5 Diskussion

Knochenmetastasen stellen neben Leber- und Lungenmetastasen eine häufige Komplikation vieler Tumorerkrankungen dar [21, 53, 56, 63, 90]. Im Vordergrund der Behandlung stehen die Linderung der Schmerzsymptomatik und die Wiederherstellung der Skelettfunktion. Dabei kommen vor allem die Strahlentherapie und die supportive Therapie mit Bisphosphonaten zum Einsatz.

Bisphosphonate haben ein breites therapeutisches Potential. Es umfasst die Hemmung der Knochenresorption durch Osteoklasten, die Osteoprotektion und die Fähigkeit die Entwicklung von Knochenmetastasen zu verhindern oder zu verzögern [71, 86, 91]. Bisphosphonate werden bereits seit Jahren in der Behandlung von nicht malignen Erkrankungen mit gestörtem Knochenstoffwechsel wie z. B. M. Morbus Paget, Hypercalciämie, Hyperparathyreoidismus und Osteoporose eingesetzt [71, 86, 91]. In mehreren großen prospektiven Studien konnte der osteoprotektive Effekt der Bisphosphonate bei Patienten mit Tumorerkrankungen nachgewiesen werden [15, 65, 74, 75].

Vor allem Zoledronsäure und Pamidronat konnten im Vergleich zum Placebo, die Rate Skelett-bezogener Komplikationen – dazu gehören pathologische Frakturen, chirurgische Maßnahmen zur Behandlung oder Verhinderung einer Fraktur, palliative Strahlentherapie, Spinalkompression, Hypercalciämie, und Änderung der Schmerztherapie bei Knochenschmerzen – effektiv senken und ihr Auftreten hinauszögern [15, 27, 56, 60, 66, 71, 74, 75, 77, 91]. Des Weiteren zeigten in-vitro-Versuche, dass Zoledronsäure auch eine antitumoröse Wirkung besitzt [7, 38, 91]. Zoledronsäure verhindert in vitro die Proliferation von Mammakarzinomzellen und führt zu einer Zytostase und Apoptose von Myelomzellen [7, 38]. Diese Erkenntnisse führten zur Empfehlung eines möglichst frühen Einsatzes der Bisphosphonate im Rahmen einer Tumorerkrankung.

Die Strahlentherapie von Knochenmetastasen führt zu einer Schmerzlinderung und Remineralisation der osteolytischen Knochenläsionen. Dabei kommt es nach Abschluss der Bestrahlung zunächst zu einer Steigerung der Knochendichte durch vermehrte Bildung von Bindegewebe, welches im weiteren Verlauf mineralisiert wird. Die Stabilität des bestrahlten Knochens wird jedoch nicht nur durch die Knochendichte, sondern vor allem durch die dreidimensionale Mikroarchitektur und die Qualität des Knochengewebes bestimmt. Da direkt nach der Bestrahlung noch kein vollwertiger Knochen vorhanden ist, kann es

trotz gesteigerter Knochendichte zu Frakturen kommen [9, 56, 86]. Untersuchungen an in vitro bestrahlten Zähnen und Knochen haben außerdem gezeigt, dass es während der Bestrahlung zu einer direkten Kollagenzerstörung kommt [4, 41, 82]. Dies kann zusätzlich zur verminderten Knochenstabilität direkt nach der Bestrahlung beitragen.

Neuere in-vivo-Untersuchungen an Tier-Tumor-Modellen [9, 56] sowie eine Untersuchung [55] an Patienten mit osteolytischen Metastasen bei Mammakarzinom haben gezeigt, dass eine frühe Gabe von Bisphosphonaten in Kombination mit lokaler Bestrahlung die Remineralisation und Restabilisierung osteolytischer Knochenmetastasen verbessert. Dieser Effekt war besonders stark ausgeprägt, wenn die Bisphosphonate vor Beginn der Bestrahlung verabreicht wurden [56]. Die frühe Gabe der Bisphosphonate führte über die Hemmung der osteoklastären Resorption des Knochens zum Erhalt der dreidimensionalen Mikroarchitektur und damit zum Erhalt der Stabilität des Knochens während und nach Abschluss der Bestrahlung. Verifiziert wurden diese Ergebnisse durch Röntgenaufnahmen, Knochendichtemessungen und histomorphometrische Untersuchungen [55, 56].

Eine weitere Möglichkeit den antiresorptiven und osteoprotektiven Effekt von Bisphosphonaten zu verifizieren ist die Bestimmung von biochemischen Markern des Knochenabbaus im Urin und im Serum. Die am häufigsten verwendeten Marker sind die Pyridinoline HP und LP und in neueren Untersuchungen auch das N-Telopeptid (NTX). Bei diesen Markern handelt es sich um Abbauprodukte des reifen Kollagens, die nach ihrer Freisetzung ins Blut nicht weiter verstoffwechselt und fast vollständig im Urin ausgeschieden werden. Sie eignen sich daher gut zum Nachweis von Knochenum- und -abbauprozessen, Therapieansprechen sowie eines Tumorprogresses [13, 16, 19, 25, 26, 27, 28, 29, 69, 70, 87, 88].

Während HP außer in Knochen, in Sehnen, Knorpel und Blutgefäßen zu finden ist, wird LP fast ausschließlich in Knochen und Dentin gefunden [1]. HP und LP sind bei Tumorpatienten mit manifesten und ohne manifeste Knochenmetastasen, im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen, erhöht [1, 13, 19, 28, 29, 59, 67, 79, 83, 89]. Mehrere Untersuchungen haben gezeigt, dass es eine Korrelation zwischen der Höhe der biochemischen Marker, vor allem LP und NTX im Urin (bzw. Serum) und dem Vorhandensein, dem Schweregrad und der Ausdehnung der Knochenmetastasen gibt [13, 16, 17, 27, 29]. Dieser Zusammenhang konnte am Patientenkollektiv in der vorliegenden Studie ebenfalls beobachtet werden. In beiden Gruppen hatten die Patienten mit multiplen Knochenmetastasen im Durchschnitt höhere HP- bzw. LP-Ausgangswerte als die Patienten mit

solitären Knochenmetastasen. Ein Abfall der beiden Werte unter Therapie kann daher ein früher Indikator für ein Ansprechen der Erkrankung sein [47]. Ein Anstieg der Werte kann wiederum für einen Progress der Erkrankung, zumindest aber für einen verstärkten Knochenum- oder Abbau sprechen [13, 16, 19, 25, 26, 27, 28, 29, 69, 70, 87, 88].

