

Entwicklung und Anwendung NMR-spektroskopischer Methoden in der Diagnose von Krebserkrankungen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Frauke Süllentrop

aus Köln

2001

Berichterstatter:

Prof. Dr. J. Hahn

Prof. Dr. D. Naumann

Tag der mündlichen Prüfung:

22.02.2001

Die experimentellen Untersuchungen zu der vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von September 1997 bis Juni 2000 im Institut für Anorganische Chemie der Universität zu Köln unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. J. Hahn am Lehrstuhl von Herrn Prof. Dr. D. Naumann durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. D. Naumann danke ich für die großzügige Unterstützung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. Schicha und Herrn Dr. D. Moka danke ich für das Zustandekommen dieser interdisziplinären Arbeit und für die Beratung in medizinischen Fragestellungen.

Mein besonderer Dank gilt allerdings Herrn Prof. Dr. J. Hahn für die Bereitstellung dieses Themas und für seine ständige Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	iv
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeine Vorbemerkungen	1
1.2 Historische Entwicklung der NMR-Spektroskopie in der Medizin	1
1.3 Einsatzmöglichkeiten der NMR-Spektroskopie bei der Untersuchung von Patienten mit Tumorerkrankungen.....	2
1.4 Aufgabenstellung	5
2 Ergebnisse und Diskussion.....	8
2.1 Auswirkungen von Krebserkrankungen auf den Lipidstoffwechsel	8
2.1.1 Allgemeines zu Lipiden	8
2.1.2 Tumorerkrankungen und Lipide.....	9
2.1.3 Nierenzellkarzinom.....	12
2.1.4 Ovarialkarzinom	17
2.2 In-vitro ³¹ P- und ¹ H-NMR-spektroskopische Untersuchungen von Blutplasma.....	23
2.2.1 Methodik	23
2.2.2 Probenvorbereitung und Probenhaltbarkeit	23
2.2.3 Bedingungen für die Aufnahme und quantitative Auswertung der ³¹ P-NMR-Spektren	26
Allgemeines	26
Standardlösung.....	29
Spektroskopie, Wahl der Aufnahmeparameter	35
Spektroskopie, Signalzuordnung	38
2.2.4 Bedingungen für die Aufnahme und quantitative Auswertung der ¹ H- NMR-Spektren.....	41
Allgemeines	41
Standardlösung.....	42
Spektroskopie, Wahl der Aufnahmeparameter	43
Spektroskopie, Signalzuordnung	51
2.2.5 Patienten- und Probandenkollektiv	55
2.2.5.1 Allgemeines.....	55
Ausschlußkriterien	55
Blutentnahme	55
Einteilung der verschiedenen Kollektive	55
2.2.5.2 Patientenkollektiv.....	56
³¹ P-NMR-Spektroskopie.....	56
¹ H-NMR-Spektroskopie	57
2.2.5.3 Probandenkollektiv.....	57
³¹ P-NMR-Spektroskopie.....	57
Auswahl der Probandensubkollektive für die ³¹ P-NMR- spektroskopischen Messungen.....	57

	Geschlechtsspezifische Untersuchung für ältere Probanden.....	58
	Geschlechtsspezifische Untersuchung für jüngere Probanden....	59
	Altersspezifische Untersuchung für weibliche Probanden	61
	Altersspezifische Untersuchung für männliche Probanden	63
	Demographischer Vergleich von Patienten- und Probandenkollektiven für die ^{31}P -NMR-spektroskopischen Messungen	65
	^1H -NMR-Spektroskopie	66
	Geschlechtsspezifische Untersuchung des Probandenkollektivs...	66
2.3	Ergebnisse der ^{31}P -NMR-spektroskopischen Untersuchungen	69
2.3.1	Zum Nierenzellkarzinom	69
	Gesamtvergleich.....	70
	Vergleich LPC/PC	73
	Einfluß des Tumorstadiums auf die Phospholipidwerte	73
	Einfluß des Tumorstadiums auf die Konzentration des anorganischen Phosphats	76
	Patienten in Remission	77
	Geschlechtsspezifische Unterschiede der Phospholipidkonzentrationen	79
	Altersspezifische Unterschiede.....	80
	Abgrenzung zu anderen Tumoren der Niere	80
2.3.2	Zum Dickdarmkarzinom	81
	Gesamtvergleich.....	81
	Spezifische Betrachtungen	83
2.3.3	Zum Ovarialkarzinom.....	84
	Gesamtvergleich.....	84
	Einfluß des Tumorstadiums	86
	Einfluß von Metastasen	88
	Vergleich der Phospholipidkonzentrationen vor und kurz nach der Operation	89
	Altersspezifische Betrachtung	91
2.3.4	Zum Mammakarzinom.....	91
	Gesamtvergleich.....	92
	Einfluß des Tumorstadiums auf die Phospholipidwerte	93
	Altersspezifische Betrachtung	95
2.3.5	Vergleich der Phospholipidkonzentrationen von Patienten mit unterschiedlichen Karzinomarten.....	96
	Vergleich Nierenzellkarzinom mit Dickdarmkarzinom	96
	Vergleich Ovarialkarzinom mit Mammakarzinom	98
2.3.6	Vergleich der jüngeren Probanden mit den verschiedenen Kollektiven der Kranken	102
2.4	Ergebnisse der ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen.....	102
2.4.1	Zu Patienten mit Nierenzellkarzinomen	102
	Gesamtvergleich.....	103
	Einfluß des Tumorstadiums	109
	Einfluß von Metastasen	110
2.4.2	Zu den Patienten mit Ovarialkarzinomen	111
	Einfluß des Tumorstadiums	114

Einfluß von Metastasen	115
Vergleich der Patientinnen vor und kurz nach der Operation	116
Einfluß des Alters.....	118
2.5 In-vivo ¹ H-NMR-spektroskopische Untersuchungen von Patienten mit Nierenzellkarzinomen	118
2.5.1 Allgemeines.....	118
2.5.2 Bedingungen für die Aufnahme der in-vivo ¹ H-NMR-Spektren und Ergebnisse der Untersuchungen	120
Allgemeines	120
Spektroskopie, Wahl der Aufnahmeparameter	121
Spektroskopie, Zuordnung und Ergebnisse der Untersuchungen	124
2.6 Diskussion.....	130
Gesunde	130
Patienten	131
Patienten mit Nierenzellkarzinom	131
Patienten mit Dickdarmkarzinom	135
Patientinnen mit Ovarialkarzinom	137
Patientinnen mit Mammakarzinom	138
Patienten mit Nierenzellkarzinom, in-vivo NMR-spektroskopische Untersuchungen.....	140
3 Experimenteller Teil	142
3.1 Geräte	142
3.2 Dekonvolution von NMR-Signalen	142
Dekonvolution mit dem Programm PERCH	142
4 Zusammenfassung und Ausblick	152
5 Anhang.....	158
5.1 Zum Lipidstoffwechsel.....	158
Fettsäuren ^{19,22}	158
Triacylglycerine ^{19,22}	160
Cholesterin ^{19,22}	161
Phospholipide.....	163
6 Literaturverzeichnis	172

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
CL	Cardiolipin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FID	Free Induction Decay
HDL	High Density Lipoproteine
LDL	Low Density Lipoproteine
LPC	Acyl-Lysophosphatidylcholin
LPC1	1-Acyl-Lysophosphatidylcholin
LPC2	2-Acyl-Lysophosphatidylcholin
MDP	Methylendiphosphonsäure
NC	Nierenzellkarzinom
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
PC	Phosphatidylcholin
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	Phosphatidylinositol
Pi	anorganisches Phosphat
PMG	N-Phosphonomethylglycin
ppm	Parts Per Million
PS	Phosphatidylserin
SM	Sphingomyelin
S/R-Verhältnis	Signal/Rausch-Verhältnis
SW	Spektrenweite
TD	Time Domain
TMSP	Tetradeterotrimethylsilylpropionat
VLDL	Very Low Density Lipoproteine

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Vorbemerkungen

1946 gelang den beiden Arbeitsgruppen von Bloch¹ und Purcell² unabhängig voneinander der erste Nachweis von Kernspinresonanzsignalen. In der Chemie hat die Kernresonanzspektroskopie seitdem eine breite Anwendung in der Strukturaufklärung und Konzentrationsbestimmung in flüssigen Medien und in jüngster Zeit auch zur Untersuchung von Festkörpern gefunden.

Doch nicht nur Chemiker nutzen die Kernresonanzspektroskopie. In der Medizin ist die Kernspintomographie, neben der Positronenemissionstomographie, das jüngste der sogenannten bildgebenden Verfahren und die einzige Methode, die Bildgebung und Analytik miteinander zu verbinden vermag.

In der vorliegenden Arbeit wird diese Verbindung genutzt um, mit Hilfe der in-vivo Spektroskopie, Tumoren von Patienten mit Nierenzellkarzinom zu untersuchen. Der Hauptteil dieser Arbeit behandelt allerdings das Gebiet der klassischen hochauflösenden Kernresonanzspektroskopie mit deren Hilfe quantitative Bestimmungen von Lipiden bzw. Phospholipiden im menschlichen Blutplasma vorgenommen wurden.

1.2 Historische Entwicklung der NMR-Spektroskopie in der Medizin

Die Entwicklung der Methode der Kernspintomographie als bildgebendes Verfahren in der Medizin erfolgte in den 70er Jahren dieses Jahrhunderts. In den Krankenhäusern fand diese Methode allerdings erst in den 80er Jahren Verbreitung. Heute ist die Kernspintomographie, bei der mittels Feldgradienten zwei- oder dreidimensionale Bilder von Bereichen des lebenden Organismus erzeugt werden können, zu einer wichtigen Methode im Bereich der Tumorerkennung geworden.

Die Entwicklung der in-vivo Spektroskopie begann mit den Arbeiten von Radda et al.³, sowie Chan et al.⁴ Erstere beschäftigten sich mit der Entwicklung sogenannter Oberflächenspulen, während Letztere eine Möglichkeit fanden, ein homogenes magnetisches Feld nur in dem zu untersuchenden Bereich zu erzeugen. Beiden Gruppen gelang es also eine Möglichkeit zu finden, den zu untersuchenden Bereich zu lokalisieren, eine

wesentliche Voraussetzung für die in-vivo Spektroskopie. Das erste in-vivo Spektrum eines menschlichen Tumors wurde 1983 von Griffiths et al. vorgestellt⁵.

Erstaunlich ist, daß die hochauflösende (in-vitro) Kernresonanzspektroskopie von Körperflüssigkeiten, die als die direkteste Anwendung der NMR-Spektroskopie in der Medizin erscheint, erst in den späten 80er Jahren als jüngste der biomedizinischen NMR-Methoden in Erscheinung trat. Heute machen der mögliche Einsatz von Hochfeldgeräten (800 MHz und höher) und die Entwicklung von 2 D- und sogar 3 D-Experimenten die in-vitro NMR-Spektroskopie (die vorher mit den Problemen bezüglich der Sensitivität und Auflösung zu kämpfen hatte) als analytische Methode in der Medizin interessant.

Seit den 90er Jahren hat außerdem eine weitere Methode Einzug in die biomedizinische Literatur gehalten: die hochauflösende MAS-Spektroskopie, eine Methode, die eine Reihe von Faktoren, die große Linienbreiten bei Gewebeproben verursachen, zu überwinden vermag^{6-7, 8}.

Auch in der Spektrenauswertung hat es im letzten Jahrzehnt, nicht zuletzt dank leistungsfähigerer Computer, Fortschritte gegeben. Für die Analyse komplizierter NMR-Spektren und die Analyse tumorspezifischer Muster in den Spektren werden verschiedene Methoden, die unter dem Begriff „pattern recognition“ zusammengefaßt werden, benutzt und auf ihre Anwendungsmöglichkeiten für den Einsatz bei Routineuntersuchungen hin getestet^{9, 10, 11, 12}.

1.3 Einsatzmöglichkeiten der NMR-Spektroskopie bei der Untersuchung von Patienten mit Tumorerkrankungen

Die meisten Tumore zeichnen sich im Vergleich mit gesundem Gewebe außer durch eine veränderte Zellstruktur auch durch erhebliche Stoffwechselveränderungen der einzelnen Tumorzellen aus^{13,14,-15}. Da Tumore einen nicht unerheblichen Anteil am Gesamtstoffwechsel bzw. bei der Zellneubildung erreichen können, lassen sich die Veränderungen z. T. systemisch* nachweisen¹⁶. Die Quantifizierung und Auswertung solcher Veränderungen war bisher sehr aufwendig und wurde z. B. mittels HPLC oder mit Hilfe enzymatischer Methoden in Körperflüssigkeiten, nach entsprechender Aufbereitung der Proben (und den damit verbundenen Risiken von Artefakten), durchgeführt. Die NMR-

*systemisch = ein bestimmtes Organsystem, i. w. S. den ganzen Organismus betreffend

Spektroskopie bietet nun eine nicht-invasive Methode, mit der tumorspezifische Veränderungen im Tumor selbst (z. B. mittels in-vivo Spektroskopie) aber auch systemische Auswirkungen des Tumors, hier vor allem mit der hochauflösenden in-vitro Spektroskopie, untersucht werden können.

Bei Aufnahme eines NMR-Spektrums lassen sich viele Verbindungen gleichzeitig detektieren. Spektren von normalen und pathologisch (krankhaft) veränderten Körperflüssigkeiten der gleichen Art enthalten oft Signale, die den gleichen Metaboliten zuzuordnen sind, die aber in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen. Die NMR-Spektroskopie ist außerdem geeignet, Serienmessungen durchzuführen. Die Probenvorbereitung ist weder aufwendig noch kompliziert, was auch im Hinblick auf eine routinemäßige Anwendung als sehr wichtig erscheint. Die Probe bleibt außerdem intakt und kann eventuell noch für andere Untersuchungen benutzt werden. Die Kernspintomographie als bildgebendes Verfahren wird schon seit Jahren im Routinebetrieb in Krankenhäusern eingesetzt und ist, z. B. im Gegensatz zur Computertomographie, eine wenig belastende Untersuchungsmethode.

Bei einer Untersuchung mittels in-vitro Spektroskopie gibt es die Möglichkeit, eine Vielzahl von Kernen als NMR-Sonden einzusetzen. In der medizinischen Literatur finden sich jedoch hauptsächlich Untersuchungen, die die Protonen- und Phosphorspektroskopie benutzen, allerdings sind auch schon ^{13}C -markierte Verbindungen untersucht worden. ^{13}C -Kerne sind aber wegen ihres kleineren magnetischen Moments im Verhältnis zu ^1H und ^{31}P sehr unempfindlich. Verbindungen, die Wasserstoff enthalten, kommen in praktisch allen Molekülen lebender Organismen vor. Im Vergleich zum Phosphor zeichnet sich der Wasserstoff durch eine größere Empfindlichkeit aus, allerdings ist der Spektrenaufbau, aufgrund der größeren Zahl an Substanzen in denen Wasserstoffatome vorkommen, wesentlich komplizierter. Die ^{31}P -NMR-Spektroskopie ist gut geeignet, um Körperflüssigkeiten zu untersuchen da der Phosphor mit einer Häufigkeit von 100 % ein relativ empfindlicher Kern und die Zahl der in größerer Menge vorkommenden phosphororganischen Verbindungen begrenzt ist. Die in-vitro ^{31}P -NMR-Spektroskopie bei Krebserkrankungen beschäftigte sich bisher hauptsächlich mit Untersuchungen von Gewebeextrakten und Zellen bzw. Zellkulturen. Untersuchungen von Blutplasma sind selten und vor allem gibt es kaum quantitative Bestimmungen von Metaboliten. Im Vergleich mit der Chromatographie bietet die in-vitro ^{31}P -NMR-Spektroskopie eine bessere Auflösung der Metaboliten des Phospholipidstoffwechsels und außerdem die

Möglichkeit der Detektion von Intermediaten und Produkten der Glykolyse und des Energiestoffwechsels. Je nach Herkunft der untersuchten Probe lassen sich Zucker- und Alkoholphosphate, Nukleinsäuren, Phospholipide und deren Ausgangs- sowie Abbauprodukte und anorganisches Phosphat detektieren. Studien, die sich mit der in-vitro ^1H -NMR-Spektroskopie bei Krebserkrankungen beschäftigen, untersuchen, wie bei der in-vitro ^{31}P -NMR-Spektroskopie auch, hauptsächlich Gewebeextrakte und Zellen sowie Zellkulturen. Wenn es sich um Plasmauntersuchungen handelt, werden meist Extrakte von Plasma verwendet und es gibt kaum quantitative Messungen von unbehandeltem Plasma.

Betrachtet man die Untersuchungen, die sich mit der in-vivo Spektroskopie beschäftigen, so werden auch hier hauptsächlich die ^1H - und ^{31}P -Spektroskopie benutzt. Mit Hilfe der in-vivo ^{31}P -NMR-Spektroskopie ließ sich zum ersten Mal die Rolle von Blut- und Nährstoffversorgung von Tumoren zusammen mit der vermehrten Neubildung von Gefäßen in der Regulierung des Tumormetabolismus untersuchen¹⁷. Studien, in denen die in-vivo ^1H -NMR-Spektroskopie Verwendung findet, sind bisher hauptsächlich an Hirntumoren gemacht worden. Die in-vivo Spektroskopie bietet die Möglichkeit der nicht-invasiven Untersuchung von Stoffwechselprozessen in lebenden Systemen. Die Spektren weisen allerdings Signale mit wesentlich höheren Linienbreiten auf als Signale in in-vitro Spektren. Außerdem ist eine wesentlich höhere Konzentration der Substanzen erforderlich, damit sie detektierbar sind. Weitere Probleme bereiten die geringe Empfindlichkeit bei den niedrigen magnetischen Feldstärken der Ganzkörpertomographen und die Schwierigkeiten bei der genauen Lokalisation der zu untersuchenden Volumenelemente, sowie eine mögliche Heterogenität des Tumorgewebes. Die in-vivo Spektroskopie dient der Untersuchung des Tumors unter realen Bedingungen. Es können jedoch nur selten quantitative Bestimmungen durchgeführt werden. Für die Entwicklung quantitativer Methoden für einen Routineeinsatz muß daher auf die in-vitro Spektroskopie zurückgegriffen werden. Die in-vitro Spektroskopie bietet außerdem den Vorteil, daß sich mit ihr sehr viel geringere Konzentrationen von Substanzen bestimmen lassen und das S/R-Verhältnis sehr viel besser ist.

1.4 Aufgabenstellung

Der Schwerpunkt der hier vorgestellten Arbeit soll auf der Durchführung in-vitro ^{31}P -NMR-spektroskopischer und ^1H -NMR-spektroskopischer Untersuchungen von Blutplasma liegen. Das Ziel ist dabei, eine quantitative Bestimmung der Konzentration an Lipiden, bzw. Phospholipiden im Blutplasma von Patienten mit Krebserkrankungen vorzunehmen und die so erhaltenen Werte mit denen, die für ein gesundes Probandenkollektiv erhalten werden, zu vergleichen. Um diese Untersuchungen durchführen zu können, muß zuerst eine Methode entwickelt werden, mit der die NMR-spektroskopische Bestimmung der Lipid- bzw. Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma quantitativ durchführbar ist. Außerdem sollen ergänzend in-vivo ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchungen an Tumorgewebe eines Patientenkollektivs durchgeführt werden, um die systemischen Auswirkungen des Tumors, die sich im Blutplasma zeigen, mit Veränderungen im Tumorgewebe selbst zu vergleichen.

Lipide, bzw. Phospholipide eignen sich besonders für eine Untersuchung im Hinblick auf tumorspezifische Veränderungen, da der Lipidmetabolismus bei vielen wichtigen zellulären Funktionen, wie z. B. Membranintegrität und -funktion und Signalübertragung eine große Rolle spielt. Tumorgewebe erscheint, wie erwähnt, nicht nur in einer veränderten Zellstruktur und zeichnet sich durch Stoffwechselveränderung aus, Tumorgewebe ist meist sehr schnell wachsendes Gewebe, welches somit auch einen hohen Bedarf an Lipiden aufweist.

Daher ist nicht nur die Untersuchung des Tumors selbst, sondern auch die Untersuchung von systemischen Auswirkungen des Tumors, z. B. im Blut, von Interesse, um mehr über die Beziehung zwischen dem Tumor und seinem „Wirt“ herauszufinden. Blut als Nährstoff- und Sauerstofflieferant enthält selbst Lipide und kommt mit allen Geweben in Kontakt. Tumorgewebe ist oftmals besonders gut durchblutetes Gewebe und eine Metastasierung erfolgt meist ebenfalls über das Blut.

Blutplasma enthält an phosphorhaltigen Komponenten nur Phospholipide und anorganisches Phosphat. Die Veränderungen der Phospholipidkonzentrationen im Blut werden daher mit Hilfe der ^{31}P -NMR-Spektroskopie von nicht vorbehandeltem Blutplasma (keine Extrakte) untersucht. Die anderen Lipide im Blutplasma, wie Triacylglycerine,

Cholesterin, Cholesterinester, aber auch die verschiedenen Lipoproteine*, können dagegen nur mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie untersucht werden und werden es in dieser Arbeit auch. Die ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen werden allerdings nur als Ergänzung der ^{31}P -NMR-spektroskopischen Untersuchungen gesehen, da es bei Untersuchungen von Blut auch schon andere Verfahren gibt, mit denen im Routinebetrieb die Konzentrationen an Lipoproteinen in Blutplasma bestimmt werden können. Außerdem zeichnet sich der Wasserstoff im Gegensatz zum Phosphor zwar, wie bereits erwähnt, durch eine größere Empfindlichkeit aus, so daß die Meßzeit für die Aufnahme der Spektren wesentlich kürzer ist, doch ist der Spektrenaufbau, aufgrund der Vielzahl an Peaks (u. a. auch von Aminosäuren, Fettsäuren, Zucker etc.) wesentlich komplizierter was für eine Anwendung als Routinemethode auch als nachteilig angesehen werden kann.

Als Patientenkollektive für die ^{31}P -NMR-spektroskopischen, bzw. die ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen von Blutplasma werden Patienten mit Nierenzellkarzinomen und Ovarialkarzinomen ausgewählt, da die Diagnose bei beiden Tumorarten meist erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung erfolgt und neue Methoden, die eine frühere Diagnose ermöglichen, einen großen Fortschritt bedeuten würden. Eine Diagnose zum frühestmöglichen Zeitpunkt ist bei diesen Tumorerkrankungen auch deshalb wichtig, weil sich beide Krankheiten durch eine große Aggressivität des Tumors auszeichnen, verbunden mit einer ungünstigen Prognose und einer niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate. Aus den gleichen Gründen sind außerdem neue Erkenntnisse zum Lipidverhalten bei diesen Tumorerkrankungen sehr hilfreich. Zur Abgrenzung zu anderen Tumorarten wurde zusätzlich Blutplasma von Patienten mit Dickdarmkarzinom und Patienten mit Mammakarzinom untersucht. Das Krankheitsbild Dickdarmkarzinom wurde ausgewählt, weil es hierzu bereits eine Untersuchung gibt, die besagt, daß die systemischen Auswirkungen des Dickdarmkarzinoms im Blutplasma mit denen des Nierenzellkarzinoms übereinstimmen¹⁸, eine These, die hier überprüft werden sollte. Das Mammakarzinom als Vergleichstumor wurde ausgewählt, um eine Abgrenzung zu gynäkologischen Tumoren zu ermöglichen.

Für eine Charakterisierung der Lipide in Tumoren selbst, unter Verwendung der in-vivo Spektroskopie, wurden Patienten mit Nierenzellkarzinomen und gesunde Probanden untersucht.

* Erläuterungen zu Lipoproteinen und ihren Funktionen finden sich im nächsten Abschnitt.

Die Voraussetzungen für die Durchführung der spektroskopischen Untersuchungen, sowohl an Patienten wie auch an Probanden bestehen in der Auswahl geeigneter Aufnahmeparameter für die Spektren. Außerdem ist eine Peakzuordnung in den erhaltenen Spektren und für die Durchführung quantitativer Messungen zusätzlich die Auswahl geeigneter Standardsubstanzen erforderlich. Nur so können die Ergebnisse anschließend beurteilt werden und mögliche Korrelationen zwischen spektralen Modifikationen und klinisch relevanten Präsentationen des Tumors erkannt werden. Dabei sind nicht nur der Lipidverbrauch bei verschiedenen Arten von Tumoren (Unterschiede Nierenzellkarzinom/Dickdarmkarzinom, bzw. Ovarialkarzinom/Mammakarzinom) und die daraus resultierenden systemischen Auswirkungen von Interesse, auch eine Korrelation der Veränderungen der Lipidkonzentrationen mit Faktoren wie Tumorgröße und metastatische Verbreitung soll untersucht werden.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Auswirkungen von Krebserkrankungen auf den Lipidstoffwechsel

2.1.1 Allgemeines zu Lipiden

Bevor näher auf die Veränderungen von Lipiden bei Krebserkrankungen im Allgemeinen und bei Nierenzellkarzinomen und Ovarialkarzinomen im Besonderen eingegangen wird, sollen einige allgemeine Eigenschaften dieser besonderen Gruppe von Substanzen aufgezeigt werden. Für weitere Informationen zum Lipidstoffwechsel (Auf- und Abbau von Lipiden) sei auf den Anhang verwiesen. Lipide sind für die Struktur der Zelle und für ihren Stoffwechsel unverzichtbar. Die Lipide mit der größten Stoffwechselbedeutung im tierischen Organismus sind die Triacylglycerine, Phospholipide und Steroide, zusammen mit den aus ihnen abgeleiteten Stoffwechselprodukten wie z. B. langkettige Fettsäuren und Glycerin. Einige Beispiele sollen die Bedeutung der Lipide erläutern: Triacylglycerine sind die wichtigste Energiespeicherform in tierischen Organismen; Cholesterin ist ein wesentlicher Bestandteil der Zellmembran und eine Vorstufe von Steroidhormonen und Gallensäuren; aus Arachidonsäure, einer ungesättigten Fettsäure, werden die sogenannten Eicosanoide hergestellt, welche eine Vielzahl komplexer Prozesse (z. B. Entzündungsreaktionen) kontrollieren; Phospholipide sind weitere wichtige Bestandteile biologischer Membranen, haben einen großen Einfluß auf die Membraneigenschaften, spielen eine große Rolle bei der zellulären Signalübertragung und beeinflussen viele zelluläre Funktionen, wie z. B. das Zellwachstum. Außer als Strukturlipide der Zellmembran und als Depotfett kommen Lipide im Körper als Serumlipide (freie Fettsäuren, in Lipoproteinen) vor^{19,20}. Die vor allem in der Leber gebildeten Lipoproteine stellen die Transportform für verschiedene Lipide im Blut dar. Sie sind sphärische Partikel, die sich aus einem apolaren Kern, bestehend aus apolaren Triacylglycerinen und Cholesterinestern, umgeben von einer (wesentlich polareren) Phospholipidschicht und Cholesterin, durchsetzt von spezifischen Proteinen, den sogenannten Apoproteinen, zusammensetzen. Auf diese Weise wird die Löslichkeit im Blutplasma gewährleistet, da sich die hydrophilen Gruppen der Apoproteine, der Phospholipide und des Cholesterins zur wässrigen Phase, also dem Plasma, mit der hydrophoben Seite dagegen zum apolaren Kern hin orientieren²¹. Klassifiziert werden die Lipoproteine nach ihrer Dichte: als

Lipoproteine mit sehr geringer Dichte (VLDL, „very low density lipoproteine“), Lipoproteine mit geringer Dichte (LDL, „low density lipoproteine“) und Lipoproteine mit hoher Dichte (HDL, „high density lipoproteine“). Des Weiteren lassen sich im Blut noch die IDL („intermediate density lipoproteine“) und die Chylomikronen nachweisen. Die verschiedenen Arten von Lipoproteinen enthalten Triacylglycerine, Cholesterinester, Cholesterin, Phospholipide und Proteine in unterschiedlichen Anteilen. Lipoproteine können sich durch Austausch der Lipidkomponenten und der Apoproteine gegenseitig ineinander umwandeln.

Natürlich vorkommende Zellmembrane lassen sich als sphärisch angeordnete Phospholipiddoppelschichten beschreiben. Sie sind vor allem aus Proteinen und Lipiden aufgebaut. Der relative Anteil dieser Komponenten kann in Abhängigkeit von der Art der Membran sehr unterschiedlich sein. Die Proteine sind vor allem für die katalytischen Leistungen wie Stofftransport, Elektronen- oder Ionentransport verantwortlich. Sie dienen aber auch als Rezeptoren für eine Vielzahl von Substanzen, wie z. B. Hormonen oder Neurotransmitter-Substanzen. Lipide bilden das Grundelement der Membranstruktur und stellen aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften die eigentliche Phasengrenze zwischen zwei wässrigen Kompartimenten (Zellinneres und Zelläußeres) dar²¹. Es gibt drei Hauptgruppen von Membranlipiden: die Glykolipide, Cholesterin und die Phospholipide. Dabei ist das Verhältnis der verschiedenen Phospholipide untereinander von entscheidender Bedeutung für den Funktionszustand der jeweiligen Membran^{22,23}. Neben der Zellmembran gibt es noch viele subzelluläre Bestandteile der Zellen, wie z. B. den Kern, die durch Membranen begrenzt werden¹⁹.

Die Membrane können durch das sogenannte „Flüssig-Mosaikmodell“ beschrieben werden. Dabei „schwimmen“ in der flüssigen Phospholipiddoppelschicht der Membran die Membranproteine, wobei manche Proteine durch die ganze Membran hindurch reichen, andere wiederum nur in ihr stecken. Die Membran ist daher recht flexibel und kann ihre Form leicht verändern, bildet aber trotzdem eine stabile Grenzschicht gegenüber wässrigen Systemen.

2.1.2 Tumorerkrankungen und Lipide

Die folgende Tabelle (Tabelle 1, Seite 11) enthält einen Auszug aus der Vielzahl an Studien, die sich mit NMR-spektroskopisch ermittelten Veränderungen des Lipid- bzw.

Phospholipidgehaltes im Blutplasma (-serum) bzw. Gewebe von Krebspatienten beschäftigen.

Für eine Reihe von Krebsarten lassen sich im Serum der Patienten gleichartige Veränderungen im Lipidmetabolismus feststellen. So ist der Gehalt an Triacylglycerinen in den meisten Fällen erhöht, während die Konzentration an Cholesterin im Vergleich mit Gesunden erniedrigt ist^{13,24,25}. Unter Chemotherapie können sich diese Veränderungen zurückbilden²⁵. Die Erhöhung an Triacylglycerinen und die Erniedrigung an Cholesterin im Serum bei einigen Krebspatienten lassen sich auf erhöhte Werte an Triacylglycerin transportierenden Lipoproteinen (VLDL-Erhöhung) und erniedrigte Werte für Cholesterin transportierende Lipoproteine (HDL-Erniedrigung) zurückführen²⁴. Die Erhöhung des Gehaltes an VLDL im Serum kann dabei u. a. auf eine vermehrte Bildung an VLDL und erniedrigte Resorption aus dem Serum zurückgeführt werden²⁶. Auch andere Studien berichten über erniedrigte Werte an HDL im Serum von Patienten mit Krebserkrankungen^{13,27}. Doch nicht nur der Gehalt an HDL scheint verändert, für Frauen mit fortgeschrittenem Brustkrebs wurde z. B. eine veränderte Zusammensetzung des HDL gefunden. Es enthielt mehr Cholesterin und weniger Phospholipide als HDL im Serum von gesunden Frauen²⁷.

Tabelle 1 NMR-spektroskopisch nachgewiesene Veränderungen im Lipid- und Phospholipidgehalt im Blutplasma (-serum) bzw. Gewebe von Krebspatienten

Untersuchtes Material	Tumorart	Methode	Veränderungen im Vergleich mit gesunden Probanden/ gesundem Gewebe bzw. gutartigen Tumoren
Gewebe	Speiseröhrenkrebs ²⁸	³¹ P-NMR (Extrakte)	PI↑,PC↑,PE↑,SM↓
Gewebe	Lungenkrebs ²⁹	³¹ P-NMR (Extrakte)	PC↑
Gewebe	Dickdarmkarzinome ³⁰	³¹ P-NMR (Extrakte)	LPC↑,PC-plas↑,SM↓,PE-plas↓
Gewebe	Leberkrebs ³¹	³¹ P-NMR (Extrakte)	PEtn↑,PCho↑,GPC↓,GPE↓
Gewebe	Brustkrebs	³¹ P-NMR (Extrakte)	PCr↑,PEtn/PCho↓,GPC↓, GPE↑, Vergleich mit gutartigen Tumoren ³²
Serum	Multiple Myelome ^{*33}	³¹ P-NMR	PE↓,SM↓,PC↓
Serum	Akute Leukämie ^{†18}	³¹ P-NMR	PE↓,SM↓,PC↓
Plasma	Schilddrüsenkarzinome ³⁴	³¹ P-NMR	PE+SM↑,PC↑,PI↑ Pat. in Rem. hypothyreot [‡] /ges. Probanden PE+SM↑,PC↑ Pat. in Rem. hypothyreot/Pat. in Rem. euthyreot
Gewebe	Gliale Tumore ^{§35}	¹ H-NMR in vivo	Cho↑,Cr↓
Gewebe	Prostatakarzinome	¹ H-NMR in vivo	Cit/Cho↓,Cr/Cho↓, Vergleich mit gutartiger Vergrößerung der Prostata ³⁶
Gewebe	Lymphknoten von Patienten mit Plattenepithelkarzinom ^{**37}	¹ H-NMR in vivo	Cho/Cr↑
Gewebe	Brustkrebs ³⁸	¹ H-NMR (Extrakte)	Cho↑
Gewebe	Von Krebs befallene Lymphknoten (allg.) ³⁹	¹ H-NMR (Extrakte)	Cho↑
Gewebe	Lungenkrebs ⁴⁰	¹ H-NMR (Extrakte)	Cho/Alanin↑,Glycin/Alanin↑
Gewebe	Rektumkarzinome ^{††41}	¹ H-NMR	Cho↑,N-Trimethyl-/Methyl↑
Plasma	Versch. Hirntumore ⁴²	¹ H-NMR (Extrakte)	einfach- und mehrfach unges. Fettsäuren↑
Plasma	Verschiedene Tumore ⁴³	¹ H-NMR u. ³¹ P-NMR	TG/ΣPL↑, ΣPL↓
Gewebe	Nierenzellkarzinome ⁴⁴	¹ H-HR-MAS	TG↑
Gewebe	Lipom (Fettgeschw.)/Liposarkom ⁴⁵	¹ H-HR-MAS	TG↑,Cho↑in gut differenzierten Liposarkomen (maligne Fettg.)

Verwendete Abkürzungen: PC-plas = Phosphatidylcholin Plasmalogen, PE-plas = Phosphatidylethanolamin Plasmalogen, PEtn = Phosphorylethanolamin (PME), PCho = Phosphorylcholin (PME), GPC = Glycerophosphorylcholin (PDE), GPE = Glycerophosphorylethanolamin (PDE), PCr = Phosphocreatin, Cho = Cholin, Cr = Creatin, Cit = Citrat, TG = Triacylglycerine, ΣPL = Summe Phospholipide, Pat. in Rem. = Patienten bei denen kein Tumor mehr nachgewiesen werden kann.

* Myelom = vom Knochenmark ausgehender Tumor

† Leukämie = „Blutkrebs“ (Erkrankung der weißen Blutkörperchen)

‡ hypothyreot = Mangel an Schilddrüsenhormonen, euthyreot = normale Versorgung mit Schilddrüsenhormonen

§ Tumore des Hüll- und Stützgewebes des Nervensystems

** Karzinom der äußeren Haut oder auch von Schleimhäuten

†† Rektum = Endabschnitt des Darms

Maligne Tumore selbst werden allgemein durch einen Anstieg an Neutrallipiden (Triacylglycerinakkumulierung) bzw. ihrer Komponenten gekennzeichnet^{17,24}. Dabei spielt nicht nur die größere Verfügbarkeit aus dem Serum der Patienten eine Rolle, auch die intrazelluläre Lipidsynthese ist verändert¹⁷. Ein anderer Anstieg, der sich in verschiedenen Tumoren, wie z. B. verschiedenen Hirntumoren^{35,46}, Brustkrebs³⁸ und Lungenkrebs⁴⁰ finden läßt, ist der an Cholin (s. Tabelle S. 11). Das Signal zu dieser Verbindung setzt sich allerdings aus verschiedenen cholinhaltigen Substanzen zusammen, wie Glycerophosphorylcholin und Phosphorylcholin, sowie aus freiem Cholin selbst⁴⁷.

Für phosphorhaltige Lipide lassen sich ebenfalls einige allgemeine Veränderungen bei Patienten mit Krebserkrankungen finden. In-vitro und in-vivo ³¹P-NMR-spektroskopische Messungen an Gewebe und Tumorzellen zeigen erhöhte Werte für Phosphomonoester (PME) (Phosphorylcholin und Phosphorylethanolamin) und Phosphodiester (Glycerophosphorylcholin und Glycerophosphorylethanolamin)^{31,48}. Unter Therapie kommt es zu einem Rückgang der Phosphomonoester-Level^{46,49,50}. Phosphodiester sind Abbauprodukte der Phospholipide, Phosphomonoester Abbauprodukte und zugleich Ausgangsstoffe in der Phospholipidsynthese. Es wird allgemein ein erhöhter Phospholipidmetabolismus für Krebserkrankungen diskutiert⁵¹. Anzeichen hierfür sind, neben den hohen PME-Konzentrationen, die als Zeichen für eine intensivierte Membransynthese und eine erhöhte Zellduplikationsrate gewertet werden^{52,53}, allgemein abnehmende Phospholipidwerte im Blutplasma von Krebspatienten im Vergleich mit gesunden Probanden, da ein schnell wachsender Tumor einen erhöhten Phospholipidbedarf aufweist¹³. Aus der Tabelle 1 auf Seite 11 läßt sich erkennen, daß unterschiedliche Krebsarten unterschiedliche Auswirkungen auf den Gehalt an Phospholipiden aufweisen, sowohl in Geweben als auch im Blutplasma bzw. -serum. Auch eine Verlaufskontrolle von Chemotherapien scheint anhand der Änderungen von Phospholipidwerten im Blutserum möglich¹⁸.