In der Untersuchung von Weppner [65, 92] wurde bei Patienten mit Knochenmetastasen der Verlauf der Marker HP und LP im Urin während und sechs bis acht Wochen nach Abschluss der Strahlentherapie beobachtet. Es fiel ein Anstieg der Marker während der Bestrahlung auf, was die Hypothese eines direkten Kollagenschadens durch die Strahlentherapie stützte. Ein Teil der Patienten bekam während der Strahlentherapie auch Bisphosphonate verabreicht. In dieser Subgruppe zeigte sich eine Tendenz zur verminderten Ausscheidung von HP und LP während der Bestrahlung, was wiederum als Hinweis auf einen osteoprotektiven Effekt der Bisphosphonate während der Bestrahlung gesehen wurde. Hier setzte die vorliegende Arbeit an. Das Ziel war zu klären, wie der Einfluss von Bisphosphonaten auf die Urinausscheidung von HP und LP während der Bestrahlung ist und ob es Unterschiede in der Ausscheidung in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Erstgabe des Bisphosphonats gibt. Von besonderem Interesse war zu untersuchen, ob der osteoprotektive Effekt der Bisphosphonate (Zoledronsäure) während der Bestrahlung auch anhand der biochemischen Marker im Urin beobachtet werden konnte.

In der Literatur variieren die Angaben über die durchschnittlichen Werte von HP und LP bei Patienten mit Knochenmetastasen zwischen 90 nmol/mmol Kreatinin und 140 nmol/mmol Kreatinin für HP und zwischen 6 nmol/mmol Kreatinin und 26 nmol/mmol Kreatinin für LP [13, 16, 17, 19, 65, 67]. Dies entspricht auch den in dieser Studie ermittelten durchschnittlichen Ausgangswerten in Gruppe A von 94 nmol/mmol Kreatinin für HP und 19 nmol/mmol Kreatinin für LP. In Gruppe B lagen die durchschnittlichen Ausgangswerte höher als in Gruppe A, und zwar bei 134 nmol/mmol Kreatinin für HP und 30 nmol/mmol Kreatinin für LP. In beiden Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Ausgangswerten wenn Männer und Frauen getrennt betrachtet wurden. Dies entspricht ebenfalls den Angaben in der Literatur [1, 3, 13, 83].

Aus Untersuchungen an gesunden Patientinnen in der Prämeno- sowie in der Postmenopause mit und ohne Osteoporose ist bekannt, dass es eine deutliche zirkadiane Rhythmik der HP und LP Ausscheidung gibt [6, 33, 34, 35, 79, 81, 89]. Um vergleichbare Werte zu bekommen, erscheint es daher sinnvoll, die Urinproben immer zur selben Uhrzeit

zu sammeln. Dies war in der vorliegenden Untersuchung nicht immer gewährleistet, da die Patienten sowohl ambulant als auch stationär und zu zeitlich stark variierenden Bestrahlungsterminen behandelt wurden. Anhand der gemessenen Werte konnten trotzdem eindeutige Tendenzen beobachtet werden.

In Gruppe B führte die frühe Gabe von Zoledronsäure zu einem Abfall beider Marker während der Bestrahlung. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die selektive Hemmung der Osteoklastenaktivität und damit der Knochenresorption durch die Zoledronsäure. Es gibt mehrere Untersuchungen bei unterschiedlichen Grunderkrankungen (M. Paget, Hypercalciämie, Hyperparathyreoidismus, Knochenmetastasen), die nachweisen konnten, dass es nach Bisphosphonatgabe zu einem raschen Abfall der biochemischen Marker des Knochenabbaus kommt [16, 17, 19, 26, 37, 70, 81, 85]. Je nach Untersuchung konnte ein Abfall der HP und LP Werte um 30 % bis 60 % im Vergleich zu den Ausgangswerten beobachtet werden. Dabei sank LP im Schnitt stärker als HP. Die maximale Reduktion trat nach vier Tagen bis 14 Tagen auf. Ein erneuter Anstieg der Werte wurde nach 21 Tagen bis 28 Tagen beobachtet. In Gruppe B des untersuchten Patientenkollektivs konnte nach der Gabe von Zoledronsäure bis zum Ende der zweiten Bestrahlungswoche ebenfalls abnehmende HP- und LP-Konzentrationen beobachtet werden. Im Vergleich zu den Ausgangswerten sanken die durchschnittlichen Konzentrationen von HP bzw. LP um 14 % bzw. 37 %. Diese Ergebnisse waren jedoch statistisch nicht signifikant. Dabei ist auffällig, dass diese Werte deutlich niedriger sind als die in der Literatur beschriebenen. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass die Patienten im vorliegenden Kollektiv zusätzlich zur Bisphosphonatgabe bestrahlt wurden und daher die direkte Schädigung des Knochens durch die Bestrahlung bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Die Patienten der in der oben angegebenen Literatur aufgeführten Studien wurden nicht bestrahlt.

Im Gegensatz zur Gruppe B konnte in der Gruppe A zunächst ein Anstieg der durchschnittlichen HP- bzw. LP-Konzentrationen während der ersten Bestrahlungswoche um 20 % bzw. 23 % beobachtet werden. Dies entspricht, in der Tendenz, den Ergebnissen aus der Untersuchung von Weppner [65, 92]. Im weiteren Verlauf der Bestrahlung wurde jedoch, ähnlich wie in Gruppe B, eine Tendenz zu sinkenden HP- und LP-Konzentrationen gesehen. Dies kann damit zusammenhängen, dass der Untergang von Tumorgewebe unter der Bestrahlung zur Unterbrechung der tumorzellvermittelten Osteoklastenaktivie-

ung führt. Die Folge ist ein verminderter Knochenabbau der sich in einer verminderten Ausscheidung der biochemischen Marker widerspiegelt. Der Unterschied zwischen den Gruppen A und B war jedoch zu keinem Entnahmezeitpunkt während der Bestrahlung signifikant. Es konnte kein Einfluss der Gesamt- und Einzeldosis der Bestrahlung auf den Verlauf der HP- und LP-Konzentrationen während der Bestrahlung nachgewiesen werden. Nach Abschluss der Bestrahlung blieben die durchschnittlichen Konzentrationen von HP und LP in beiden Gruppen unterhalb der Ausgangswerte. Sie zeigten keinen erneuten Anstieg sechs bis acht Wochen nach Abschluss der Bestrahlung, wie in den Untersuchungen von Hoskins [47] und Weppner [65, 92] beobachtet wurde. Dies liegt vermutlich daran, dass zum Zeitpunkt der Urinabnahme (6 bis 8 Wochen nach Abschluss der Bestrahlung) alle Patienten bereits mindestens eine Zoledronsäuregabe erhalten haben und eine antiresorptive und damit osteoprotektive Wirkung vorhanden war.

In der durchgeführten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Bisphosphonaten, Zoledronsäure, vor bzw. zu Beginn einer Bestrahlung von Knochenmetastasen zu einer verminderten Ausscheidung der biochemischen Marker des Knochenabbaus HP und LP führt. Dies kann ein Hinweis auf die osteoprotektive Wirkung der Bisphosphonate während der Strahlentherapie von Knochenmetastasen sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen indirekt die Beobachtung anderer Studien, dass eine frühe Bisphosphonatgabe in Kombination mit lokaler Bestrahlung einen osteoprotektiven Effekt hat und zu einer verbesserten Remineralisation und Restabilisierung osteolytischer Knochenmetastasen führt [9, 55, 56, 86]. Der osteoprotektive Effekt besteht dabei am ehesten im Erhalt der dreidimensionalen Mikroarchitektur des Knochens und im Schutz des Knochenminerals. Die Frage, ob Bisphosphonate eventuell auch das Kollagen im Knochen vor radiogen bedingter Zerstörung schützen und dadurch zusätzlich die Stabilität des Knochens nach Bestrahlung erhöhen, ist mit dieser Untersuchung nicht zu beantworten. Aufgrund der geringen Patientenzahl in dieser Studie ist die statistische Aussagefähigkeit eingeschränkt.

6 Ausblick

Weitere Studien an größeren Kollektiven sollten untersuchen, ob es tatsächlich einen signifikanten Unterschied im Verlauf der biochemischen Marker des Knochenabbaus, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Bisphosphonatgabe, gibt. Außerdem wäre es wichtig zu eruieren, ob und wie sich der vermutete osteoprotektive Effekt klinisch manifestiert (Abnahme der Schmerzen, geringere Frakturrate nach Bestrahlung, verbesserte Lebensqualität). Zudem sollten neben HP und LP auch andere Marker des Knochenabbaus, wie z. B. die Kollagen Typ I Telozeptidfragmente NTX und CTX im Urin bzw. Serum bestimmt werden. Aus der Literatur geht hervor, dass vor allem NTX ein sehr sensibler Marker für den Nachweis einer Knochenresorption sowie ein früher Indikator für das Ansprechen von Knochenmetastasen auf eine Bisphosphonattherapie ist [16, 28, 49, 68]. Die Bestimmung von Markern des Knochenab- und aufbaus im Serum (NTX, CTX, ICTP sowie Osteocalcin, BAP, PICP, PINP) könnte dabei ebenfalls hilfreich sein [89]. Des Weiteren wäre zu überlegen, inwiefern das Ergebnis der kombinierten Strahlen- und Bisphosphonattherapie – soweit ethisch vertretbar – durch Röntgenaufnahmen oder Knochendichtemessungen verifiziert werden könnte.

7 Zusammenfassung

Im Verlauf vieler Tumorerkrankungen treten Knochenmetastasen als Komplikation auf. Die Folgen können Knochenschmerzen, pathologische Frakturen, Hypercalciämie und spinale Kompressionssyndrome sein. Die Therapie der Knochenmetastasen ist multimodal und richtet sich in erster Linie nach der klinischen Symptomatik. Im Vordergrund stehen die Linderung der Schmerzsymptomatik und die Wiederherstellung der Skelettfunktion. Zum Einsatz kommen neben chirurgischen Maßnahmen vor allem die Strahlentherapie und die medikamentöse Therapie mit Bisphosphonaten. Die Strahlentherapie führt zur Schmerzlinderung, Abtötung der Tumorzellen im Knochen und Remineralisation der osteolytischen Knochenläsionen. In mehreren in-vitro-Untersuchungen an Zähnen und Knochen konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen der Bestrahlung auch zu einer direkten radiogenen Kollagenzerstörung kommt [4, 41, 82]. Dies konnte anhand von Messungen der biochemischen Marker des Kollagenabbaus HP und LP bestätigt werden.

Bisphosphonate haben ein antiresorptiven, osteoprotektiven und Tumor-präventiven Effekt am Knochen [71, 91]. In neueren in-vivo-Untersuchungen an Tier-Tumor-Modellen konnte gezeigt werden, dass eine frühe Gabe von Bisphosphonaten in Kombination mit lokaler Bestrahlung die Remineralisation und Restabilisierung osteolytischer Knochenläsionen verbessert [9, 56]. In der Dissertation von Weppner [92] wurde zudem eine Tendenz zur verminderten Ausscheidung von HP und LP im Urin beschrieben, wenn während der Bestrahlung zusätzlich Bisphosphonate gegeben wurden. Dies wurde als Hinweis auf eine osteoprotektive Wirkung der Bisphosphonate während der Bestrahlung gedeutet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, wie der Einfluss von Bisphosphonaten auf die Urinausscheidung von HP und LP während der Bestrahlung ist, in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Erstgabe des Bisphosphonats. Von besonderem Interesse war zu sehen, ob anhand des Verlaufs der biochemischen Marker im Urin Hinweise auf einen osteoprotektiven Effekt der Bisphosphonate während der Bestrahlung beobachtet werden können.

Dazu wurden insgesamt 40 Patienten mit nachgewiesenen Knochenmetastasen prospektiv in zwei Gruppen zu je 20 Patienten randomisiert. Die erste Gruppe (Gruppe A) erhielt die Bisphosphonatgabe gegen Ende der Bestrahlung, die zweite Gruppe (Gruppe B) vor bzw. zu Beginn der Bestrahlung. In beiden Gruppen wurden jeweils eine Urinprobe vor der ersten Bestrahlung, eine Urinprobe wöchentlich während der Bestrahlung und jeweils

eine Urinprobe zu den Wiedervorstellungsterminen bzw. bei erneuter Bisphosphonatgabe zwei bis acht Wochen nach Abschluss der Bestrahlung gesammelt.