2.1.3 Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom ist ein Karzinom der Niere, das mit einem Maximum zwischen dem 45. und 75. Lebensjahr aus noch ungeklärter Ursache vor allem bei Männern auftritt (m:w = 2:1). Es handelt sich hierbei um einen Tumor, der meist auf eine Niere beschränkt

ist und hämatogen^{*}, vor allem in Lunge, Skelett und Gehirn metastasiert²⁰. Man kann zwischen verschiedenen Arten von Nierenzellkarzinomen (getrennt nach Struktur der Zellen) unterscheiden. In dieser Arbeit wurde nur das klarzellige Nierenzellkarzinom[†] untersucht, welches mit einer Häufigkeit von ca. 76 % das häufigste Nierenzellkarzinom darstellt. Das klarzellige Nierenzellkarzinom zeigt einen ungünstigeren Krankheitsverlauf als z. B. das chromophobzellige[‡] Nierenzellkarzinom⁵⁴.

Das klinische Bild des Nierenzellkarzinomes ist irreführend. Nur die Hälfte der Patienten haben Erstsymptome im Urogenitalsystem[§]. Wichtigstes Symptom ist dabei eine schmerzlose Ausscheidung von Blut mit dem Urin (40-60 %). Weitere Symptome sind Flankenschmerzen (50 %) und parallel dazu eine Druckgefühl im Bauch⁵⁵. Andere Symptome treten als Resultat der Entwicklung humoraler^{**} Faktoren auf. Diese Symptomkomplexe werden dem sogenannten „paraneoplastischen Syndrom“ (bis zu 20 % der Patienten leiden darunter) zugeschrieben, wobei die klassischen Beispiele das Stauffersyndrom (Leberdysfunktion, die nicht auf Metastasen in der Leber zurückgeht), Hyperkalziämie (erhöhter Kalziumgehalt im Blutserum) und Bluthochdruck sind⁵⁶.

Die Diagnose des Nierenzellkarzinoms erfolgt vorwiegend mittels Ultraschalldiagnostik, oder Computertomographie, allerdings wird auch die Kernresonanzspektroskopie immer häufiger angewendet. Das größte Problem bei der Diagnose stellt die Differenzierung zwischen Nierenzysten und Nierentumoren dar.

Die Therapie besteht in der Nephrektomie^{*}, eventuell in Kombination mit einer Strahlentherapie (postoperativ und bei Vorliegen von Metastasen) oder einer immunologischen Therapie (Therapie, die auf der Aktivierung körpereigener Abwehrmechanismen basiert, hier meist mit Interferon-alpha 2 oder Interleukin 2)⁵⁴. Dabei ist allerdings zu beachten, daß das Nierenzellkarzinom zu den wenig strahlenempfindlichen Tumoren gehört und zur immunologischen Therapie, auf die nicht alle Patienten anzusprechen scheinen, bisher noch nicht viele Langzeitstudien existieren. Gegenüber den meisten

* über das Blut

† Klarzelliges Nierenzellkarzinom heißt, daß das Zytoplasma der Zellen des Karzinoms transparent („klar“) ist.

‡ Chromophobzelliges Nierenzellkarzinom = besteht aus großleibigen Zellen mit farblosem („chromophob“) Plasma und eingeschlossenen Bläschen.

§ urogenital = Harn- und Geschlechtsorgane betreffend

** humoral = die Körperflüssigkeiten betreffend

zytostatischen Chemotherapeutika weist das Nierenzellkarzinom eine Resistenz auf und kann daher nicht mit Chemotherapie behandelt werden^{54,57}.

Das Nierenzellkarzinom hat seinen Ursprung, wie andere Tumore auch, in einer Mutation auf genetischer Ebene. Das Auftreten dieser Tumore scheint hauptsächlich spontaner Natur zu sein, jedoch gibt es eine geringe Anzahl von familiären Fällen bei Patienten mit der sogenannten „Hippel-Lindau-Krankheit“. Gesicherte Aussagen über Umwelteinflüsse, die ein Auftreten von Nierenzellkarzinomen begünstigen könnten, lassen sich bis jetzt noch nicht treffen, allerdings wurde ein ungünstiger Einfluß von Zigarettenkonsum und Schmerzmittelmißbrauch festgestellt.

Die Prognose des Nierenzellkarzinomes ist abhängig vom Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose. Falls keine Metastasen vorliegen, beträgt die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate ca. 50 %. Diese ist allerdings abhängig vom Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose. So leben von Patienten mit Tumoren im Stadium I (T1-2, N0, M0, Abkürzungen siehe Kap. 2.3.1) postoperativ nach 5 Jahren noch 65 %, von Patienten mit Tumoren im fortgeschrittenen Stadium IV (T4, N0-3, M0 oder T1-4, N0-3, M1) nur mehr 8 %⁵⁸. Probleme bereitet außerdem, daß der Tumor zu einer beträchtlichen Größe heranwachsen kann, bevor er sich durch seine (meist systemischen) Manifestationen bemerkbar macht. Eventuell können sogar Symptome von Fernmetastasen vor dem klinischen Nachweis des Tumors in der Niere in Erscheinung treten. Ungefähr 30 % der Patienten zeigen Anzeichen für eine Metastasierung zum Zeitpunkt der Diagnose. Unbehandelt überleben nach Metastasierung nur 15 % der Patienten die 1-Jahresfrist. Nach Eintritt der Fernmetastasierung bestimmen Metastasengröße, sowie Art und Anzahl der befallenen Organe den Krankheitsverlauf. Außerdem ist diese Krebsart dafür bekannt, daß sich Metastasen noch viele Jahre nach der Entfernung des Primärtumors (auch noch mehr als 15 Jahre später⁵⁴), auch an ungewöhnlichen Stellen (bedingt durch die hämatogene Metastasierung), bilden können. Ein Auftreten von Tumorrezidiven ist nicht selten, 30-40 % der Patienten erleiden nach Tumornephrektomie ein Rezidiv[†]. Die Prognose dieser Tumorrezidive ist sehr schlecht.

Das späte Auftreten von Symptomen, die Schwierigkeiten der Diagnose, das schlechte Ansprechen des Tumors auf Bestrahlung, die Möglichkeit des Auftretens eines Rezidivs

* operative Entfernung der Niere

† Rezidiv = Rückfall, Wiederauftreten einer Krankheit nach Abheilung

oder von Metastasen auch Jahre nach erstmaligem Auftreten der Krankheit und vor allem die Abhängigkeit der Überlebensrate vom Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose (besonders im Hinblick auf die sehr schlechte Prognose beim Auftreten von Fernmetastasen, unabhängig von der Tumorgröße) lassen eine Suche nach prognostischen Tumormarkern sehr wichtig erscheinen. Spezifische Tumormarker für die routinemäßige Diagnostik und zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes des Nierenzellkarzinoms gibt es bislang nicht⁵⁴.

Studien, die sich mit den Veränderung im Lipidmetabolismus im Gewebe von Nierenzellkarzinomen befassen, dabei aber nicht die NMR-Spektroskopie als Methode benutzen, liefern folgende Ergebnisse: Karlsson et al. fanden in Gewebe von Nierenkarzinomen höhere Konzentrationen an Gangliosiden* und ein anderes Ceramidmuster† im Vergleich mit gesundem Nierengewebe⁵⁹. Gebhard et al. wiesen einen abnormalen Cholesterinmetabolismus im klarzelligen Nierenzellkarzinom nach, wobei das Gewebe des Tumors mehr Cholesterin und mehr Cholesterinester enthielt als normales Nierengewebe⁶⁰. Über eine Abnahme der LDL-Rezeptoraktivität (LDL = low density lipoproteine), allerdings gleichzeitig verbunden mit einer Zunahme der Syntheserate an Cholesterin, berichteten Clayman et al. Sie benutzten für ihre Untersuchungen das „Lewis rat renal carcinoma“ Model⁶¹. Rudling et al. untersuchten dagegen menschliches Nierenzellkarzinomgewebe und fanden eine Reduktion der LDL-Rezeptor mRNA (messenger RNA) Level im Vergleich mit normalem Nierengewebe⁶². In menschlichem Nierenzellkarzinomgewebe konnte außerdem eine Erhöhung der Syntheserate an Sulfolipiden nachgewiesen werden, die sich auf eine Erhöhung der Glykolipidsulfotransferaseaktivität (überträgt schwefelhaltige Gruppen auf Glykolipide‡) zurückführen läßt^{63,64}. Blutserum von Patienten mit Nierenzellkarzinom zeigte im Vergleich mit Serum von gesunden Probanden und Patienten mit anderen urologischen Tumoren ebenfalls eine Erhöhung der Glykolipidsulfotransferaseaktivität⁶⁵. Nierengewebe von Hamstern mit Nierentumoren zeigte niedrigere Konzentrationen an Phospholipiden im Vergleich mit Nierengewebe von normalen Hamstern. Außerdem wiesen die Tumore eine andere

* Sphingolipide aus der Gruppe der Glykolipide, vergleiche auch Anhang (zur Biosynthese von Phospholipiden)

† gehört ebenfalls zur Gruppe der Sphingolipide, vergleiche auch Anhang (zur Biosynthese von Phospholipiden)

‡ Lipide, die einen Kohlenhydratanteil enthalten, der glykosidisch an Sphingosin gebunden ist, vergleiche auch Anhang (zur Biosynthese von Phospholipiden).

Zusammensetzung an Phospholipiden auf als normales Nierengewebe, sie zeigten höhere Werte an PC aber niedrigere Werte an SM⁶⁶.

Es gibt bisher nur wenige Studien, sieht man von der Bildgebung ab, die die NMR-Spektroskopie zur Untersuchung des Lipidmetabolismus im Nierenzellkarzinom verwenden. Kuliszkiwicz-Janus et al. untersuchten erstmals das Blutplasma von fünf Patienten mit Nierenzellkarzinomen. Sie fanden drei Phospholipidpeaks, wovon der eine, das LPC, eine niedrigere Signalfläche bei Patienten mit Nierenzellkarzinom zeigte. Drei Wochen nach der Operation bestand diese Erniedrigung an LPC immer noch, wie durch eine erneute Messung ermittelt wurde. Die Autoren dieser Studie geben allerdings keine absoluten Konzentrationen an¹⁸.

In-vivo Studien an isolierten aber durchbluteten menschlichen Nieren mit verschiedenen Nierentumoren (u. a. dem Nierenzellkarzinom) ergaben, daß unter Sauerstoffmangel die anaerobe Glykolyse die ATP-Konzentration (ATP = Adenosintriphosphat) im Tumor aufrechterhält, während die Signale für ATP aus normalem Gewebe der gleichen Niere verschwinden. Anorganisches Phosphat findet sich in hoher Konzentration ausschließlich im Tumorgewebe, werden aber Glukose und Pyruvat* aus dem Blut, welches durch den Tumor fließt, entfernt, verschwindet der Peak für das anorganische Phosphat. Wird das Pyruvat wieder zugesetzt, erscheint er wieder, d. h. das anorganische Phosphat wird durch glykolytische Aktivität im Tumor aber nicht in normalem Nierengewebe gebildet⁶⁷.

Moka et al. untersuchten menschliche Gewebeproben von Nierenzellkarzinomen im Vergleich mit gesundem Nierengewebe mittels ¹H-HR-MAS-Spektroskopie und entdeckten Unterschiede in den Lipidkomponenten, die hauptsächlich von Triacylglycerinen und Cholesterin stammten. Weitere Veränderungen betrafen die Aminosäuren Alanin und Valin^{8,68}. Tate et al. kombinierten erstmals ¹H-HR-MAS-Spektroskopie von Nierenrindentumoren mit PR-Methoden („pattern recognition“), um zwischen krankem und gesundem Gewebe zu unterscheiden. In den Tumorspektren zeigte sich eine Erhöhung der Signalintensitäten bei 5,27 ppm, 1,25 ppm und 0,84 ppm. Diese Verschiebungen sind Fettsäureseitenketten von Lipiden zuzuordnen. Die Spektren von gesundem Gewebe zeigten allgemein im Vergleich mit den Tumorspektren eine Erniedrigung der Signalintensität für Lipidkomponenten aber höhere Signalintensitäten in der Region der Kohlenhydrate und α -CH-Signale von Aminosäuren⁶⁹.

2.1.4 Ovarialkarzinom

Bei einer von 55 Frauen entwickelt sich im Laufe ihres Lebens ein Ovarialkarzinom⁷⁰.

Dabei ist das Ovarialkarzinom zwar nicht der gynäkologische Tumor, welcher am häufigsten auftritt, aber in den meisten westlichen Ländern derjenige mit der höchsten Letalitätsrate^{71,72}. Die Ovarialkarzinome sind zu 65-75 % epithelialer[†] Herkunft^{73,74}. Der Rest entwickelt sich vorzugsweise aus Keimzellen und aus dem Stroma[‡] des Ovars.

Die Erkrankung manifestiert sich zumeist zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr, mit einem Durchschnittsalter von 55 Jahren zum Zeitpunkt der Erkrankung^{74,75}. Für benigne (gutartige) Ovarialtumore liegt das Durchschnittsalter mit 45 Jahren um zehn Jahre niedriger.

Wie beim Nierenzellkarzinom auch, sind Verlauf und Prognose beim Ovarialkarzinom im Wesentlichen abhängig von der Ausbreitung des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnose. Die Tendenz des Tumors, früh zu metastasieren und das Fehlen von Symptomen in einem frühen Stadium der Krankheit bedingen, neben anderen Faktoren, die schlechte Prognose dieser Erkrankung. Lediglich in 20-30 % der Fälle wird somit die Diagnose im Stadium I und II gestellt. Der überwiegende Teil (ca. 50 %) der erkrankten Patientinnen weist zum Zeitpunkt der Diagnose einen Tumor im Stadium III, 20 % einen Tumor im Stadium IV (zur Stadieneinteilung beim Ovarialkarzinom siehe Kap. 2.3.3) auf. Das heißt, 70 % der Ovarialkarzinome werden erst entdeckt, wenn die Organgrenzen bereits überschritten wurden⁷⁶. Ob eine Remission der Erkrankung eingetreten ist, ist schwer zu diagnostizieren; während der Chemotherapie ist oft eine zweite Operation nötig um festzustellen, ob eine Remission[§] der Krankheit eingetreten ist⁷⁷. Insgesamt beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate für die Gesamtheit der an Ovarialkarzinomen erkrankten Frauen 20-30 %⁷⁸. Die 5-Jahres-Überlebensrate des Ovarialkarzinoms für die einzelnen Tumorstadien beträgt^{70,75,76}:

* Salz der Brenztraubensäure

† Epithel = ein- oder mehrschichtiger Zellverband, der innere oder äußere Körperoberflächen bedeckt

‡ Stroma = Stützgewebe eines Organs, bzw. Tumors

§ Remission = (vorübergehendes) Zurückgehen der Krankheitserscheinungen

Stadium I	60-90 %
Stadium II	40-70 %
Stadium III	4-15 %
Stadium IV	< 5 %

Die prognostische Bedeutung von Tumormarkern liegt beim Ovarialkarzinom neueren Studien zufolge weniger bei der Primärtherapie sondern eher bei der Verlaufskontrolle⁷⁹. Der beste verfügbare Tumormarker CA 125 hat nicht genügend Sensitivität und Spezifität, um als alleiniger Marker für ein Screening von Ovarialkarzinomen zu dienen. CA 125 wird im Serum von bis zu 50 % der Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom in einem niedrigen Stadium nicht gefunden⁸⁰. In Studien konnte gezeigt werden, daß der 3 Monate nach der Operation gemessene CA 125 Wert, neben der verbliebenen Resttumorgröße, der führende Prognosefaktor für den Krankheitsverlauf bis zum Ende der Chemotherapie war⁷⁹. Der Wiederanstieg des CA 125 Wertes zeigte das Fortschreiten der Krankheit an^{79,81}. Die Sensitivität von CA 125 Bestimmungen im Serum liegt präoperativ in Abhängigkeit vom Stadium der Tumore zwischen 42 % (Stadium I) und 83 % (Stadium IV). Als weitere Tumormarker beim Ovarialkarzinom können, unter anderem, CEA (Carcinoembryonic Antigen), AFP (Alpha-Fetoprotein) und Hormone (HCG = Humanes Choriongonadotropin) eingesetzt werden. Erhöhte CEA Werte liegen bei etwa 50 % der Ovarialkarzinome vor. AFP reagiert sehr spezifisch bei Keimzelltumoren*, ebenso das HCG^{75,82}. Die meisten Tumormarker sind Proteine oder Kohlenhydrate, aber Lipide als Tumormarker befinden sich noch in der Entwicklung⁸¹. Der diagnostische Wert von CA 125 wird dadurch limitiert, daß die CA 125 Werte zwar schon Monate vor der Diagnose des Ovarialkarzinoms erhöht sein können, erhöhte CA 125 Werte aber auch bei einer Reihe gutartiger Krankheitsbilder detektiert werden können, wie z. B. bei Endometriose[†]. Außerdem zeigen sich erhöhte Werte an CA 125 auch bei einer Reihe anderer gynäkologischer (Endometrium, Eileiter) und nicht-gynäkologischer (Pankreas (Bauchspeicheldrüse), Brust, Dickdarm und Lunge) Krebsarten^{81,83-84 85}. CA 125 ist außerdem abhängig vom Hormonstatus. Bei gesunden Frauen nach der Menopause finden sich im Durchschnitt niedrigere Werte an CA 125 als bei gesunden Frauen vor der Menopause⁸⁶.

* Keimzelltumoren bestehen aus unreifen Keimzellen

† Vorkommen von Endometrium-ähnlichem Gewebe außerhalb der Gebärmutter, das Endometrium ist das Gewebe, welches die Gebärmutter auskleidet

Ovarialkarzinome verursachen, wie erwähnt, zu Beginn ihrer Entwicklung keine charakteristischen Frühsymptome, faßbare Symptome treten erst relativ spät auf. Dabei sind vor allem Zyklusstörungen, Blutungen nach der Menopause, unklare diffuse Unterleibsbeschwerden, Zunahme des Leibesumfanges und Beeinträchtigungen des Allgemeinbefindens zu nennen²⁰. Charakteristisch für das unbehandelte Ovarialkarzinom ist die Aszitesbildung* als Folge vermehrter Rückresorption durch Behinderung des Lymphabflusses. Die (seltenen) Tumore, die selbst Hormone ausschütten, können zu Blutungsanomalien und zu Virilisierungserscheinungen (Vermännlichung bei Frauen) führen^{75,78}.