Insgesamt wurden 188 Urinproben (140 Urinproben während der Bestrahlung, 48 Urinproben nach Abschluss der Therapie) nach Aufbereitung mittels HPLC analysiert. Untersucht wurden hierbei die Konzentrationen der Kollagenabbauprodukte HP und LP im Urin. In Gruppe B konnte ein Absinken der durchschnittlichen HP- und LP-Konzentrationen während der Bestrahlung um 14 % bzw. 37 % im Vergleich zu den Ausgangswerten beobachtet werden. Im Gegensatz zu Gruppe B wurde in Gruppe A zunächst ein Anstieg der HP- bzw. LP-Konzentrationen während der ersten Bestrahlungswoche gesehen (um 20 % bzw. 23 %). Im weiteren Verlauf der Bestrahlung war jedoch auch in dieser Gruppe eine Tendenz zu sinkenden HP- und LP-Konzentrationen zu beobachten. Zu keinem Entnahmezeitpunkt konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Der Verlauf der Marker in Gruppe B kann jedoch als Hinweis auf eine osteoprotektive Wirkung der Bisphosphonate während der Bestrahlung gedeutet werden.

8 Literaturverzeichnis

Literatur

- [1] Ail Y, Brinckmann J, Notbohm H, Mller P, Btge B.
Changes with age in the urinary excretion of hydroxylslypyridinoline (HP) and lysylpyridinoline (LP). Scand J Clin Lab Invest. 1996, 56 (3): 275-283.
- [2] Ail Y, Mller PK.
Rapid method for the isolation of the mature collagen cross-links, hydroxylslypyridinoline and lysylpyridinoline.
J Chromatogr A. 1994, 664: 183-188.
- [3] Ail Y, Springer I, Behrens P, Ullrich KP, Hedderich J, Bruns J.
Differential enhancement of collagen crosslink excretion in cases of osteosarcoma and chondrosarcoma.
Clin Oncol. 2003, 129: 583-588.
- [4] Ail Y, Springer I, Niehoff P, Gaßling, V.
Proof of direct radiogenic destruction of collagen in vitro.
Strahlenther Onkol. 2007, 183 (7): 374-379.
- [5] Adamietz IA, Schneider O, Mller RP.
Results of a nationwide survey on radiotherapy of bone metastases in Germany.
Strahlenther Onkol. 2002, 178 (10): 531-536.
- [6] kesson K.
Biochemical markers of bone turnover. A review.
Acta Orthoped Scand. 1995, 66 (4): 376-386.
- [7] Aparicio A, Gardner A, Tu Y, Savage A, Berenson J, Lichtenstein A.
In vitro cytoreductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates.
Leukemia. 1998, 12: 220-229.

- [8] Arbault P, Grimaux M, Pradet V, Preaudat C, Seguin P, Delmas PD.
Assessment of urinary pyridinoline excretion with a specific enzyme-linked immunosorbent assay in normal adults and in metabolic bone disease.
Bone. 1995, 16 (4): 461-467.
- [9] Arrington SA, Damron TA, Mann KA, Allen MJ.
Concurrent administration of zoledronic acid and irradiation leads to improved bone density, biomechanical strength, and microarchitecture in a mouse model of tumor-induced osteolysis.
J Surg Oncol. 2008, 97 (3): 284-290.
- [10] Badros A, Weikel D, Salama A, Goloubeva O, Schneider A, Rapoport A, Fenton R, Gahres N, Sausville E, Ord R, Meiller T.
Osteonecrosis of the jaw in multiple myeloma patients: clinical features and risk factors.
J Clin Oncol. 2006, 24 (6): 945-952.
- [11] Bamberg M, Molls M, Sack H (Hrsg.).
Radioonkologie, Band 2, Klinik.
W. Zuckschwerdt Verlag, München. 2004, 1119-1128.
- [12] Beardsworth LJ, Eyre DR, Dickson IR.
Changes with age in the urinary excretion of lysyl- and hydroxylysylpyridinoline, two new markers of bone collagen turnover.
J Bone Mineral Res. 1990, 5 (7): 671-676.
- [13] Behrens P, Bruns J, Ullrich KP, Açil Y, Gille J.
Pyridinoline cross-links as markers for primary and secondary bone tumors.
Scand J Clin Lab Invest. 2003, 63 (1): 37-44.
- [14] Bekanntmachung des Umweltbundesamtes.
Normierung von Stoffgehalten im Urin – Kreatinin. Stellungnahme der Kommission „Human-Biomonitoring“ des Umweltbundesamtes.
Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz. 2005, 48: 616-618.

- [15] Berenson JR, Rosen LS, Howell A, Porter L, Coleman RE, Morley W, Dreicer R, Kuross SA, Lipton A, Seaman JJ.
Zoledronic acid reduces skeletal-related events in patients with osteolytic metastases.
Cancer. 2001, 91 (7): 1191-1200.
- [16] Berenson JR, Vescio R, Henick K, Nishikubo C, Rettig M, Swift RA, Conde F, von Teichert JM .
A phase I, open label, dose ranging trial of intravenous bolus zoledronic acid, a novel bisphosphonate, in cancer patients with metastatic bone disease.
Cancer. 2001, 91 (1): 144-154.
- [17] Berenson JR, Vescio RA, Rosen LS, Von Teichert JM, Woo M, Swift R, Savage A, Givant E, Hupkes M, Harvey H, Lipton A.
A phase I dose-ranging trial of monthly infusions of zoledronic acid for the treatment of osteolytic bone metastases.
Clin Cancer Res. 2001, 7: 478-485.
- [18] Bluemke DA, Fishman EK, Scott WW.
Skeletal complications of radiation therapy.
RadioGraphics. 1994, 14 (1): 111-121.
- [19] Body JJ, Delmas PD.
Urinary pyridinium cross-links as markers of bone resorption in tumor-associated hypercalcemia.
J Clin Endocrinol Metab. 1992, 74 (3): 471-475.
- [20] Body JJ, Mancini I.
Bisphosphonates for cancer patients: why, how, and when?
Support Care Cancer. 2002, 10 (5): 399-407.
- [21] Böttcher HD, Adamietz IA (Hrsg.).
Klinik der Skelettmastasen. Grundlagen. Diagnostik. Therapie.
W. Zuckschwerdt Verlag, München, Bern, Wien, New York. 1997.

- [22] Bucher O, Wartenberg H.
Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.
Verlag Hans Huber, Bern, Stuttgart, Toronto. 1989, 11. Auflage, 163-200.
- [23] Buddecke E.
Grundriss der Biochemie.
De Gruyter . 1994, 509-521.
- [24] Cafro AM.
Osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma treated with bisphosphonates: definition and management of the risk related to zoledronic acid.
Clin Lymphoma Myeloma. 2008, 8 (2): 111-116.
- [25] Clemens JD, Herrick MV, Singer FR, Eyre DR.
Evidence that serum NTx (collagen-type I N-telopeptide) can act as an immunochemical marker of bone resorption.
Clin Chem. 1997, 43 (11): 2058-2063.
- [26] Coleman RE, Houston S, James I, Rodger A, Rubens RD, Leonard RC, Ford J.
Preliminary results of the use of urinary excretion of pyridinium crosslinks for monitoring metastatic bone disease.
Br J Cancer. 1992, 65 (5): 766-768.
- [27] Coleman RE, Major P, Lipton A, Brown JE, Lee KA, Smith M, Saad F, Zheng M, Hei YJ, Seaman J, Cook R.
Predictive value of bone resorption and formation markers in cancer patients with bone metastases receiving the bisphosphonate zoledronic acid.
J Clin Oncol. 2005, 23 (22): 4925-4935.
- [28] Demers LM, Costa L, Chinchilli VM, Gaydos L, Curley E, Lipton A.
Biochemical markers of bone turnover in patients with metastatic bone disease.
Clin Chem. 1995, 41: 1489-1494.
- [29] Demers LM, Costa L, Lipton A.
Biochemical markers and skeletal metastases.
Cancer. 2000, 88 (12): 2919-2926.

- [30] Diel I, Possinger K.
Bisphosphonate in der Onkologie.
Uni-Med Science Verlag, Bremen. 1999.
- [31] Dörr W, Zimmermann JS, Seegenschmiedt MH (Hrsg.).
Nebenwirkungen in der Radioonkologie. Klinisches Kompendium.
Münchener medizinische Taschenbücher, Urban und Vogel, München. 2000, 211-227.
- [32] Drenckhahn D, Zenker W (Hrsg.).
Benninghoff Anatomie Band 1.
Urban und Schwarzenberg Verlag, München . 1994, 15 Auflage, 124-159.
- [33] Eastell R, Calvo MS, Burritt MF, Offord KP, Graham R, Russell G, Riggs BL.
Abnormalities in circadian patterns of bone resorption and renal calcium conservation in Type I osteoporosis.
J Clin Endocrinol Metab. 1992, 74 (3): 487-494.
- [34] Eyre D.
New biomarkers of bone resorption.
J Clin Endocrinol Metab. 1992, 74 (3): 470A-C.
- [35] Eyre DR, Koob TJ, Van Nees KP.
Quantitation of hydroxypyridinium crosslinks in collagen by high-performance liquid chromatography.
Anal Biochem. 1984, 137: 380-388.
- [36] Fleisch H.
Bisphosphonates. Pharmacology and use in the treatment of tumor-induced hypercalcaemic and metastatic bone disease.
Drugs. 1991, 42 (6): 919-944.
- [37] Fontana A, Delmas PD.
Markers of bone turnover in bone metastases.
Cancer. 2000, 88 (12): 2952-2960.

- [38] Fromigue O, Lagneaux L, Body JJ.
Bisphosphonates induce breast cancer cell death in vitro.
J Bone Miner Res. 2000, 15 (11): 2211-2221.
- [39] Fujimoto D, Moriguchi T, Ishida T, Hayashi H.
The structure of pyridinoline, a collagen crosslink.
Biochem Biophys Res Commun. 1978, 84 (1): 52-57.
- [40] Fujimoto D, Suzuki M, Uchiyama A, Miyamoto S, Inoue T.
Analysis of pyridinoline, a cross-linking compound of collagen fibers, in human urine.
J Biochem (Tokyo). 1983, 94 (4): 1133-1136.
- [41] Gaßling V.
*Veränderungen der Extrazellulären Matrix des Knochens durch Gammabestrah-
lung am Beispiel des Schweineknorpels.*
Med. Dissertation, Kiel. 2006.
- [42] Guise TA.
Parathyroid hormone-related protein and bone metastases.
Cancer. 1997, 80 (8): 1572-1580.
- [43] Gunja-Smith Z, Boucek RJ.
Collagen cross-linking compounds in human urine.
Biochem J. 1981, 197: 759-762.
- [44] Hermes D, Beier P, Peters K.
Bisphosphonatassoziierte Nekrosen der Kiefer.
Onkologe. 2008, 14 (8): 821-827.
- [45] Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M, Nooka A,
Sayegh G, Guarneri V, Desrouleaux K, Cui J, Adamus A, Gagel RF, Hortobagyi
GN.
*Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer
patients treated with intravenous bisphosphonates.*
J Bone Miner Res. 2008, 23 (6): 826-836.

- [46] Hofmann E.
Medizinische Biochemie systematisch.
Uni-Med ScienceVerlag, Bremen. 2006, 783-800.
- [47] Hoskin PJ, Stratford MRL, Folkes LK, Regan J, Yamold JR.
Effect of local radiotherapy for bone pain on urinary markers of osteoclast activity.
Lancet. 2000, 355: 1428-1429.
- [48] Internet.
Leitlinien der Radioonkologie, Strahlentherapie von Knochenmetastasen.
AWMF online.
- [49] Izumi M, Nakanishi Y, Takayama K, Kimotsuki K, Inoue K, Wataya H, Minami T, Hara N.
Diagnostic value of bone-turnover metabolites in the diagnosis of bone metastases in patient with lung carcinoma.
Cancer. 2001, 91 (8): 1487-1493.
- [50] Kanis JA.
Bone and cancer: pathophysiology and treatment of metastases.
Bone. 1995, 17 (2) Supplement: 101S-105S.
- [51] Kanis JA, McCloskey EV.
Bone turnover and biochemical markers in malignancy.
Cancer. 1997, 80 (8): 1538-1545.
- [52] King AE, Umland EM.
Osteonecrosis of the jaw in patients receiving intravenous or oral bisphosphonates.
Pharmacotherapy. 2008, 28 (5): 667-677.
- [53] Koswig S, Buchali A, Böhmer D, Schlenger L, Budach V.
Palliative Strahlentherapie von Knochenmetastasen. Eine retrospektive Analyse von 176 Patienten.
Strahlenther Onkol. 1999, 175 (10): 509-514.