Zu den Faktoren, die die Entstehung eines Ovarialkarzinoms begünstigen, gehören unter anderem die Zahl der durchlebten Monatszyklen. Nach jedem Eisprung (Ovulation) muß das oberflächliche Ovarialepithel (Ursprung der epithelialen Ovarialkarzinome) wachsen und die entstandene Wunde bedecken. Im Laufe häufiger Zellteilungen (viele Ovulationen) ist das Risiko von Mutationen, die eine ununterbrochene Wachstumsstimulation verursachen können, größer⁷⁰. In dieses Bild paßt der Befund, daß Ovulationshemmer (Pille) das Risiko senken, an einem Ovarialkarzinom zu erkranken⁸⁷. Als weiterer wichtiger Risikofaktor hat sich eine familiäre Häufung dieser Erkrankung erwiesen^{70,73,76,79}.

Bei 5-10 % der Erkrankten besteht eine genetische Vorbelastung.

Ovarialkarzinome breiten sich vorzugsweise (zu 67 %) intraperitoneal[†] über eine oberflächliche Abschilferung von Tumorzellen aus⁷³. Weitere mögliche Metastasierungswege sind über das Lymphsystem, über das Blut, sowie durch Infiltration von Nachbarorganen gegeben. Fernmetastasen finden sich am häufigsten in Lunge, Leber und Skelettsystem. Umgekehrt metastasieren bestimmte Tumore mit besonderer Präferenz in die Ovarien: gastrointestinale Tumore (Tumore des Verdauungssystems), Mammakarzinome (Brustkrebs), endometriale Karzinome.

Neben der üblichen gynäkologischen Untersuchung, der Erstellung eines kompletten Blutbildes (wichtig ist dabei u. a. eine Bestimmung der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit) und der Bestimmung von Tumormarkern, gehört zur weiteren Diagnostik

* Ansammlung von Flüssigkeit in der Bauchhöhle

† innerhalb des Bauchfells im Bauchraum

eines Ovarialkarzinoms der Ultraschall, der eine Abgrenzung einfacher Zysten von Ovarialtumoren erlaubt. Mittels Computer- bzw. Kernspintomographie kann die Ausdehnung des Ovarialkarzinoms und, besonders mittels Kernspintomographie, die Einbeziehung von Nachbarorganen erfaßt werden^{88,89}. Mit Hilfe der Kernspintomographie lassen sich auch kleinste Mengen von Aszites darstellen⁹⁰.

Entscheidend für die Prognose des Ovarialkarzinoms ist eine möglichst radikale Tumorentfernung bei der Primäroperation⁹¹. An die chirurgische Therapie schließt sich meist eine Chemotherapie an. Diese erfolgt als sogenannte Kombinationschemotherapie mit zwei verschiedenen, davon einem platinhaltigen, Zytostatika⁷³. Eine Monotherapie mit einer Substanz wird heute bei der Erstbehandlung des Ovarialkarzinoms in der Regel nicht mehr durchgeführt^{73,74}. Die Art der Therapie und die Wahl der Zytostatika richten sich aber auch nach der Art des Ovarialkarzinoms. Bei der überwiegenden Mehrzahl der Patientinnen mit rezidivierendem Ovarialkarzinom z. B. ist eine Heilung nicht mehr möglich⁸⁷.

Neben der schon erwähnten Anwendung der Kernspintomographie bei der Diagnose des Ovarialkarzinoms finden sich in der Literatur weitere Studien, in denen die NMR-Spektroskopie als Methode bei der Untersuchung der Auswirkungen des Ovarialkarzinoms eingesetzt wurde.

In zwei Studien wurden ¹H-NMR-Spektren von Gewebeproben von Ovarialkarzinomen und gutartigen Ovarialtumoren aufgenommen^{92,93}. Dazu wurden die Gewebeproben entweder direkt auf Glaswolle im 5 mm NMR-Rohr vermessen oder in eine Kapillare eingebracht, welche anschließend in einem 5 mm NMR-Rohr vermessen wurde. Die erste Arbeitsgruppe konnte eine Unterscheidung normal/gutartig und maligne (bösartig) treffen, in dem sie das Verhältnis der Peakhöhen der Peaks bei 3 ppm (Creatin/Phosphocreatin/Lysin) zu 1,7 ppm (Lysin/Polyamine) und 1,7 ppm zu 1,3 ppm (Lipid/Laktat/Fucose) verglich (von den Autoren so zugeordnet). Karzinomgewebe wies dabei im Vergleich mit gesundem Gewebe ein höheres Verhältnis der Signalintensitäten von 3,0 ppm zu 1,7 ppm und ein niedrigeres Verhältnis der Signalintensitäten von 1,7 ppm zu 1,3 ppm auf⁹². Die zweite Arbeitsgruppe benutzte eine PR-Methode (PR = pattern recognition) und konnte so zwischen normalem/malignen Gewebeproben und unbehandelten/wiederaufgetretenen Ovarialkarzinom unterscheiden. Ausgewählt wurde der Bereich von 0 ppm bis 3,7 ppm, die Spektren wurden auf die Höhe des Me-

thylensignals von Triglyceriden bei 1,3 ppm (von den Autoren so zugeordnet) normiert. Die Autoren bemerken dazu, daß dieser Peak allerdings vom Grading* oder Nekrosegrad† des Tumors abhängig sein könnte⁹³. Mountford et al. untersuchten 1986 Biopsien von Ovarialkarzinomen und Dickdarmkarzinomen und bestimmten die T₂-Zeiten für Protonen von Lipiden⁹⁴. Extrakte von Membranen von Zellen verschiedener Zelllinien von Ovarialtumoren von Hamstern wurden von Mackinnon et al. mittels ¹H-NMR-Spektroskopie untersucht, wobei Unterschiede in Cholesterin-Gehalt und in den Fettsäuren der Cholesterinester festgestellt wurden⁹⁵. Kriat et al. untersuchten Plasma-Extrakte von Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen (u. a. von drei Patientinnen mit Ovarialkarzinom) mittels ³¹P-NMR- und ¹H-NMR-Spektroskopie. Sie fanden einen signifikanten Anstieg des Verhältnisses von Triacylglycerinen zu Phospholipiden und gleichzeitig eine Verminderung des Gesamtgehaltes an Phospholipiden bei allen Patienten mit Krebs. Die von Kriat et al. im Plasma-Extrakt gefundenen Phospholipide waren: SM, LPC (allg.) und PC⁴³. Die Flüssigkeit aus benignen und malignen Zysten des Ovars wurde in zwei Veröffentlichungen mittels ¹H-NMR untersucht. Dabei wies die Flüssigkeit maligner Zysten im Vergleich mit benignen einen höheren Gehalt an Cholin und einigen Aminosäuren (wie Isoleucin, Valin, Methionin) auf^{96,97}.

Neben diesen Studien gibt es eine Reihe von Veröffentlichungen, in denen nicht die NMR-Spektroskopie als Untersuchungsmethode gewählt wurde, die sich aber trotzdem mit den Veränderungen im Lipid- bzw. Phospholipidmetabolismus, bedingt durch ein Ovarialkarzinom, beschäftigen. Die Ergebnisse dieser Studien werden im folgenden aufgeführt.

Okita et al. berichten über eine Erhöhung an LPC in Plasmaextrakten von Frauen mit Ovarialkarzinom im Vergleich mit gesunden Probanden, wobei auch eine Veränderung der Zusammensetzung des LPC (mehr Palmitoyl- und Stearoyl-LPC, weniger Oleoyl- und Linoleoyl-LPC) beobachtet wurde. Neben LPC wurde in dieser Arbeit der Gehalt an PC im Plasmaextrakt bestimmt (beides chromatographisch). PC zeigte keine signifikante Veränderung im Vergleich Krank/Gesund, weder im Gehalt, noch in der Zusammensetzung. Bei der Auswahl des Patientenkollektivs wurde Plasma von 17 Frauen

* Begriff, mit dem der histologische Differenzierungs- und Malignitätsgrad von malignen Tumoren beschrieben wird, vergleiche auch Kap.2.3.1

† Nekrose = Veränderungen einer Zelle oder eines Gewebes, die nach Ausfall der Zellfunktionen (sog. Zelltod) auftreten

vermessen, wobei 9 Patientinnen zum Zeitpunkt der Messungen mit einer platinhaltigen Chemotherapie behandelt wurden⁹⁸. Zwei andere Forschergruppen berichten über eine signifikante Erniedrigung des Gesamtgehaltes an Cholesterin und Cholesterinestern im Serum und speziell der HDL-Fraktion von Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Vergleich mit gesunden Probandinnen^{99,100}. Novikov et al. berichten über erhöhte Triacylglycerin- und Phospholipidwerte im Serum von Patientinnen mit Ovarialkarzinom, außerdem über erniedrigte Gesamt-Cholesterin- und HDL-Phospholipidwerte (aufgrund der Erniedrigung dieser Fraktion an Lipoproteinen). Im Vergleich von Patientinnen mit gutartigen Ovarialtumoren und gesunden Probandinnen konnte keine signifikante Veränderung in der Lipid- und Phospholipid-Verteilung festgestellt werden. Nach der Operation zeigten die Patientinnen mit Ovarialkarzinom eine weitere Steigerung der Triacylglycerinwerte, während der Phospholipidgehalt sank. Während der Chemotherapie kehrten sich die Verhältnisse um (TG↓, PL↑). Der Gehalt an HDL stieg allerdings während der Chemotherapie nicht an²⁵. Der Phospholipidgehalt in Erythrozytenmembranen* von Patienten mit Ovarialkarzinomen im Stadium III und die Aktivität an Phospholipase C† wurde von Kopezynski et al. bestimmt. Der Gehalt an PS, SM, LPC und Phosphatidsäure war in der Membran signifikant erniedrigt, während der von Phosphatidylinositol-4-phosphat und Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat signifikant erhöht war, bei gleichzeitiger Erniedrigung an PI. Die Aktivität der Phospholipase C war zu 80 % gehemmt¹⁰¹. Über eine Erhöhung der Lipolyse‡ im Serum (sieben von neun Patientinnen) und Aszites (fünf von fünf Patientinnen) von Patientinnen mit Ovarialkarzinom berichten Gercel-Taylor et al. Gemessen wurde dabei eine Erhöhung der HSL (hormone sensitive lipase). Im Aszites von Patientinnen mit Ovarialkarzinom fand die Forschergruppe im Vergleich mit normaler Flüssigkeit in der Bauchhöhle erhöhte Werte an Monoglyceriden, Diglyceriden, freien Fettsäuren, sowie erniedrigte Werte an Triacylglycerinen¹⁰². Eine, für ein schnelles Wachstum wichtige, erhöhte Fettsäuresynthese konnte von Pizer et al. in Zelllinien von Ovarialkarzinomen, Mammakarzinomen, Endometrium-, Rektum- und Prostatakarzinomen nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden bestimmte Enzyme, die für die Fettsäuresynthese nötig sind, vermehrt

* Erythrozyten = rote Blutkörperchen

† spaltet Phospholipide am Phosphor, siehe Anhang (Abbau von Phospholipiden)

‡ Spaltung von Triacylglycerinen zu Glycerin und Fettsäuren

ausgeschüttet. Auch bei einem Xenotransplantat* in Nacktmäusen konnte eine starke Erhöhung der Fettsäuresynthese nachgewiesen werden. Wurde die Fettsäuresynthese gehemmt, folgten Regression des Tumors, eine Reduktion der Aszitesmenge und eine signifikante Erhöhung der Überlebensrate der Mäuse¹⁰³.

2.2 In-vitro ³¹P- und ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen von Blutplasma

2.2.1 Methodik

Da, wie bereits in der Einleitung erwähnt, die durch die unterschiedlichen Karzinomarten verursachten quantitativen Veränderungen im Lipidstoffwechsel durchaus von anderen Stoffwechseleffekten und Methodenfehlern überlagert oder gar vollständig überdeckt werden könnten, ist die sorgfältigen Auswahl von Patienten- und Probandenkollektiv ebenso wie eine standardisiertes und methodisch abgesichertes Meßverfahren von ausschlaggebender Bedeutung für den wissenschaftlichen Erfolg der in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen. Es sollen hier zunächst die Aspekte behandelt werden, die die Vorbereitung der Proben, deren Haltbarkeit und die Voraussetzungen für eine quantitative Bestimmung der Lipide bzw. Phospholipide im Blutplasma mit Hilfe der NMR-Spektroskopie betreffen. Im Anschluß daran wird die Auswahl des Patienten- und Probandenkollektivs erläutert, bevor im nächsten Abschnitt die Ergebnisse der ³¹P- und ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen vorgestellt werden. Die Probenvorbereitung und Probenhaltbarkeit, sowie die Erläuterungen zur Auswahl des Patienten- und Probandenkollektivs werden für die ³¹P-NMR- und ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen zusammen behandelt, die spektroskopischen Aspekte und die Ergebnisse dagegen getrennt.

2.2.2 Probenvorbereitung und Probenhaltbarkeit

Die Plasmaproben wurden nach einem Standardverfahren in der Medizin aus Blutproben gewonnen. Hierzu wurde das Blut (10 ml) in EDTA-haltige Röhrchen entnommen und bis zur weiteren Aufarbeitung (nach max. 4 Stunden) kühl gelagert. Der Zusatz von EDTA verhindert ein Gerinnen der Proben. Das Blutplasma wurde durch Zentrifugieren (10 Minuten bei 3000g) von den festen Bestandteilen des Blutes separiert und konnte

* Fremdtransplantat (hier transplantiertes Tumor)

anschließend als Überstand abgenommen werden. Hämolysierte* Proben wurden verworfen.

Das so gewonnene Plasma wurde direkt im Anschluß daran bei -10°C bis zur Vorbereitung auf die Messungen gelagert. Zur Vorbereitung für die ^{31}P -NMR-spektroskopischen Messungen wurden, nach dem Auftauen der Probe, 2,8 ml Blutplasma mit 0,7 ml einer Standardlösung (zur Zusammensetzung der Standardlösung, siehe Kap. 2.2.3, Standardlösung) versetzt und die Probe anschließend gut durchmischt. Die Proben wiesen dann einen pH-Wert von acht auf. Anschließend wurden die Proben bis zur Messung (am nächsten Tag) wieder eingefroren. Zur Vorbereitung auf die ^1H -NMR-spektroskopischen Messungen wurde das (aufgetaute) Plasma mit einer Standardlösung (s. Kap. 2.2.4, Standardlösung) versetzt (0,8 ml Plasma mit 0,2 ml Standardlösung), die Probe gut durchmischt und anschließend direkt vermessen.

Obwohl für die ^{31}P - und ^1H -Spektroskopie die gleichen Proben verwendet wurden, läßt sich von den Ergebnissen zur Probenhaltbarkeit bei den Phosphormessungen nicht einfach auf die Haltbarkeit der Proben für die ^1H -Messungen schließen, da in ^1H -Spektren z. B. auch Substanzen wie Glukose und Laktat detektiert werden, die anderen Veränderungen unterworfen sind als Phospholipide oder Lipide. Die Versuche zur Probenhaltbarkeit wurden daher für beide Spektroskopiearten ausgeführt.

Zur Kontrolle der Haltbarkeit von Plasmaproben und Standard wurden in einer Versuchsreihe Plasmaproben geteilt und die eine Hälfte kurz nach der Abnahme mit Standardlösung versetzt und vermessen, während die andere Hälfte erst nach sechs Monaten (^1H vier Monate) Lagerung im Kühlschrank bei -10°C mit Standard versetzt und vermessen wurde. In einer zweiten Versuchsreihe wurden mit Standard versetzte und vermessene Proben wieder eingefroren und nach sechs Monaten (^1H vier Monate) aufgetaut und erneut vermessen. Es zeigten sich, sowohl bei den ^{31}P -NMR-spektroskopischen, wie auch bei den ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen bei beiden Versuchsreihen innerhalb der Fehlergrenzen keine Abweichungen. Nicht nur die Haltbarkeit der Proben, sondern auch die gute Reproduzierbarkeit der Spektren konnte so nachgewiesen werden.

Um die Belastung des Plasmas während der ^{31}P -NMR-spektroskopischen Messungen zu testen, wurden mehrere ^{31}P -Spektren von Blutplasma in einer Reihenmessung hinterein-

* Hämolyse = Abbau von Erythrozyten, das Blut wird dadurch zersetzt.

ander aufgenommen. Die Meßzeit betrug pro Spektrum 1,5 Stunden, insgesamt dauerte die Reihenmessung 12 Stunden. In einer zweiten Meßreihe wurden drei Spektren hintereinander aufgenommen. Die Meßzeit betrug dabei pro Spektrum 6 Stunden, insgesamt dauerte die Reihenmessung 18 Stunden. Die Abweichungen zwischen den Phospholipidkonzentrationen nach sechs, nach zwölf und nach achtzehn Stunden lagen unter 5 %. Auch das Signal für die Standardsubstanz zeigte keine Veränderung, wie die Differenzspektren auf S. 34 zeigen.

Zum Erreichen dieser guten Probenhaltbarkeit trug die Auswahl der Standardlösung (s. Kap. 2.2.3, Standardlösung), die ein pH-Wert der Proben im annähernd neutralen Bereich erhält, erheblich bei. Gegenüber einer früher verwendeten Lösung¹⁰⁴ konnte der pH-Wert der Proben von neun auf acht gesenkt werden, so daß eine mögliche Gefahr für die Haltbarkeit der Proben durch eine (langsame) Hydrolyse der Esterbindungen zwischen Fettsäureketten und Glyceringerüst (bei den Phospholipidklassen, die ein solches besitzen) verringert werden konnte.

Die Untersuchungen zeigen, daß unbehandeltes Blutplasma in gefrorenem Zustand über einen längeren Zeitraum bei einer Temperatur von -10°C gelagert werden kann, ohne daß Veränderungen im Phospholipidgehalt beobachtet werden. Ebenso sind auch keine Veränderung während der Zeit, die notwendig ist, um eine ^{31}P -NMR-Messung durchzuführen, zu befürchten. Ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren des Blutplasmas ist dennoch zu vermeiden, ebenso eine zu lange Zeitspanne zwischen Auftauen der Probe und Beginn der Messung. Außerdem sollten die Proben vor Beginn der Messung gut durchmischt sein.

Obwohl die Belastung des Plasmas während der Messungen bei den ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen sehr viel geringer ist als bei den ^{31}P -NMR-spektroskopischen Messungen, da die Meßzeit für die Aufnahme eines Spektrums nur 25 min. beträgt (s. Kap. 2.2.4), wurden trotzdem in einer Reihenmessung drei Spektren mit einer Meßzeit von jeweils 25 min. aufgenommen, d. h. einer Gesamtmeßzeit von 75 min. Die Abweichungen zwischen den Lipidkonzentrationen lagen für die größten Lipidsignale bei 3 %. Auch das Signal für die Standardsubstanz zeigte keine Veränderung, wie sich aus Differenzspektren entnehmen ließ.