- [54] Koswig S, Budach V.
Remineralisation und Schmerzlinderung von Knochenmetastasen nach unterschiedlich fraktionierter Strahlentherapie (10mal 3 Gy vs. 1mal 8 Gy).
 Strahlenther Onkol. 1999, 175 (10): 500-508.
- [55] Kouloulis V, Matsopoulos G, Kouvaris J, Dardoufas C, Bottomley A, Varela M, Uzunoglu N, Antypas C, Metafa A, Moulopoulos A, Sandilos P, Vlahos L.
Radiotherapy in conjunction with intravenous infusion of 180 mg of disodium pamidronate in management of osteolytic metastases from breast cancer: clinical evaluation, biochemical markers, quality of life, and monitoring of recalcification using assessments of gray-level histogram in plain radiographs.
 Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2003, 57 (1): 143-157.
- [56] Krempien R, Huber PE, Harms W, Treiber M, Wannemacher M, Krempien B.
Combination of early bisphosphonate administration and irradiation leads to improved remineralization and restabilization of osteolytic bone metastases in an animal tumor model.
 Am Cancer Soc. 2003, 98 (6): 1318-1324.
- [57] Kyrgidis A, Vahtsevanos K, Koloutsos G, Andreadis Ch; Boukovinas I, Teioudis Z, Patrikidou A, Triaridis S.
Bisphosphonat-related osteonecrosis of the jaws: a case control study of risk factors in breast cancer patients.
 J Clin Oncol. 2008, 26 (28): 4634-4638.
- [58] Lehrer S, Montazem A, Ramanathan L, Pessin-Minsley M, Pfail J, Stock RG, Kogan R.
Normal serum bone markers in bisphosphonat-induced osteonecrosis of the jaws.
 Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008, 106 (3): 389-391.
- [59] Lipton A, Demers L, Daniloff Y, Curley E, Hamilton C, Harvey H, Witters L, Seaman J, van der Giessen R, Seyedin S.
Increased urinary excretion of pyridinium cross-links in cancer patients.
 Clin Chem. 1993, 39: 614-618.

- [60] Major P.
Optimal management of metastatic bone disease.
Eur J Oncil Nurs. 2007, 11 Suppl 2: 32-37 .
- [61] Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V.
Bisphosphonates-induced exposed bone (osteonecrosis/ osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention and treatment.
J Oral Maxillofac Surg. 2005, 63 (11): 1567-1575 .
- [62] Mitchell MJ, Logan PM.
Radiation-induced changes in bone.
RadioGraphics. 1998, 18 (5): 1125-1136.
- [63] Mundy GR.
Mechanisms of bone metastasis.
Cancer. 1997, 80 (8): 1546-1556.
- [64] Murad OM, Arora S, Farag AF, Guber HA.
Bisphosphonates and osteonecrosis of the jaw: a retrospective study.
Endocr Pract. 2007, 13 (3): 232-238.
- [65] Niehoff P, Wiltfang J, Springer IN, Weppner N, Kimmig B, Açil Y.
Increased excretion of collagen crosslinks in irradiated patients indicates destruction of collagen.
Int J Radiat Biol. 2006, 82 (7): 503-509.
- [66] Pavlakis N, Schmidt R, Stockler M.
Bisphosphonates for breast cancer.
Cochrane Database Syst Rev. 2005, July 20 (3): CD003474.
- [67] Pecherstorfer M, Zimmer-Roth I, Schilling T, Woitge HW, Schmidt H, Baumgartner G, Thiébaud D, Ludwig H, Seibel MJ.
The diagnostic value of urinary pyridinium cross-links of collagen, serum total alkaline phosphatase, and urinary calcium excretion in neoplastic bone disease.
J Clin Endocrinol Metab. 1995, 80 (1): 97-103.

- [68] Pectasides D, Farmakis D, Nikolaou M, Kanakis I, Kostopoulou V, Papaconstantinou I, Gaglia A, Karamanos NK, Economopoulos T, Raptis SA.
Diagnostic value of bone remodeling markers in the diagnosis of bone metastases in patients with breast cancer.
J Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2005, 37: 171-176.
- [69] Pectasides D, Farmakis D, Nikolaou M, Kanakis I, Kostopoulou V, Papaconstantinou I, Karamanos M, Economopoulos T, Raptis SA.
Clinical value of bone remodeling markers in patients with bone metastasis treated with zoledronic acid.
Anticancer Res. 2005, 25 (2B): 1457-1463.
- [70] Pedrazzoni M, Alfano FS, Gatti C, Fantuzzi M, Girasole G, Campanini C, Bassini G, Passeri M.
Acute effects of bisphosphonates on new and traditional markers of bone resorption.
Calcif Tissue Int. 1995, 57: 25-29.
- [71] Perry CM, Figgitt DP.
Zoledronic Acid. A review of its use in patients with advanced cancer.
Drugs. 2004, 64 (11): 1197-1211.
- [72] Rieden K, Adolph J, Lellig U, zum Winkel K.
Strahlentherapeutischer Effekt bei Knochenmetastasen in Abhängigkeit von der Metastasenhäufigkeit, Metastasenlokalisation und der Histologie des Primärtumors.
Strahlenther Onkol. 1989, 165 (5): 380-385.
- [73] Rodan GA, Fleisch HA.
Bisphosphonates: mechanisms of action.
J Clin Invest. 1996, 97 (12): 2692-2696.

- [74] Rosen LS, Gordon D, Kaminsky M, Howell A, Belch A, Mackey J, Apffelstaedt J, Hussein MA, Coleman RE, Reitsma DJ, Chen BL, Seaman JJ.
Long-term efficacy and safety of zoledronic acid compared with pamidronate disodium in the treatment of skeletal complications in patients with advanced multiple myeloma or breast carcinoma. A randomized, double-blind, multicenter, comparative trial.
Cancer. 2003, 98 (8): 1735-1744.
- [75] Rosen LS, Gordon D, Tchekmedyian NS, Yanagihara R, Hirsh V, Krzakowski M, Pawlicki M, de Souza P, Zheng M, Urbanowitz G, Reitsma D, Seamen J .
Long-term efficacy and safety of zoledronic acid in the treatment of skeletal metastases in patients with nonsmall cell lung carcinoma and other solid tumors. A randomized, Phase III, double-blind, placebo-controlled trial .
Cancer. 2004, 100 (12): 2613-2621.
- [76] Ruggiero SL.
Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws.
Compend Contin Educ Dent. 2008, 29 (2): 96-98, 100-102, 104-105.
- [77] Saad F, Gleason DM, Murray R, Tchekmedyian S, Venner P, Lacombe L, Chin JL, Vinholes JJ, Goas JA, Zheng M.
Long-term efficacy of zoledronic acid for the prevention of skeletal complications in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer.
J Natl Cancer Inst. 2004, 96 (11): 879-882.
- [78] Samma S, Kagebayashi Y, Yasukawa M, Fukui Y, Ozono S, Hirao Y, Sato H, Okajima E.
Sequential changes of urinary pyridinoline and desoxypyridinoline as markers of metastatic bone tumor in patients with prostate cancer: a preliminary study.
Jpn J Clin Oncol. 1997, 27 (1): 26-30.
- [79] Schlemmer A, Hassager C, Jensen SB, Christiansen C.
Marked diurnal variation in urinary excretion of pyridinium cross-links in premenopausal women .
J Clin Endocrinol Metab. 1992, 74 (3): 476-480.

- [80] Schmitt J, Abolmaali ND, Höller U, Schiemann M, Obert K, Jacobi V, Vogl TJ.
Pelvine Osteoradionekrosen: Magnetresonanztomographische Charakteristika.
Fortschr. Röntgenstr. 2002, 174: 76-81.
- [81] Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP.
Urinary pyridinium crosslinks of collagen. Specific markers of bone resorption in metabolic bone disease.
Trends Endocrinol Metab. 1992, 3 (7): 263-270.
- [82] Springer IN, Niehoff P, Warnke PH, Böcek G, Kovacs G, Suhr M, Wiltfang J, Açil Y.
Radiation caries-radiogenic destruction of dental collagen.
Oral Oncol. 2005, 41: 723-728.
- [83] Springer ING, Terheyden H, Dunsche A, Czech N, Suhr MAA, Tiemann M, Hedderich J, Açil Y.
Collagen crosslink excretion and staging of oral cancer.
Br J Cancer. 2003, 88: 1105-1110.
- [84] Takeuchi SI, Arai K, Saitoh H, Yoshida KI, Miura M.
Urinary pyridinoline and desoxypyridinoline as potential markers of bone metastasis in patients with prostate cancer.
J Urol. 1996, 156 (5): 1691-1695.
- [85] Uebelhart D, Gineyts E, Chapuy MC, Delmas PD.
Urinary excretion of pyridinium crosslinks: a new marker of bone resorption in metabolic bone disease.
Bone Miner. 1990, 8 (1): 87-96.
- [86] Ural AU, Avcu F, Baran Y.
Bisphosphonate treatment and radiotherapy in metastatic breast cancer.
Med Oncol. 2008, 25 (3): 350-355.
- [87] Vinholes J, Guo CY, Purohit OP, Eastell R, Coleman RE.
Metabolic effects of pamidronate in patients with metastatic bone disease.
Br J Cancer. 1996, 73 (9): 1089-1095.

- [88] Walls J, Assiri A, Howell A, Rogers E, Ratcliffe WA, Eastell R, Bundred NJ.
Measurement of urinary collagen cross-links indicate response to therapy in patients with breast cancer and bone metastases.
Br J Cancer. 1999, 80 (8): 1265-1270.
- [89] Walne AJ, Jenkins PJ, James IT, Plowman PN.
Pyridinium crosslinks in monitoring of patients with bone metastases from carcinoma of the breast.
Clin Oncol. 1997, 9: 30-34.
- [90] Weber W, Rösler HP, Doll G, Dostert M, Kutzner J, Schild H.
Perkutane Radiatio osteolytischer Knochenmetastasen – eine Verlaufsbeurteilung.
Strahlenther Onkol. 1992, 168 (5): 275-280.
- [91] Wellington K, Goa KL.
Zoledronic Acid. A Review of its use in the management of bone metastases and hypercalcaemia of malignancy.
Drugs. 2003, 63 (4): 417-437.
- [92] Weppner N.
Analytischer Nachweis erhöhter Ausscheidung von Kollagenquerverbindungen (Hydroxylysylpyridinolin und Lysylpyridinolin) bei bestrahlten Patienten.
Med. Dissertation Kiel. 2006.
- [93] Wessel JH, Dodson TB, Zavras AI.
Zoledronat, smoking, and obesity are strong risk factors for osteonecrosis of the jaw: a case-control study.
J Oral Maxillofac Surg. 2008, 66 (4): 625-631.
- [94] Williams HJ, Davies AM.
The effect of X-rays on bone: a pictorial review.
Eur Radiol. 2006, 16: 619-633.
- [95] Yuen KK, Shelley M, Sze WM, Wilt T, Mason MD.
Bisphosphonates for advanced prostate cancer.
Cochrane Database Syst Rev. 2006, Oct 18, (4): CD006250.

9 Anhang

9.1 HP-Werte aller Patienten

9.1.1 Gruppe A

Tabelle 8: Urinkonzentrationen von HP (in nmol/mmol Kreatinin) aller Patienten in Gruppe A zu den Entnahmezeitpunkten P0, P1, P2, P1F und P2F.

Patient	Entnahmezeitpunkt				
	P0	P1	P2	P1F	P2F
A001Y	163,86	178,42	119,57	203,69	187,98
A002Y	208,90	210,57	237,51	230,98	187,06
A003Y	65,75	38,27	38,00	36,15	25,05
A004X	94,60	92,16	108,03	112,19	
A005Y	29,78	32,70	34,01	33,48	42,60
A007Y	81,83	105,35	65,74		
A009X	65,92	75,99		33,49	53,34
A010Y	40,38	35,30	35,51	32,83	32,89
A011X		287,56	112,15	163,47	
A012X	145,75	182,17	101,54	97,79	83,08
A013X	199,45	251,18			
A014Y	94,42	131,50	108,16	93,42	
A015X	73,14	61,04	42,99		124,73
A016Y		57,20	100,81		
A017X	140,05	118,37		23,39	
A018X	56,53	55,41	60,81	112,18	
A019Y	47,01	71,45	40,93	77,38	69,30
A020Y	56,93		77,29		
A021X	47,88	58,17		31,10	
A022Y	79,15	101,62	118,42		

9.1.2 Gruppe B

Tabelle 9: Urinkonzentrationen von HP (in nmol/mmol Kreatinin) aller Patienten in Gruppe B zu den Entnahmezeitpunkten P0, P1, P2, P1F und P2F.