Die hier durchgeführten Untersuchungen bestätigen die schon bei den Phosphormessungen nachgewiesene Haltbarkeit des Blutplasmas über einen längeren Zeitraum bei einer

Temperatur von -10°C ohne Veränderungen im Lipidgehalt. Veränderungen während der Meßdauer sind ebenfalls nicht zu befürchten. Trotzdem sollte auch hier vermieden werden, die Proben vor Meßbeginn zu lange bei Raumtemperatur stehen zu lassen, da bei längerem Stehenlassen von Plasmaproben eine Erhöhung der Konzentration an Laktat beobachtet werden kann und die Proben einer unnötigen Belastung ausgesetzt sind, die unter Umständen auch zu einer Zersetzung der Lipide im Blutplasma führen kann¹⁰⁵. Ebenso ist ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren des Blutplasmas zu vermeiden. Außerdem entsteht durch den Prozeß des Einfrierens und Auftauens eine Inhomogenität der Probe, die durch Mischen aufzuheben ist.

2.2.3 Bedingungen für die Aufnahme und quantitative Auswertung der ^{31}P -NMR-Spektren

Allgemeines

Eine Voraussetzung für die spektroskopische Bestimmung der Konzentrationen unterschiedlicher Phospholipidklassen im Blutplasma sind Signale, die eine genügend geringe Linienbreite aufweisen, um getrennt integrierbar zu sein. Wird Blutplasma ohne Vorbehandlung direkt vermessen, so findet man nur zwei Signale, ein breites, nicht-aufgelöstes Signal bei höherem Feld, welches den Phospholipiden zuzuordnen ist und ein scharfes Signal bei tieferem Feld, welches zum anorganischen Phosphat gehört.

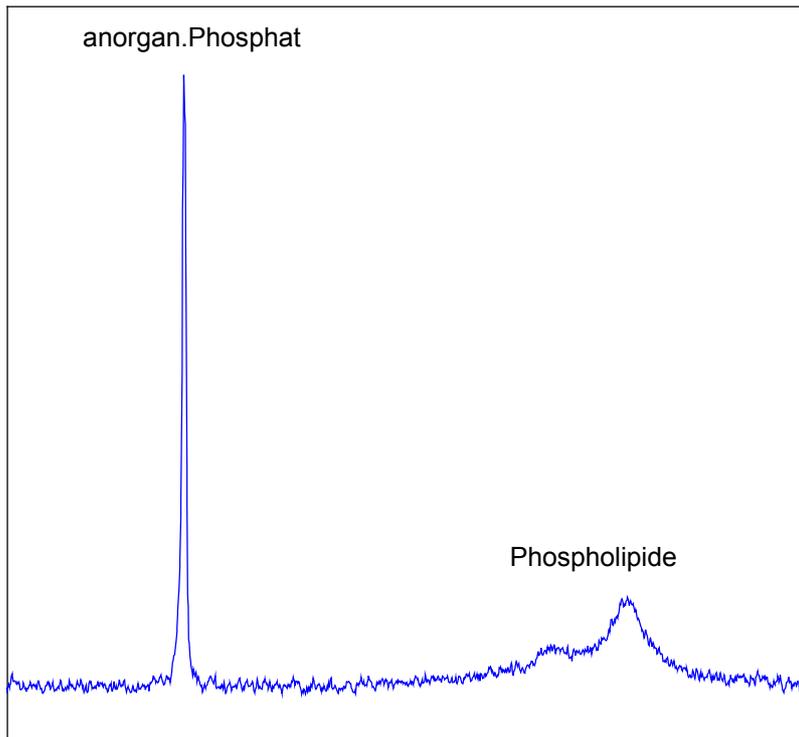


Abbildung 1 ^{31}P -NMR-Spektrum von unbehandeltem Blutplasma.

Der Grund für die fehlende Auftrennung der Phospholipidsignale liegt in der geringen Löslichkeit der Phospholipide. Phospholipide tragen eine hydrophile und eine lipophile Gruppe; diese amphiphilen Eigenschaften sind für ihr physikalisch-chemisches Verhalten von großer Bedeutung. Die lipophilen Kohlenwasserstoffketten der Fettsäuren verhindern, daß Phospholipide in Wasser eine molekularisperse Lösung bilden. Wasser stellt jedoch das einzige Lösungsmittel in biologischen Systemen dar. Dementsprechend liegen die Phospholipide im Blutplasma nicht frei, sondern im wesentlichen in den sogenannten Lipoproteinen gebunden vor. Lipoproteine ermöglichen durch ihren Aufbau, daß sich die Phospholipide im Blutplasma homogen verteilen. Es existieren sehr unterschiedliche Typen von Lipoproteinen mit unterschiedlicher Größe, Zusammensetzung und Phospholipidanteil (vgl. hierzu auch Abschnitt 2.1.1). Für natürlich vorkommende Phospholipide sind viele verschiedene Phasensysteme in Lösung möglich, die sich in Abhängigkeit von ihrer Umgebung ausbilden und verändern können. So liegen z. B. die Phospholipide im Blutplasma teilweise in Phospholipiddoppelschichten vor, während in unpolaren Lösungsmitteln oder bei größerem Volumen der lipophilen Anteile auch hexagonale Phasen möglich sind. Bei der NMR-spektroskopischen Messung von nicht vorbehandeltem Blutplasma werden also Phospholipide in unterschiedlichen Umgebungen mit zum Teil geringer Beweglichkeit der Moleküle gemessen. Wegen der

hohen Anisotropie der chemischen Verschiebung des Phosphors entstehen aus diesem Grund breite Signale.

Um Signale geringer Linienbreite zu erzielen, ist es nötig, die zuvor beschriebene inhomogene Verteilung der Phospholipide im Blutplasma zu verringern und gleichzeitig ein hohe Beweglichkeit zumindest der phosphorhaltigen Gruppe herbeizuführen. Dies kann durch Zugabe von Detergentien (hier Natriumcholat^{*}) erreicht werden. Es bilden sich gemischte (aus Phospholipiden und Cholat bestehende) Mizellen, deren starke Krümmung bewirkt, daß die äußeren Molekülteile eine hohe Beweglichkeit aufweisen, wodurch sich die Anisotropie der chemischen Verschiebung, ähnlich wie in einer homogenen Lösung, ausmitteln kann. Aus diesem Grund erhält man von Molekülen, die in Mizellen angeordnet sind, NMR-Spektren mit geringen Linienbreiten. Für gemischte Mizellen werden dabei die niedrigsten Linienbreiten gefunden. Durch Zugabe von Detergentien erhält man also Signale geringer Linienbreite und gleichmäßiger Linienform^{106, 107, 108}.

Abbildung 2 zeigt nun ein typisches ³¹P-NMR-Spektrum von Blutplasma, wie es nach Zugabe der Standardlösung mit Natriumcholat als Detergens erhalten werden kann. Der Bereich der Phospholipide liegt bei hohem Feld, gefolgt von dem Peak für das anorganische Phosphat und dem Signal für die Standardsubstanz bei tieferem Feld.

* Natriumcholat ist das Natriumsalz der Cholsäure, einer Gallensäure, die im menschlichen Körper zu finden ist. Gallensäuren sind Detergentien und wirken im Körper als Fettemulgatoren.

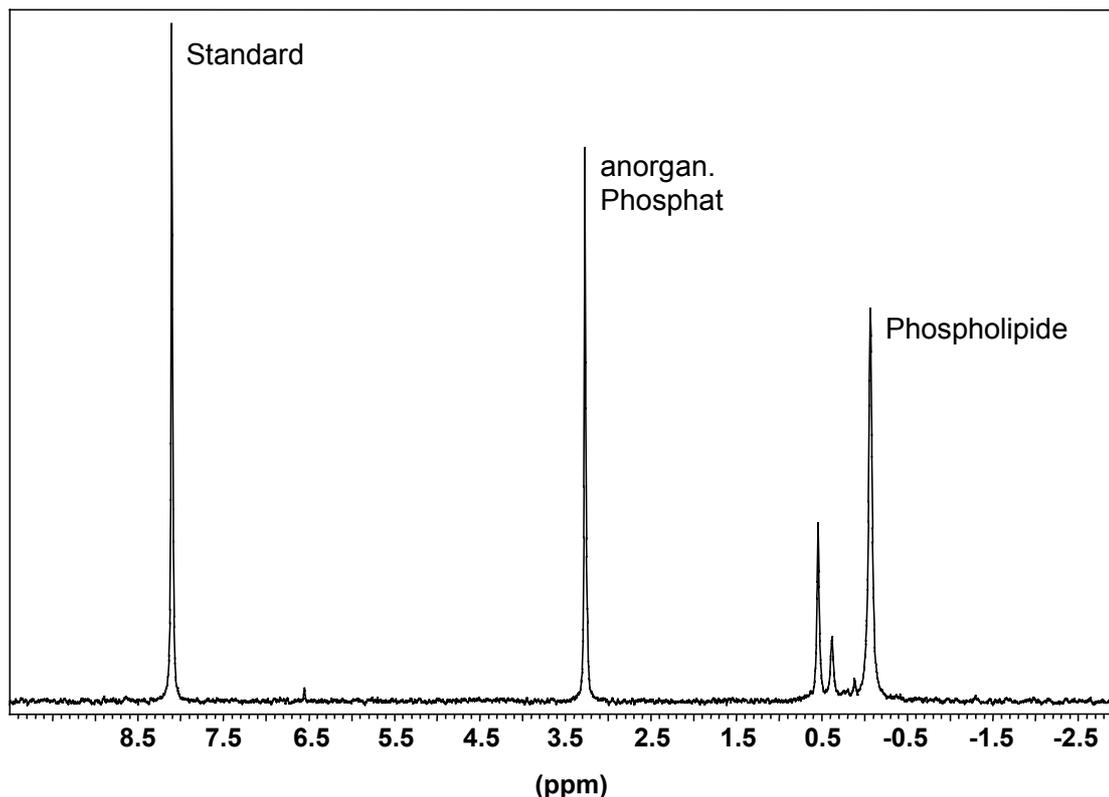


Abbildung 2 ^{31}P -NMR-Spektrum von Blutplasma nach Zugabe von Natriumcholat als Detergens.

Standardlösung

Die in dieser Arbeit verwendete Standardlösung, die eine quantitative Auswertung der ^{31}P -NMR-Spektren möglich macht, wird wie folgt zubereitet: 5 g (230 mmol/l^{*}) Natriumcholat, 43,3 mg (5,12 mmol/l) (Lösung 1) bzw. 40,6 mg (4,65 mmol/l) (Lösung 2) N-Phosphonomethylglycin (Standardsubstanz, PMG), 50 mg (25 mmol/l) NaOH und 500 mg (26,87 mmol/l) Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz ($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) werden vorgelegt und mit D_2O auf 50 ml aufgefüllt. Die Substanzen stammen von den Firmen Sigma-Aldrich GmbH (Deisenhofen) und Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz), das D_2O von der Firma Deutero GmbH (Herresbach). Lösung 1 weist einen pH-Wert von 9,35 bei 24°C auf, Lösung 2 einen pH-Wert von 9,27 bei 24°C. Die Standardlösungen werden direkt nach dem Ansetzen portionsweise eingefroren und die einzelnen Portionen zur Vorbereitung der Proben (s. Probenvorbereitung und Probenhaltbarkeit) aufgetaut.

^{*} Bezogen auf die fertige Standardlösung.

Obwohl das Plasma vor Zugabe der Standardlösung schon EDTA enthält (s.Kap. 2.2.2) wird zusätzlich EDTA über die Standardlösung zugesetzt, da die im Plasma enthaltenen, mehrfach geladene Kationen zu einer Verbreiterung der Signale im Spektrum führen können. EDTA komplexiert diese Kationen, wodurch die Linienbreite verringert werden kann¹⁰⁶. Die Standardlösung enthält 5 g Natriumchololat als Detergens. Die Notwendigkeit für die Zugabe eines Detergens wurde im vorangegangenen Abschnitt bereits erläutert. In der Diplomarbeit wurde gezeigt, daß weniger Natriumchololat zu einer Verschlechterung des S/R-Verhältnisses für die Phospholipide führte. Die Zugabe einer größeren Menge Natriumchololat erbrachte aber keine weitere Verbesserung für die Phospholipidsignale. Ein Punkt, der auch berücksichtigt werden muß und die Zugabe an Natriumchololat zur Standardlösung limitiert, ist, daß die kritische Mizellkonzentration in der Probe nicht überschritten wird, da man nur gemischte Phospholipid-Detergens- und nicht noch zusätzlich reine Detergensmizellen haben möchte. Reine Detergensmizellen erhöhen die Viskosität der Lösung und verringern ihre Homogenität, so daß eine Verschlechterung der Spektrenqualität eintritt¹⁰⁹. Eine quantitative Untersuchungsreihe mit unterschiedlichen Cholatkonzentrationen zeigte, daß Cholatkonzentration über einen ausreichend breiten Bereich keinen Einfluß auf die gemessenen Phospholipidkonzentrationen hat. Ein solcher Effekt wäre zu befürchten, wenn die Phospholipide nicht nahezu ausschließlich in den beschriebenen Mizellen vorlägen sondern weiterhin auch in anderen Phasen, die zu breiten NMR-Signalanteilen führten. Ein solches Vorliegen von breiten und scharfen Signalanteilen würde zu einem Cholatkonzentrationsabhängigen Fehler bei der Integration führen, da in der Regel nur die scharfen Signalanteile integriert würden. Bei der Wahl der Cholatkonzentration ist zusätzlich zu berücksichtigen, daß sich bei der Zugabe einer größeren Menge Natriumchololats in D₂O ein Problem bezüglich der Löslichkeit des Natriumchololats ergibt. Die Löslichkeit von Natriumchololat hängt u. a. vom pH-Wert ab, weshalb in der Standardlösung NaOH zugesetzt werden mußte. Die hier verwendeten Standardlösungen hatten einen pH-Wert von 9,35, bzw. 9,27 (bei 24°C), der sich als Kompromiß zwischen der mit steigendem pH-Wert zunehmenden Löslichkeit des Natriumchololats (und der mit der größeren Konzentration an Natriumchololat verbundenen geringeren Linienbreiten) und den mit Erhöhung des pH-Wertes allgemein zunehmenden Linienbreiten ergab¹¹⁰. Somit konnte in dieser Doktorarbeit im Vergleich zur Diplomarbeit (pH: 10,16 bei 24°C) der pH-Wert der Standardlösung gesenkt werden. Die Proben weisen dann einen pH-Wert von acht auf, der dem physiologischen pH-Wert des

Blutes von 7,4 schon sehr nahe kommt. Zu beachten ist bei den Messungen allerdings die Abhängigkeit der chemischen Verschiebung vom pH-Wert (leichte Hochfeldverschiebung mit Anstieg des pH-Wertes)^{106,111}.

Als Standardsubstanz für die quantitativen ³¹P-NMR-spektroskopischen Messungen wurde N-Phosphonomethylglycin in einer Konzentration von ca. 5 mmol/l in der Standardlösung verwendet. Dies entspricht bei einem Verhältnis von 4:1 von Blutplasma zu Standardlösung einer Konzentration von ca. 1 mmol/l in der Probe, wodurch der Standard eine Signalgröße im Bereich der Phospholipide einnimmt.

N-Phosphonomethylglycin erfüllt die Kriterien, die eine Standardsubstanz aufweisen muß, es besitzt eine ausreichend kurze T₁-Zeit, eine ³¹P-chemische Verschiebung, die nahe am Bereich derjenigen der zu untersuchenden Verbindungen liegt, ohne diese zu überlagern, es ist gut einzuwiegen, löst sich in ausreichender Menge in D₂O und ist bei Raumtemperatur stabil. Um zu testen, ob der Standard allerdings auch in ausreichender Menge im Blutplasma löslich und in der Konzentration, in der er zugegeben wurde im Spektrum des Blutplasmas wiederzufinden ist, wurde eine Konzentrationsreihe angesetzt, wobei die Konzentrationen in dem hinterher verwendeten Bereich liegen sollten. Aufgenommen wurden die Spektren bei einer Temperatur von 310 K mit einer ausreichend langen Repetitionszeit (5xT₁). Die Proben hatten einen pH-Wert von acht nach Zugabe einer Lösung zum Blutplasma, die neben N-Phosphonomethylglycin Adenosinmonophosphat (s. u.), Natriumcholat, EDTA und NaOH in D₂O enthielt. Die Konzentration an N-Phosphonomethylglycin wurde aus dem Verhältnis der Signalflächen von PMG zu Adenosinmonophosphat bestimmt. Wie die nachfolgende Abbildung zeigt, ergab sich der erwartete, lineare Zusammenhang zwischen der eingesetzten Menge und der ³¹P-NMR-spektroskopisch ermittelten Menge an N-Phosphonomethylglycin.

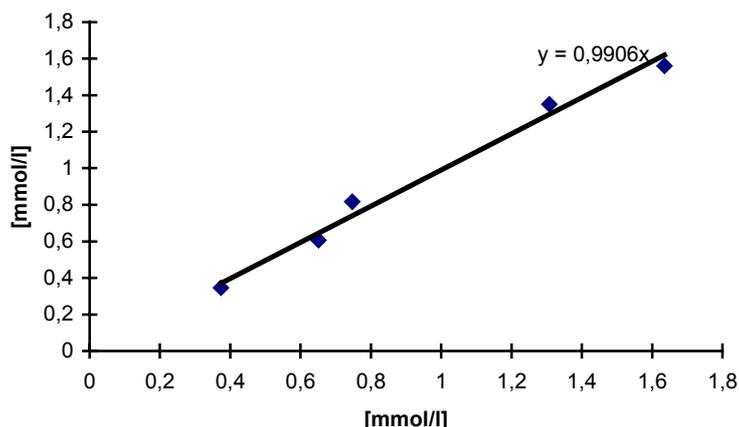


Abbildung 3 Durch lineare Regression ermittelte Gerade für den Zusammenhang zwischen eingesetztem und ermitteltem Gehalt an N-Phosphonome-thylglycine in Blutplasma. Angaben in mmol/l. Die x-Achse bezeichnet die eingesetzte, die SOLL-Menge, die y-Achse, die ermittelte, die IST-Menge.