Patient	Entnahmezeitpunkt				
	P0	P1	P2	P1F	P2F
B001Y	241,67	354,24		109,61	102,41
B002X	112,43	74,92	91,81	87,65	
B003X		119,08	119,66	83,49	88,04
B004X	97,14	60,20	54,31	36,59	70,66
B005Y	36,06	142,73	118,42	122,80	88,38
B007X	254,31	165,28	421,90	194,30	175,98
B008Y	131,64	106,11	71,22		
B009Y	145,94	84,87		180,55	171,17
B010X	246,39	196,76	134,38	170,71	
B011X	73,45	30,84	43,86	59,34	
B012Y	195,21	117,40			
B013Y	76,72	75,53	54,95	63,04	81,50
B014X	175,09	66,00			227,48
B015X	232,65	300,49	407,56		
B016Y	37,26	45,69	32,07	68,97	
B017X	127,55	72,25	46,62		
B018X	76,43	36,52	11,03		
B019Y	122,90	176,42	94,74		
B020Y	126,63	110,42			
B021Y	43,99	55,81	33,62		

9.2 LP-Werte aller Patienten

9.2.1 Gruppe A

Tabelle 10: Urinkonzentrationen von LP (in nmol/mmol Kreatinin) aller Patienten in Gruppe A zu den Entnahmezeitpunkten P0, P1, P2, P1F und P2F.

Patient	Entnahmezeitpunkt				
	P0	P1	P2	P1F	P2F
A001Y	29,05	43,51	23,41	33,04	30,39
A002Y	39,08	45,11	49,45	45,66	34,32
A003Y	17,13	13,74	8,45	7,09	5,99
A004X	20,14	25,43	27,62	17,81	
A005Y	5,19	4,98	4,69	4,24	5,85
A007Y	20,04	28,41	10,73		
A009X	21,54	19,43		6,19	7,99
A010Y	8,82	9,21	6,11	5,42	5,56
A011X		49,79	16,78	21,91	
A012X	33,74	37,42	21,19	19,18	13,12
A013X	32,18	42,35			
A014Y	20,29	27,85	22,00	17,09	
A015X	12,90	13,30	8,86		24,97
A016Y		11,12	11,76		
A017X	26,11	22,94		4,31	
A018X	18,82	14,49	11,09	19,00	
A019Y	9,37	14,63	9,62	12,39	11,80
A020Y	9,64		13,00		
A021X	8,38	13,09		3,42	
A022Y	14,94	18,58	20,58		

9.2.2 Gruppe B

Tabelle 11: Urinkonzentrationen von LP (in nmol/mmol Kreatinin) aller Patienten in Gruppe B zu den Entnahmezeitpunkten P0, P1, P2, P1F und P2F.

Patient	Entnahmezeitpunkt				
	P0	P1	P2	P1F	P2F
B001Y	46,37	79,32		43,87	39,30
B002X	22,27	12,10	14,01	13,76	
B003X		15,33	13,96	10,64	13,00
B004X	23,79	11,62	10,65	7,39	13,82
B005Y	6,85	18,91	16,31	16,15	10,95
B007X	58,00	26,79	63,68	26,24	27,82
B008Y	28,29	23,30	11,18		
B009Y	26,02	10,88		27,03	28,24
B010X	51,42	29,91	22,27	27,39	
B011X	19,05	8,30	11,63		
B012Y	54,65	71,57			
B013Y	13,50	9,72	8,04	10,48	11,35
B014X	34,11	7,78			37,94
B015X	65,50	68,71	75,80		
B016Y	4,64	10,36	6,41	17,50	
B017X	47,39	16,41	13,97		
B018X	23,58	9,10	2,91		
B019Y	25,42	37,82	13,63		
B020Y	17,30	16,95			
B021Y	10,07	12,79	3,75		

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Dr. B. Kimmig danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die Freistellung zur Durchführung des praktischen Teils der Arbeit.

Herrn PD Dr. P. Niehoff möchte ich ebenfalls für die Überlassung des Themas danken. Danke auch für das offene Ohr und die vielen Impulse.

Herrn Prof. Dr. Dr. J. Wiltfang danke ich dafür, dass er mir die wissenschaftlichen Laboratorien der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie zur Durchführung der Laboranalysen zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Prof. Dr. Y. Açil danke ich für seine konkreten Anregungen zum Abfassen der Arbeit sowie seine kompetenten Antworten auf all meine laborspezifischen Fragen.

Frau G. Otto danke ich herzlich für die – sowohl fachlich als auch insbesondere menschlich – überaus positive gemeinsame Zeit im Labor.

Dem gesamten Team der Strahlentherapie des UKSH, Campus Kiel, Ärzten, MTRA sowie Pflegepersonal, danke ich für die Unterstützung und das eifrige Sammeln der Proben. Eure zuverlässige Hilfe war für mich eine riesige Erleichterung.

Einen besonderen Dank möchte ich Rosine Engel, Elsbeth Sig-Onje und Siggli L'Urs aussprechen. Schön, dass es Euch gibt!

11 Lebenslauf

Name	Milica Reutemann geb. Živaljević
geboren am	05.09.1975
in	Vršac (Serbien)
Familienstand	verheiratet
Eltern	Radomir Živaljević Ružica Živaljević geb. Gerlach
09/1982 – 08/1985	2. Oberschule Käthe Dunker, Ost-Berlin (DDR)
09/1985 – 08/1989	Vuk Stefanović Karadžić Schule, Vršac (Jugoslawien)
09/1989 – 12/1989	Kepler-Gymnasium, Freiburg im Breisgau
12/1989 – 08/1992	St. Ursula-Mädchengymnasium, Freiburg im Breisgau
09/1992 – 06/1995	Herder-Gymnasium, Frankfurt am Main (Abschluss: Allgemeine Hochschulreife)
10/1995 – 11/2002	Studium der Humanmedizin an der Johann Wolfgang Goethe Universität, Frankfurt am Main
11/2002	Ärztliche Prüfung
02/2003 – 07/2004	Ärztin im Praktikum in der Universitätsklinik Frankfurt am Main, Zentrum der Radiologie, Klinik für Strahlentherapie, Frankfurt am Main
08/2004 – 09/2005	Assistenzärztin in der Universitätsklinik Frankfurt am Main, Zentrum der Radiologie, Klinik für Strahlentherapie, Frankfurt am Main
seit 10/2005	Assistenzärztin am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Zentrum der Radiologie, Klinik für Strahlen- therapie, Kiel