Zur Eichung der Standardlösungen nach dem Ansetzen und zur Überprüfung der Haltbarkeit der Standardlösungen wurde zunächst eine Lösung von Adenosinmonophosphat (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen) in D₂O verwendet. Die Konzentration an AMP betrug 10,03 mmol/l. AMP zeigt im Phosphorspektrum ein Singulett bei 4,5 ppm. Die Standardlösungen wurden dabei in reiner Form mit AMP-Lösung versetzt und vermessen. Außerdem wurden die Standardlösungen, zusammen mit Blutplasma, mit AMP-Lösung versetzt und vermessen. Das Problem bei der Verwendung von AMP liegt in der T₁-Zeit von AMP (20 sec.), die eine Messung mit einer sehr langen Repetitionszeit erforderlich macht. Das bedeutet, daß die Messungen entweder sehr lange dauern, und dadurch die Probe einer immer größer werdenden Belastung ausgesetzt ist, oder eine kürzere Meßzeit gewählt wird, die aber auf Kosten des Signal/Rauschverhältnisses und damit der Auswertbarkeit der Spektren geht. Eine Überprüfung der Standardlösungen alleine und zusammen mit (jeweils frisch zugesetztem) Blutplasma nach zwei und nach sechs Monaten zeigte keine Veränderung in der Konzentration der Standardsubstanz (Abweichungen zwischen 0,95 bis 1,9 %). Zur Überprüfung der reinen Standardlösung wurde auch eine Lösung 10 mmolarer Phosphorsäure erprobt (für HPCE, Fluka). Die Phosphorsäure zeigt im Phosphorspektrum ein Singulett bei 1,8 ppm und hat eine T₁-Zeit von 6 sec. Dadurch konnte die Meßdauer erheblich verkürzt werden. Alle Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 310 K und mit einer Repetitionszeit, die 5xT₁ entsprach. Die Konzentration der

Standardsubstanz wurde immer aus dem Verhältnis der Flächen der Signale für die Vergleichssubstanz (Konzentration bekannt) und des Standards gewonnen.

Um die Haltbarkeit der Standardsubstanz während der Aufnahme der ^{31}P -NMR-Spektren zu testen wurden zwei Meßreihen durchgeführt, in denen Spektren von Blutplasma zusammen mit der Standardlösung unter den üblichen Meßbedingungen (s. S. 35) in einer Reihenmessung über einen langen Zeitraum hinweg aufgenommen wurden. Detektiert wurden acht Spektren mit einer Meßzeit von jeweils 1,5 Stunden, d. h. die Gesamtmeßzeit betrug 12 Stunden. In einer zweiten Meßreihe wurden drei Spektren mit einer Meßzeit von sechs Stunden aufgenommen, d. h. einer Gesamtmeßdauer von 18 Stunden Meßzeit. Die folgende Abbildung (Abbildung 4) zeigt zwei Spektren aus jeder Meßreihe und das dazugehörige Differenzspektrum. Die obere der beiden Grafiken zeigt zwei Spektren nach 1,5 und nach 12 Stunden Meßdauer (erste Meßreihe), die untere zwei Spektren nach sechs und nach 18 Stunden Meßdauer (zweite Meßreihe). Die Konzentration der Standardsubstanz scheint auch nach 18 Stunden unverändert zu sein.

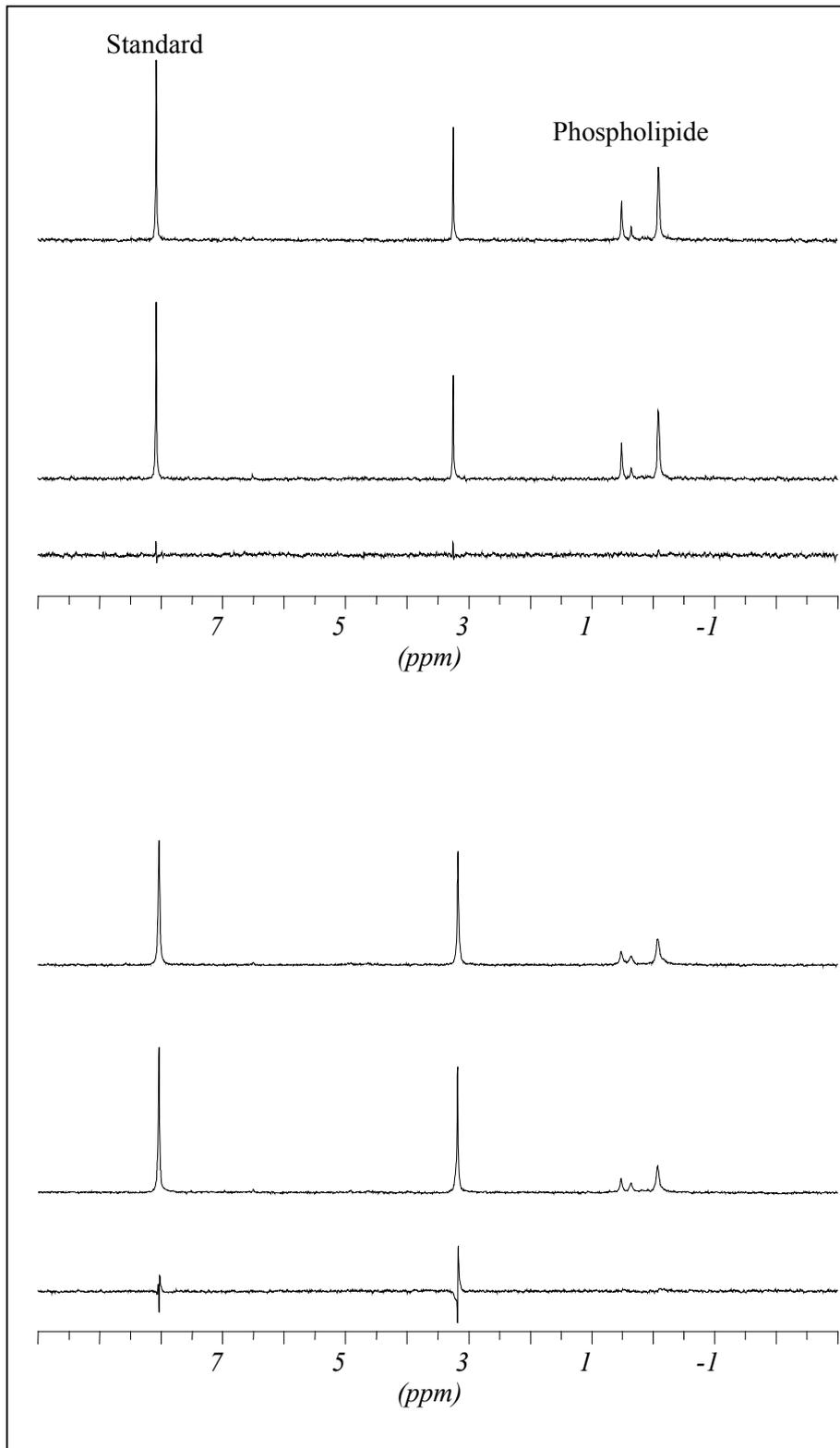


Abbildung 4 ^{31}P -NMR-Spektren von Blutplasma nach 1,5 und 12 Stunden Meßdauer (obere Abbildung), sowie nach 6 und nach 18 Stunden Meßdauer (untere Abbildung). Zu sehen sind außerdem die Differenzspektren. Das Signal des Standards findet sich bei 8 ppm, die Phospholipide im Bereich zwischen 0,5 und -0,5 ppm. Für genauere Zuordnungen s. nächsten Abschnitt.

Neben dieser Standardsubstanz wurden auch andere Substanzen auf ihre Tauglichkeit als Standardsubstanzen untersucht, sie erwiesen sich jedoch aus verschiedenen Gründen gegenüber dem N-Phosphonomethylglycin unterlegen: tert-Butylphosphonsäure wies eine T_1 -Zeit auf, die über sieben Sekunden lag, n-Butylphosphat hatte eine kürzere T_1 -Zeit als N-Phosphonomethylglycin (2,6 sec.), lag dafür aber als Gemisch aus Mono- und Diester vor, während Triphenylphosphanoxid eine sehr kurze T_1 -Zeit aufwies (0,8 sec.), aber im Blutplasma nicht in ausreichender Menge löslich war. Die in der Diplomarbeit verwendeten Substanzen Methylendiphosphonsäure und L-Glycerin-3-phosphat liegen mit ihren T_1 -Zeiten von 7,2 sec., bzw. 10,1 sec. deutlich über den für N-Phosphonomethylglycin ermittelten 3,4 sec*. Für den Einsatz von Methylendiphosphonsäure erwies es sich außerdem als nachteilig, daß die Substanz hygroskopisch, und damit schwierig einzuwiegen und in Lösung nicht über einen längeren Zeitraum stabil ist.

Spektroskopie, Wahl der Aufnahmeparameter

Die eindimensionalen ^{31}P -NMR-Spektren wurden an einem AMX 300 der Firma Bruker bei einer Meßfrequenz (SFO1) von 121,4973 MHz aufgenommen. Soweit nicht anders angegeben, wurden folgende Parameter für die Spektrenaquisition gewählt: Meßtemperatur 37°C (310 K). Als Locksubstanz wird dem Plasma über die Standardlösung 20 % D_2O zugegeben. Der SR-Wert beträgt -3547,7 Hz, was einer chemischen Verschiebung von 0 ppm für 85%ige Phosphorsäure entspricht. Gemessen werden die Proben in einem 10 mm Phosphorkopf. Die Spektren werden inverse-gated ^1H entkoppelt aufgenommen (waltz 16), um $^{31}\text{P}/^1\text{H}$ -Kopplungen zu eliminieren und den Aufbau von NOE zu verhindern. Die Pulslänge beträgt 3,8 μsec ., was einem Pulswinkel von 30° entspricht. Die SW wird zu 3906 Hz gewählt, die TD zu 16 K, und die Repetitionszeit zu 3,7 sec. Für ein Spektrum werden 5000 FIDs summiert. Prozessiert werden die Spektren an einem PC mit dem Programm WIN-NMR 5.1 der Firma Bruker Analytische Meßtechnik GmbH (Multiplikation der FIDs mit einer Exponentialfunktion von $\text{LB} = 1$). Die Flächen der Signale werden mit Hilfe von iterativer Dekonvolution unter Verwendung des Programmes PERCH¹¹² (PERCH Projekt, Kupio, Finnland) bestimmt.

* Alle T_1 -Zeiten wurden mittels der inversion recovery Methode bestimmt.

Die T_1 -Zeiten der Standardsubstanz und der Phospholipide wurden mit Hilfe einer Pulssequenz bestimmt, die die Methode des sogenannten inversion recovery benutzt¹¹³. Die T_1 -Zeiten wurden zu 3,4 sec. für die Standardsubstanz und 1,3-2,0 sec. für die Phospholipide ermittelt (s. Tabelle 2, S. 39).

Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei einer Temperatur von 37°C. Diese Temperatur wurde nicht nur ausgewählt, weil sie der Körpertemperatur entspricht, sondern auch, weil infolge der bei höherer Temperatur geringeren Viskosität des Plasmas das Signal/Rausch-Verhältnis etwas besser sein sollte. Tatsächlich waren besonders die kleinen Signale für LPC2 und PI bei 37°C besser zu erkennen als bei 23°C. Das Spektrum, welches bei 23°C aufgenommen wurde, zeigte außerdem eine leichte Hochfeldverschiebung und größere Linienbreiten der Signale. Die sehr gute Reproduzierbarkeit der Spektren wurde schon im Kapitel 2.2.2 besprochen. Um zu ermitteln, welche Repetitionszeit ausreicht, um quantitativ auswertbare Spektren zu erhalten, wurden Sättigungsmessungen durchgeführt, da eine kürzere Repetitionszeit auch eine Verkürzung der Meßzeit bedeutet. Die Signalfläche des Standardsignals wurde dabei relativ zu PE+SM gemessen, was durch die mit den T_1 -Zeiten der Phospholipide der vergleichbar kurzen T_1 -Zeit von 1,7 sec direkt den zu erwartenden Effekt verdeutlicht. Zusätzlich wurde auch die Signalfläche des PMG alleine mit Hilfe des Integrationsprogrammes bestimmt und bewertet, was in dieser Reihenmessung möglich ist, da alle weiteren Parameter unverändert blieben. Vergleicht man die Werte des Standardsignals für die einzelnen Repetitionszeiten relativ zur größten Repetitionszeit von 19 sec. (mehr als 5 mal T_1 der Standardsubstanz) so ergeben sich bei einer Repetitionszeit unter 2 sec. Abweichungen die größer als 25 % sind, d. h. die Signalfläche ist bei zwei Sekunden Repetitionszeit erheblich kleiner als bei 19 sec. Für 2,5 sec. beträgt der Unterschied zwischen der Signalfläche und der Signalfläche bei 19 sec. Repetitionszeit noch 14 %, für 3 sec. 9 %, bei 3,5 sec. 3,5 % und 4 sec 1,6 %. Die Abweichungen für die größeren Repetitionszeiten (4,5 sec., 5,5 sec., 6 sec., 7 sec.) liegen im gleichen Bereich. Die Fehler, die man bei mehrmaligem Auswerten einer Messung für die Signalflächen erhält, betragen ca. 5 %. Dieser Fehler liegt über der Abweichung, die sich aus dem Vergleich der Signalflächen bei Repetitionszeiten von 3,5 sec. und 4 sec. im Vergleich mit der Signalfläche bei 19 sec. ergeben. Daher kann man davon ausgehen, daß bei einer Repetitionszeit zwischen 3,5 sec. und 4 sec. keine große Abweichung im Vergleich mit der langen Repetitionszeit mehr besteht. Trotzdem wird die Signalfläche bis zu 19 sec. noch größer. Als Kompromiß zwischen einer möglichst kurzen

Repetitionszeit (für eine möglichst kurze Meßzeit) und einer Repetitionszeit, bei der wenig oder keine Sättigung vorhanden ist, wurde eine Repetitionszeit von 3,7 sec. als ausreichend angesehen, um bei einem Pulswinkel von 30° quantitative Messungen durchzuführen. Die folgende Abbildung zeigt die (relative) Größe des Standardsignals in Abhängigkeit von der Repetitionszeit der Messung.

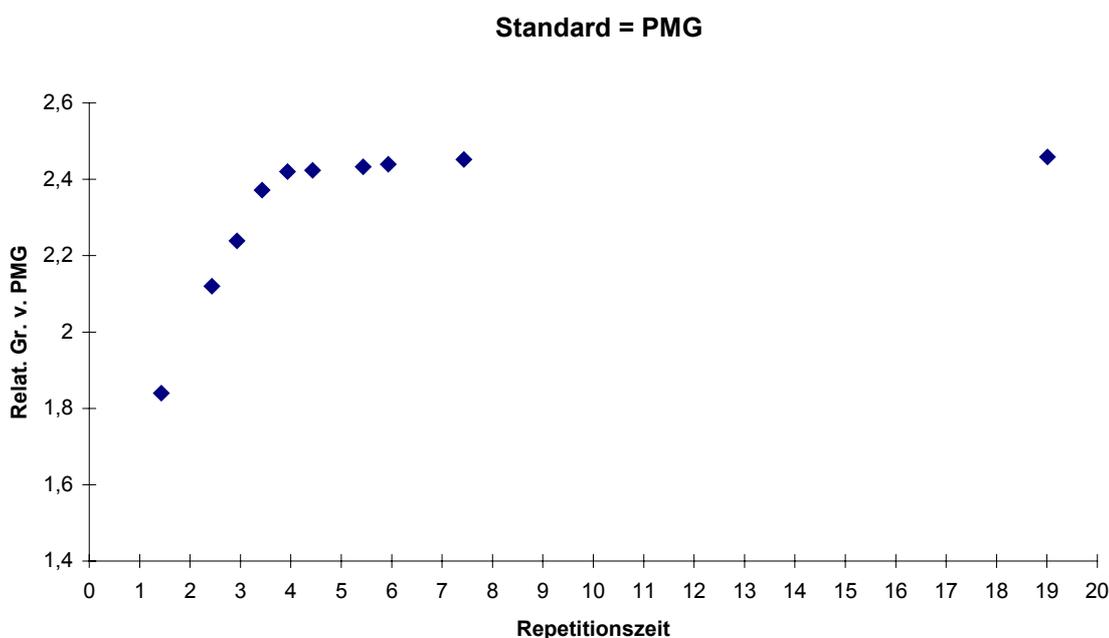


Abbildung 5 Relative Größe (im Verhältnis zu PE+SM) des Standardsignals (PMG) in Abhängigkeit von der Repetitionszeit.

Durch den Einsatz der hier beschriebenen neuen Standardsubstanz mit kürzerer T_1 -Zeit und der dadurch möglichen, mit Hilfe der Sättigungsmessungen bestimmten, kürzeren Repetitionszeit, konnte die Meßzeit auf 5 Stunden gesenkt werden. Im Gegensatz dazu wurde während der Diplomarbeit noch mit einer Aufnahmezeit von 6,5 Stunden für ein Spektrum gearbeitet, wobei trotzdem noch, aufgrund der großen T_1 -Zeit von 10,1 sec. für den Standard, in der Sättigung gemessen wurde, was sich später bei der quantitativen Auswertung nur durch die Einführung eines Korrekturfaktors ausgleichen ließ. Die beschriebene Weiterentwicklung bedeutet somit nicht nur weniger Belastung für die Probe, sondern auch eine Verbesserung im Hinblick auf einen späteren routinemäßigen Einsatz (Serienmessungen).

Spektroskopie, Signalzuordnung

In der folgenden Abbildung (Abbildung 6) wird der Bereich der Phospholipide im Detail gezeigt. Da sich in der Literatur keine einheitlichen Signalzuordnungen für die Phospholipide finden lassen und die dort gewählten Meßbedingungen nicht mit den hier gewählten übereinstimmen (z. B. in Bezug auf den pH-Wert), mußten die einzelnen Phospholipidklassen unter den hier gewählten Bedingungen zugeordnet werden. Da jedoch die einzelnen Phospholipidklassen sehr wohl bekannt sind, wurden für die Zuordnung die entsprechenden Phospholipide zum Blutplasma zugegeben und anschließend der Anstieg der Signalintensität beobachtet¹¹⁰.

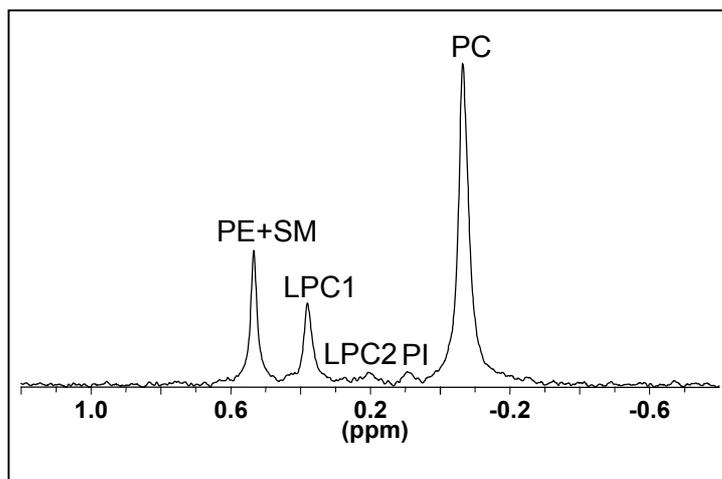


Abbildung 6 Bereich der Phospholipide aus einem ³¹P-NMR-Spektrum von Blutplasma eines gesunden Probanden.
Zuordnung der Phospholipide von niedrigem zu hohem Feld

PE+SM	Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin
LPC1	2-Acyl-Lysophosphatidylcholin
LPC2	1-Acyl-Lysophosphatidylcholin
PI	Phosphatidylinositol
PC	Phosphatidylcholin

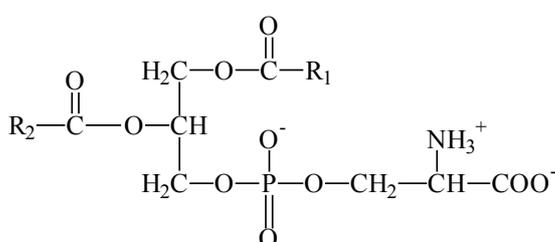
In der folgenden Tabelle werden die chemischen Verschiebungen und die longitudinalen Relaxationszeiten der Standardsubstanz und der im Blutplasma zu detektierenden Phospholipidklassen aufgeführt.

Tabelle 2 ^{31}P -chemische Verschiebungen und longitudinale Relaxationszeiten (T_1) der Standardsubstanz und der Phospholipide.

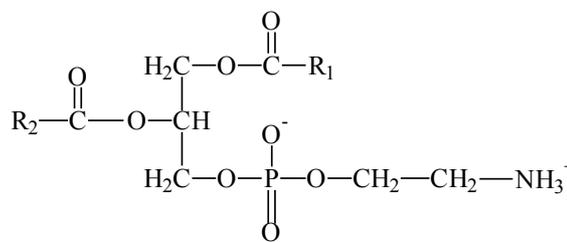
Zuordnung	PMG	CL	PE+S M	PS	LPC1	LPC2	PI	PC
chem. Verschiebung (ppm)	8,04	0,86	0,52	0,42	0,35	0,19	0,09	-0,09
T_1 -Zeit (sec.)	3,4	n.b.	1,7	n.b.	2,0	n.b.	1,3	1,7

Abkürzungen: PMG = N-Phosphonomethylglycin, CL = Cardiolipin, PE+SM = Phosphatidylethanolamin und Sphingomyelin, PS = Phosphatidylserin, LPC1 = 2-Acyl-Lysophosphatidylcholin, LPC2 = 1-Acyl-Lysophosphatidylcholin, PI = Phosphatidylinositol, PC = Phosphatidylcholin, n.b. = nicht bestimmt.

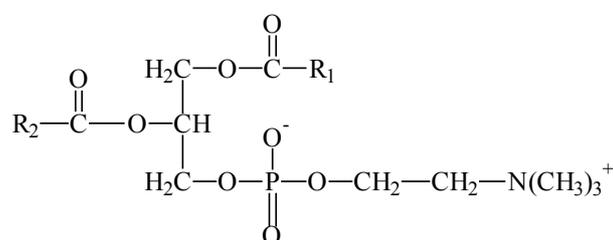
Die folgende Abbildung zeigt noch einmal die im Blutplasma zu detektierenden Phospholipidklassen.



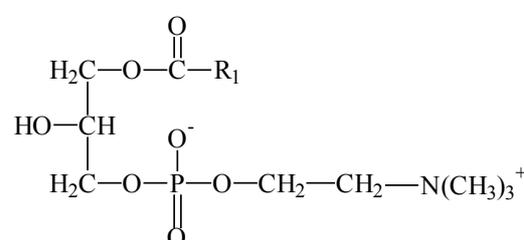
Phosphatidylserin, PS



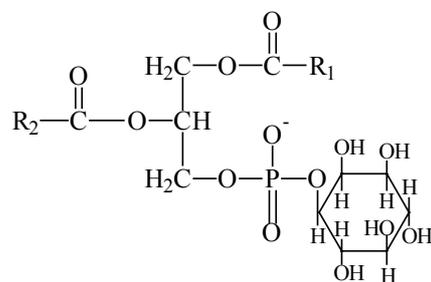
Phosphatidylethanolamin, PE



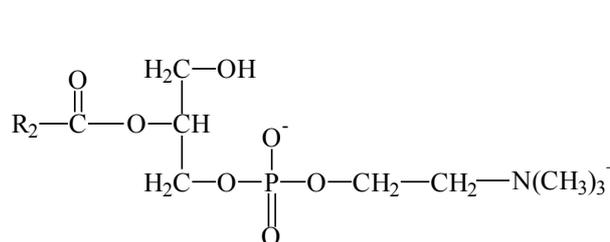
Phosphatidylcholin, PC



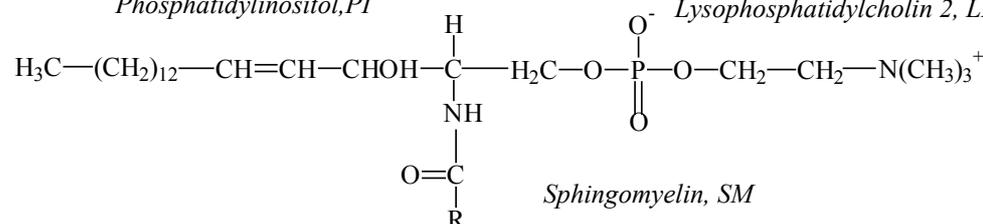
Lysophosphatidylcholin 1, LPC 1



Phosphatidylinositol, PI



Lysophosphatidylcholin 2, LPC 2



Sphingomyelin, SM

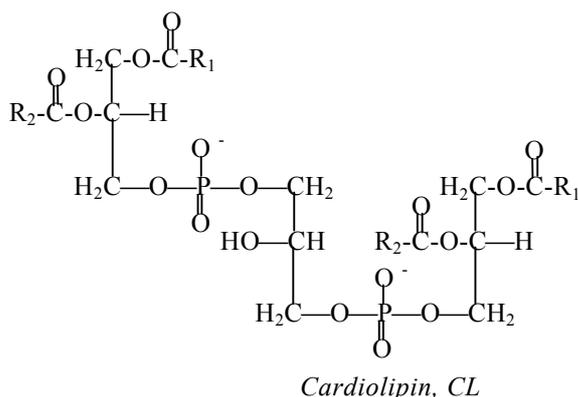


Abbildung 7 Im Blutplasma zu detektierende Phospholipidklassen.

Die Signallagen können, je nach Probe, um bis zu $\pm 0,04$ ppm abweichen. Eine Unterscheidung innerhalb einer Phospholipidklasse nach Art, Länge und Sättigungsgrad der Fettsäureketten ist nicht möglich.

Das Signal für das anorganische Phosphat, welches ebenfalls im Blutplasma detektiert werden kann (s. S. 29), erscheint bei 3,28 ppm und hat eine T_1 -Zeit von 10 sec., wodurch für eine quantitative Angabe der Konzentration an anorganischem Phosphat ein Korrekturfaktor nötig wird. In der Tabelle sind Phosphatidylethanolamin (PE) und Sphingomyelin (SM) zusammen aufgeführt. PE liegt als kleines Signal tieffeld neben SM, meistens ist es nur als Schulter des Signals für Sphingomyelin erkennbar und daher nicht in allen Proben mit hinreichender Genauigkeit zu integrieren. Es wurde daher in der Auswertung der Ergebnisse mit SM zusammengefaßt. Daß die beiden Signale, die man für Lysophosphatidylcholin erhält, auf die an unterschiedlichen Positionen erfolgte Deacylierung (entweder an Position 1 oder 2) zurückzuführen sind, wurde schon in der Einleitung erwähnt. In der Tabelle angegeben sind auch die chemischen Verschiebungen für die Phospholipide Cardiolipin (CL) und Phosphatidylserin (PS). Phosphatidylserin ist nicht in allen Proben zu detektieren und wurde daher nicht mit ausgewertet. Cardiolipin wurde ebenfalls nicht mit in die Integrationen einbezogen, da es nur sehr selten detektiert werden konnte. Dies ist allerdings nicht erstaunlich, da, wie in der Einleitung erwähnt, Cardiolipin nicht im Blutplasma selbst, sondern nur in den Membranen der Mitochondrien vorkommt. Die Mitochondrien sind Zellorganellen die, im Inneren der Zellen gelegen, eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel der Zelle spielen. Ein Auftreten von CL im Blutplasma muß als Zeichen von Zelledestruktion gewertet werden,

weil nur auf diese Weise Cardiolipin freigesetzt werden kann. Die meisten Zellen des menschlichen Körpers sind reich an Mitochondrien, die Erythrozyten enthalten diese Organellen aber nicht, wohl aber verschiedene Formen der Leukozyten und die Thrombozyten. Trotzdem kann man annehmen, daß das Cardiolipin nicht aus der Zerstörung von Zellen bei der Probengewinnung, sondern aus der Zerstörung von anderem (Tumor-)Gewebe z. B. aus zerstörten Nierenzellen stammt, da sich beispielsweise bei Patienten mit Glomerulonephritis* ebenfalls CL im Blutplasma nachweisen läßt¹¹⁴. Cardiolipin wurde allerdings bei Patienten aller Kollektive gefunden, nicht nur bei Patienten mit Nierenzellkarzinom. Bei Probanden konnte es nicht nachgewiesen werden. In einigen Proben konnte noch ein Signal für ein O-Alkyl-Phospholipid (PC-O-Alk) (s. Anhang) mit einer chemischen Verschiebung von 0,06 ppm detektiert werden. Es wird jedoch häufig von dem Signal für PC verdeckt und wurde nicht mit ausgewertet. Einige Plasmaproben zeigten Peaks von Abbauprodukten von Phospholipiden (z. B. Glycerinphosphat). Diese Abbauprodukte konnten sowohl bei Patienten, wie auch bei gesunden Probanden detektiert werden und können im Blutplasma z. B. durch Einwirkung der Phospholipasen (s. Anhang) entstehen. Aufgrund ihrer geringen Intensität wurden sie nicht mit ausgewertet. Die in dem oberen Spektrum gezeigten Phospholipidklassen Abbildung 6, S. 38) dagegen konnten mit guter Reproduzierbarkeit quantitativ ausgewertet werden, indem man die Signalflächen ihrer Signale mit der des Standards verglich.

2.2.4 Bedingungen für die Aufnahme und quantitative Auswertung der ¹H-NMR-Spektren

Allgemeines

Ein Problem bei der quantitativen Auswertung der ¹H-NMR-Spektren von Blutplasma stellen die sich überlappenden und oft auch von mehreren Substanzen stammenden Signale der Lipidbestandteile dar. Ein Grund liegt, wie bei den Phospholipiden auch, in der geringen Löslichkeit der Lipide im Blutplasma, deren Hauptgruppen die Triacylglycerine, Cholesterin, und Cholesterinester ausmachen. Diese Lipide liegen daher im wesentlichen im Blutplasma nicht frei, sondern zusammen mit den Phospholipiden in den Lipoproteinmizellen (s. Kap. 2.1.1) physikalisch gebunden vor. Die Lipoproteine unterscheiden sich in ihrer Größe, Dichte und Anteil der verschiedenen Lipide. Für die

* bakterielle Nierenerkrankung

Bestandteile der verschiedenen Lipoproteinarten lassen sich unterschiedliche Signale zuordnen (s. dieses Kapitel, Signalzuordnung). Für die ^{31}P -NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde dem Plasma über die Standardlösung ein Detergens zugesetzt, um die inhomogene Verteilung der Phospholipide im Blutplasma zu verringern und gleichzeitig eine höhere Beweglichkeit zumindest der phosphorhaltigen Gruppe herbeizuführen, um dadurch Signale mit einer geringeren Linienbreite zu erzielen. Auch bei den hier beschriebenen Lipiden könnte durch Zusatz eines Detergens die inhomogene Verteilung der Lipide verringert werden. Allerdings werden in den ^1H -NMR-Spektren die Signale der Fettsäuregruppen in den Lipiden und nicht, wie bei den Phospholipiden, die wasserlöslichen Gruppen detektiert. Eine Erhöhung der Beweglichkeit der Fettsäurereste durch die Einbringen in gemischte Lipid-/Detergensmizellen wäre daher in einer wässrigen Lösung nicht gegeben. Als weiterer Nachteil bei der Verwendung eines Detergens wäre außerdem der Verlust der Signale, die den Bestandteilen der unterschiedlichen Lipoproteinarten zuzuordnen sind, zu nennen. Die Plasmaproben wurden daher ohne Zusatz von Detergens vermessen und ausgewertet.

Standardlösung

Die für die quantitative Auswertung der ^1H -NMR-Spektren verwendete Standardlösung hatte folgende Zusammensetzung: 108,9 mg (25,29 mmol/l^{*}) Tetradeuterotrimethylsilylpropionat (Natriumsalz) (Standardsubstanz, TMSP) werden vorgelegt und mit D_2O auf 25 ml aufgefüllt. Die Standardsubstanz stammt von der Firma Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz), das D_2O von der Firma Deutero GmbH (Herresbach). Die Standardlösung wurde direkt nach dem Ansetzen portionsweise eingefroren und die einzelnen Portionen zur Probenvorbereitung (s. Kap. 2.2.2, S. 23) aufgetaut.

Die Plasmaproben enthalten EDTA, welches bei der Blutabnahme zur Verhinderung der Gerinnung des Blutes zugesetzt wird (s. Kap. 2.2.2, S. 23). EDTA zeigt im ^1H -NMR-Spektrum Signale bei 3,60 ppm, 2,72 ppm und 2,58 ppm. Die Signale haben zwar eine relativ hohe Intensität, stören aber bei einer Auswertung der Lipidsignale nicht. Eine Möglichkeit, ohne EDTA auszukommen wäre durch die Verwendung von Serum[†] statt Plasma gegeben. EDTA bietet allerdings den Vorteil, daß es die im Plasma enthaltenen,

* Bezogen auf die fertige Standardlösung.

† Der durch Blutgerinnung von Fibrin und zellulären Blutbestandteilen befreite, wässrige Bestandteil des Blutes.

mehrfach geladenen Kationen komplexiert. Diese Kationen können sonst zu einer Verbreiterung der Signale im Spektrum beitragen¹⁰⁶.

Als Standardsubstanz für die quantitativen ¹H-NMR-spektroskopischen Messungen wurde Tetradeuterotrimethylsilylpropionat (TMSP) verwendet. Bei dieser Standardsubstanz handelt es sich um eine für wäßrige Lösungen gängige Standardsubstanz in der ¹H-NMR-Spektroskopie¹¹⁵. Sie ist gut einzuwiegen, löst sich in ausreichender Menge in D₂O, ist bei Raumtemperatur stabil und hat in wäßrigen Lösungen eine chemische Verschiebung von 0 ppm. Damit dient sie als Referenz für die chemischen Verschiebungen und liegt nahe an dem Verschiebungsbereich der zu untersuchenden Substanzen, ohne diese zu überlagern.

Zur Eichung der Standardlösung nach dem Ansetzen und zur Überprüfung der Haltbarkeit wurde eine Lösung von Natriumtatratrihydrat (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz) in D₂O verwendet. Die Konzentration an Natriumtatratrihydrat betrug 102,47 mmol/l. Natriumtatratrihydrat zeigt im ¹H-NMR-Spektrum ein Singulett bei 4,32 ppm und hat eine T₁-Zeit von 1,5 sec. Die Standardlösungen wurden in reiner Form zusammen mit der Tatratrilösung vermessen. Auf eine Unterdrückung des Wassersignals mußte wegen der Nähe des Signals des Tatratri zum Wassersignal verzichtet werden. Die Messungen erfolgten bei einer Temperatur von 310 K mit einer ausreichend langen Repetitionszeit (5xT₁). Die Konzentration der Standardsubstanz wurde aus dem Verhältnis der Flächen der Signale für die Vergleichssubstanz (Konzentration bekannt) und des Standards gewonnen.

Um die Haltbarkeit der Standardsubstanz während der Aufnahme der Spektren zu testen wurde eine Reihenmessung durchgeführt, in der Spektren von Blutplasma zusammen mit der Standardlösung unter den üblichen Meßbedingungen (s. folgenden Abschnitt) nach 25 min., nach 50 min. und nach 75 min. aufgenommen wurden. Dabei konnte für die Konzentration Standardsubstanz nach 75 min. keine Veränderung festgestellt werden, wie sich aus den Differenzspektren ablesen ließ.

Spektroskopie, Wahl der Aufnahmeparameter

Die eindimensionalen ¹H-NMR-Spektren wurden an einem DRX 500 der Firma Bruker aufgenommen. Die Proben temperatur betrug 37°C (310 K). Als Locksubstanz wird dem Plasma über die Standardlösung 20 % D₂O zugegeben. Gemessen wurden die Proben in

einem 5 mm Invers-Kopf. Die Spektren wurden mit einer Pulssequenz aufgenommen, die, mittels Vorsättigung, das sonst dominierende Wassersignal unterdrückte (p19 66dB, d8 150 msec.). Der O1 (d. h. die Meßfrequenz) wurde auf das Wassersignal gesetzt. Weitere Aquisitionsparameter wurden wie folgt gewählt: Pulslänge 12,0 sec. bei 5 dB (entspricht 90°), Spektrenweite 6009 Hz, TD 32 K, Repetitionszeit 5,7 sec. Für ein Spektrum werden 256 FIDs summiert. Referenziert werden die Spektren auf TMSp zu 0 ppm.

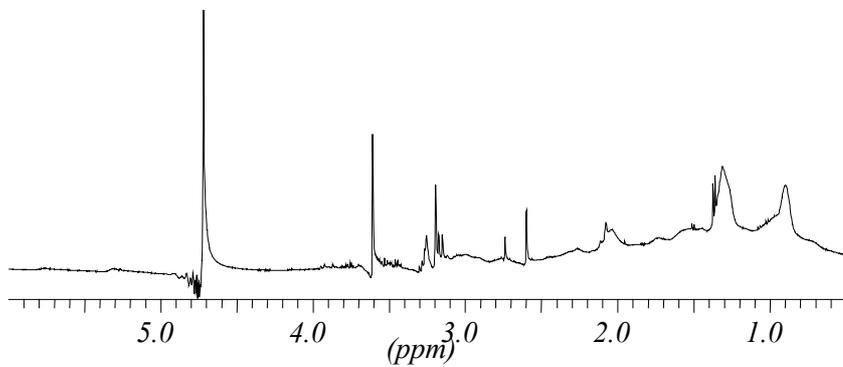
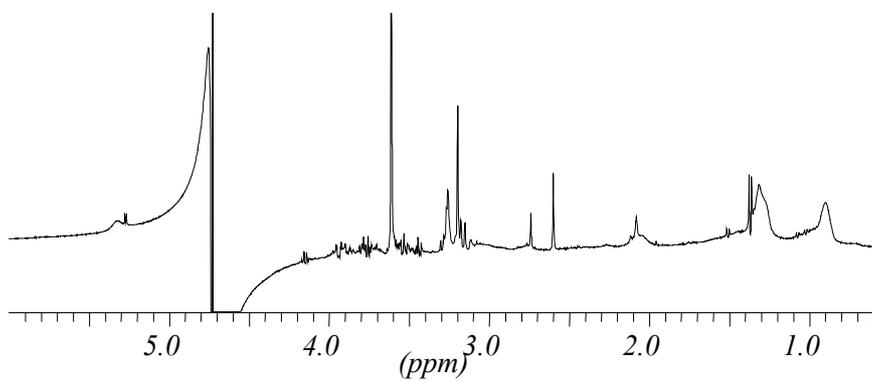
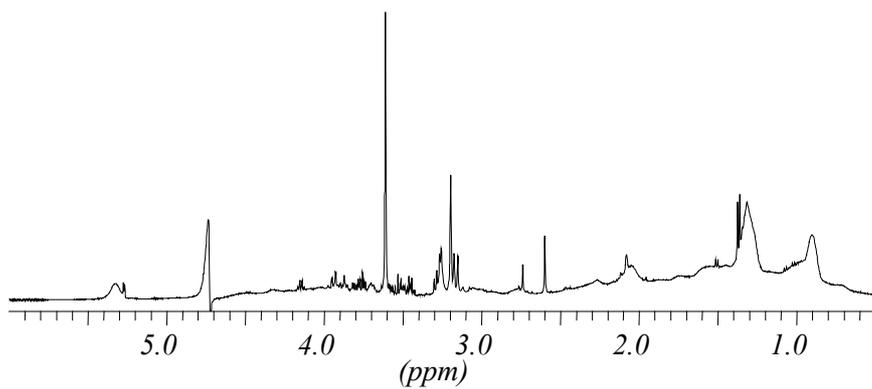
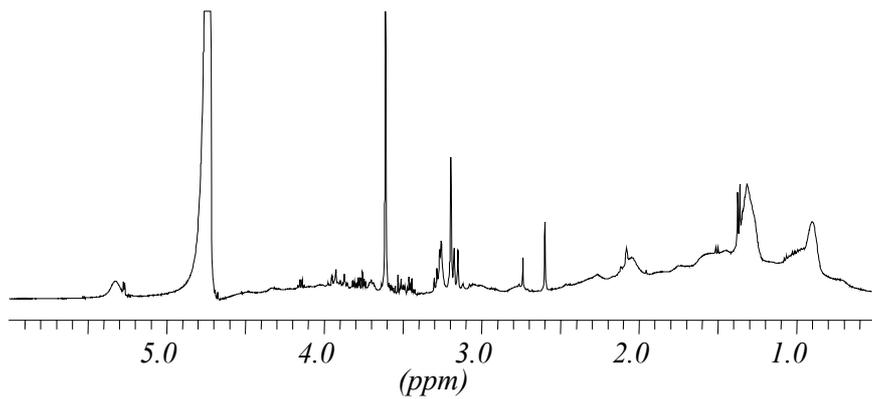
Prozessiert wurden die Spektren an einer SGI-Workstation mit Hilfe des Programmes X-WINNMR 2.0 Bruker Analytische Meßtechnik GmbH. Die Peakflächen wurden mit Hilfe von iterativer Dekonvolution unter Verwendung des Programmes PERCH (PERCH Projekt, Kupio, Finnland)¹¹² bestimmt.

Die T_1 -Zeiten der Standardsubstanz und der Lipidsignale wurden mit Hilfe einer Pulssequenz bestimmt, die die Methode des sogenannten inversion recovery¹¹³ benutzt. Die T_1 -Zeiten wurden zu 0,6 sec. für die Standardsubstanz, zu 0,3-0,4 sec. für die Lipidsignale und zu 1,4 sec. für das Laktatsignal ermittelt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit einer Repetitionszeit, die größer als $5 \times T_1$ ist, wodurch eine quantitative Auswertung der Signalflächen möglich wird.

Da bei biologischen Proben das Signal für Wasser das Spektrum dominiert ist es erforderlich, zur Spektrenaufnahme eine Pulssequenz auszuwählen, die das Wassersignal möglichst gut unterdrückt, ohne die umliegenden Signale zu beeinflussen. Für routinemäßige quantitative Auswertungen sind außerdem eine gerade Basislinie und phasenkorrigierbare Signale erforderlich. Da es keine Pulssequenz gibt, die als die Beste für wässrige Lösungen angesehen werden kann, wurden verschiedene Pulssequenzen ausgewählt. Wichtig war dabei, neben der guten Wasserunterdrückung auch eine gute Handhabbarkeit der Pulssequenzen, d. h. die Experimente sollten ohne größeren Aufwand aufgesetzt werden können, um auch in späteren Routineanwendungen einsetzbar zu sein.

Ausprobiert wurde daher zuerst die einfachste und klassische Methode, die Unterdrückung des Wassersignals mittels selektiver Vorsättigung und unmittelbar anschließender Spektrenaufnahme (Bruker-Programm: zgpr). Der Effekt der Vorsättigung ist die Gleichbesetzung der Energieniveaus und somit die „Zerstörung“ der z-Magnetisierung des Wassers vor Beginn der Messung. Eine weitere Methode benutzt ebenfalls eine selektive Vorsättigung des Wassersignals, daran schließt sich jedoch eine Pulssequenz an, in deren Verlauf eine weitere selektive Sättigung des Wassersignals

erfolgt, diese Sequenz ist, obwohl andere Effekte ausgenutzt werden, mit einer NOESY Pulsfolge identisch (Bruker-Programm: noesypr1d). Neben den Methoden zur Wasserunterdrückung, die auf dem Effekt der Sättigung beruhen, werden in der Literatur weitere Methoden beschrieben, die als Gemeinsamkeit die selektive Anregung (oder auch selektive Nicht-Anregung) des Wassersignals ausnutzen. Ein typischer Vertreter dieser Methoden ist die Watergate-Sequenz. Die Watergate-Sequenz erzeugt immer zunächst transversale Magnetisierung aller Kerne, und erreicht durch den Einsatz von sogenannten Gradientenpulsen eine Zerstörung der transversalen Magnetisierung des Wassers. Hierzu ist in jedem Fall die Erzeugung einer Phasendifferenz von 180° zwischen dem zu unterdrückenden Wassersignal und den interessierenden Signalen notwendig. Drei häufiger benutzte Abwandlungen dieser Methode wurden auf ihre Verwendbarkeit getestet. Als erstes wurde eine Watergate-Sequenz eingesetzt, bei der zur Erzeugung der Phasendifferenz selektive gauss-shaped (HF-)Pulse verwendet werden (Bruker-Programm: zggswwg). Als zweites wurde eine Sequenz, die durch eine Abfolge harter, nicht selektiver Pulse - einer Binomialsequenz - (zggswwgh.ac) die benötigte Phasendifferenz erzeugt. Die dritte Sequenz, Excitation Sculpting (zggswwsh.ac), ist im Prinzip nur eine Verdopplung der letztgenannten es werden zwei Watergate-Sequenz mit unterschiedlichen Gradientenstärken nacheinander verwendet. In den folgenden Abbildungen ist der Vergleich der für die verschiedenen Pulssequenzen erhaltenen Spektren in der oben angegebenen Reihenfolge zu sehen. Die Spektren wurden alle bei einer Temperatur von 310 K aufgenommen.



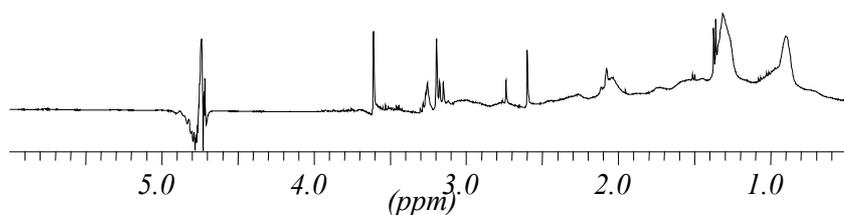


Abbildung 8 Wasserunterdrückung unter Verwendung verschiedener Pulssequenzen.

Es ist zu erkennen, daß das Wassersignal unter Verwendung der Pulssequenz, die einfache Vorsättigung benutzt, nicht vollständig unterdrückt ist und noch die mehrfache Größe der interessierenden Signale aufweist. Allerdings verläuft die Basislinie im Spektrum gerade und die Lipidsignale (Zuordnung, s. nächsten Abschnitt) bleiben unbeeinflusst. Prinzipiell ist diese Sequenz bereits für die Zwecke der eindimensionalen NMR-Spektroskopie, auch bezüglich der Anforderungen für die quantitative Auswertung, geeignet. Das Wassersignal bleibt als „Schönheitsfehler“, eine automatisierte Auswertung würde jedenfalls geringfügig erschwert.

Die Pulssequenz, die sich von einer NOESY-Sequenz ableitet und in der das Wassersignal zweimal gesättigt wird zeigt von allen hier getesteten Methoden mit Abstand die beste Wasserunterdrückung, das Signal besitzt nur noch ein Drittel der Höhe des intensivsten Signals. Trotz dieser guten Wasserunterdrückung verläuft auch hier die Basislinie gerade und die Lipidsignale bleiben unbeeinflusst.

Bei der Verwendung einer Watergate-Sequenz mit selektiven Pulsen wird das Wassersignal ebenfalls unterdrückt, allerdings werden die umliegenden Signale so stark beeinflusst, daß sie nicht mehr phasenkorrigierbar sind. Die Lipidsignale werden ebenfalls in Mitleidenschaft gezogen. Was aus diesem Ausschnitt des Spektrums nicht zu erkennen ist, ist, daß die Basislinie nicht mehr gerade verläuft und es schwierig ist, überhaupt eine Phasenkorrektur des Spektrums durchzuführen.

Verwendet man eine Binomialesequenz, so wird das Wassersignal zwar recht gut unterdrückt und auch der Einfluß auf die Lipidsignale wird geringer. Signale, die nahe am Wassersignal liegen (4,4-3,8 ppm) werden vollständig, die etwas weiter weg liegen (5,3 ppm und 3,8-3,5 ppm) nahezu vollständig unterdrückt. Außerdem treten immer noch

Phasenfehler bei den Signalen im Bereich von 3,5-3,1 ppm auf und die Basislinie verläuft nicht gerade.

Wird Excitation Sculpting angewendet so ist zu erkennen, daß diese Sequenz das Wassersignal gut unterdrückt, es treten aber Phasenfehler für die Signale im Bereich von 3,5-2,5 ppm auf. Signale, die in der Nähe des Wassersignals liegen werden vollständig unterdrückt (5,3 ppm und 4,5-3,8 ppm). Insgesamt zeigen die Lipidsignale geringere Intensität, wenn man sie mit den aus den Spektren unter Verwendung von Pulssequenzen vergleicht, die das Wassersignal mittels Vorsättigung unterdrücken.

Getestet wurde zusätzlich, ob durch variieren der Gradientenstärken der Watergate- und Excitation Sculpting-Sequenz ein besseres Ergebnis erzielt werden konnte. Es läßt sich feststellen, daß sich so eine noch bessere Wasserunterdrückung erzielen ließ, die Beeinflussung der anderen Signale im Spektrum wurde allerdings nicht geringer.

Bei den Untersuchungen zeigte sich, daß die Vorsättigungsmethoden den Watergate-Sequenzen im angestrebten Einsatzbereich erheblich überlegen sind. Die bei der Verwendung der Watergate-Sequenz beobachteten Basislinienverzerrungen sind im wesentlichen nichts anderes als der „Fuß“ des Wassersignals, der durch den selektiven Puls nicht mit erfaßt werden kann. Käme man auf die Idee, den Puls weniger selektiv zu machen, würden automatisch die interessierenden Signale mit erfaßt. Die Selektion durch eine Binomialesequenz ist nicht selektiv genug, diese Sequenz ist mit der weithin bekannten Jump-Return Methode vergleichbar, deren Anregungsspektrum einer Sinuskurve entspricht, dies ist der Hauptgrund für die Intensitäts- und Phasenverfälschung dieser Spektren.

Die Pulssequenz, die sich von der NOESY-Pulsfolge ableitet liefert also für die hier untersuchten Proben die beste Wasserunterdrückung und beeinflußt sowohl die Signale, die nahe am Wassersignal liegen, wie auch die Lipidsignale am wenigsten. Außerdem ist die Zahl der zu kalibrierenden Parameter gering und die Anwendung einfach genug, um auch Reihenuntersuchungen durchzuführen.

Ein weiterer wichtiger Parameter bei der Aufnahme von Plasmaspektren ist die Wahl der Temperatur. Für einen Vergleich wurden Spektren einer Probe bei 20°C (293 K), 30°C (303 K) und 37°C (310 K) aufgenommen. Die untere Abbildung zeigt den Vergleich der Spektren bei 37°C und 20°C.

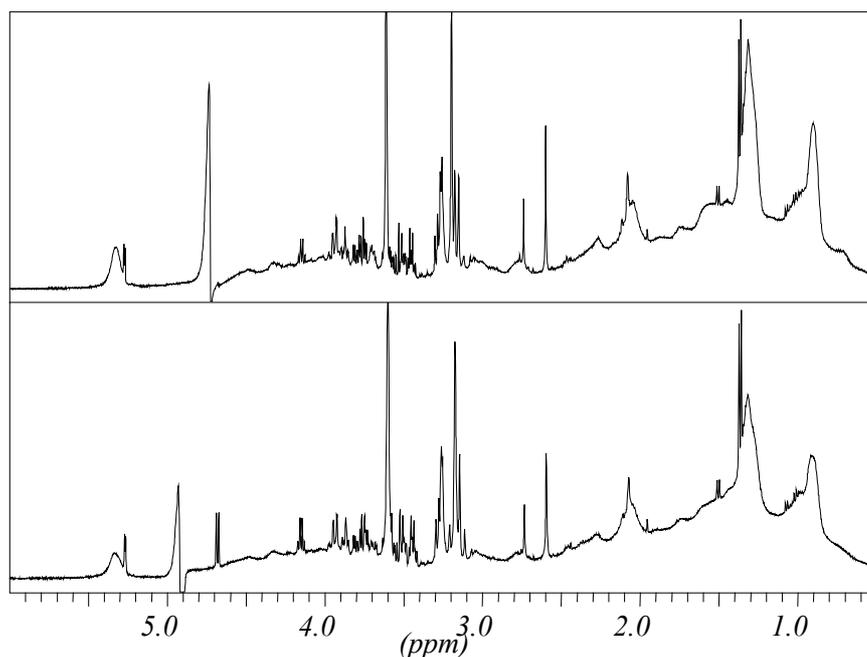


Abbildung 9 ^1H -NMR-Spektrum bei einer Temperatur von 37°C (oben) und gleiche Probe bei einer Temperatur von 20°C .

Das bei einer Temperatur von 37°C aufgenommene Spektrum zeigt für die Signale der Fettsäurereste (s. später in diesem Abschnitt, Signalzuordnung) geringere Linienbreiten, und somit eine bessere Auftrennung der Signale. Aber auch das Signal für Cholin erscheint besser getrennt von den Signalen des H2 von β -Glukose ebenso wie das Signal, welches den CH_2 -Gruppen im Glycerin zuzuordnen ist (s. später in diesem Abschnitt, Signalzuordnung). Die Signale der Aminosäuren bleiben dagegen unbeeinflusst. Ein Grund für die Veränderung der Lipidsignale mit der Änderung der Temperatur könnte in der bei höherer Temperatur größeren Mobilität der Fettsäureketten in den Lipiden bestehen, sowie in der bei höheren Temperatur geringeren Viskosität des Plasmas. Das Wassersignal zeigt bei der höheren Temperatur eine Verschiebung zu höherem Feld, wodurch es zu einer Überlagerung mit dem Dublett des anomeren Protons H1 der β -Glukose (4,66 ppm) kommen kann (Zuordnung der anderen Signale, siehe später in diesem Abschnitt Signalzuordnung). Da in dieser Arbeit aber hauptsächlich die Signale der Lipidbestandteile ausgewertet werden sollen ist es nötig, bei höherer Temperatur zu messen. Die Temperatur über den physiologischen Wert von 37°C zu erhöhen erscheint nicht ratsam, da die Belastung der Probe dann zu groß wird. Die hier gefunden Unterschiede für eine Meßtemperatur von 37°C gegenüber 30°C und 20°C decken sich

mit den in der Literatur beschriebenen¹¹⁶. Für die Spektren in dieser Arbeit wurde folglich eine Temperatur von 310 K (37°C) gewählt.

Die Spektren wurden alle an einem 11,7 Tesla-Gerät (¹H Frequenz 500 MHz) aufgenommen, im Gegensatz zu den Phosphorspektren, die an einem 7 Tesla-Gerät (¹H Frequenz 300 MHz) vermessen wurden. Der Grund liegt in dem Aufbau der ¹H-Spektren, die eine Vielzahl von Signalen aufweisen, darunter viele breite Lipidsignale und Signale, die sich teilweise überlappen. Die bei einer höheren Feldstärke aufgenommenen Spektren zeigen eine bessere Auftrennung sowohl der breiten Lipid- wie auch der schmalen Signale der Aminosäuren und der Zucker. In einem Plasmaspektrum, welches am 7 Tesla-Gerät aufgenommen wurde, lassen sich die Signale des H2 von β -Glukose nicht von dem Signal für das Cholin trennen und die Signale für das anomere H1 der α -Glukose nicht von dem zu CH-Gruppen ungesättigter Fettsäuren gehörigen. Das Signal für Glycerin wird von Glukosesignalen überlagert. Die Signale, die dem Albumin (zusammen mit Lysin) zuzuordnen sind, sind bei einem 500 MHz-Spektrum gut zu erkennen, bei einem Spektrum, welches an einem 300 MHz-Gerät aufgenommen wurde sind sie nicht mehr zu erkennen. Die Wasserunterdrückung sollte bei der Verwendung eines 11,7 Tesla-Gerätes selektiver sein, da das Signal für Wasser besser von umliegenden Signalen getrennt erscheint und damit die Hochfeldverschiebung ausgleichen.

In der Literatur¹¹⁶ wird beschrieben, daß bei einer Spektrometerfrequenz unter 750 MHz (17,6 Tesla) keine Signale für C18 des HDL und Albumin (zusammen mit Lysin) zu erkennen sind. Dies trifft für die hier gemessenen Spektren nicht zu. Der Vergleich der Spektren, die an einem 11,7 Tesla und den in der Literatur abgebildeten Spektren, die an einem 17,6 Tesla-Gerät aufgenommen wurden, zeigt, daß in beiden Spektren die Lipidsignale und auch die Signale für Zucker und Aminosäuren gut erkennbar und getrennt erscheinen. Das Gerät mit der größeren Telszahl liefert allerdings bei VLDL1 und LDL1, sowie VLDL2 und LDL2 etwas besser aufgetrennte Signale, die allerdings immer noch nicht getrennt integrierbar erscheinen. Die Auftrennung dieser Signale kann auch bei 11,7 Tesla beobachtet werden, allerdings nicht immer. Einen Vorteil liefert das 17,6 Tesla-Gerät bei der Zuordnung der Signale, dies gehörte in dieser Arbeit aber nicht zur Aufgabenstellung.

Spektroskopie, Signalzuordnung

Die Zuordnung der Signale erfolgt nach Literaturdaten¹¹⁶. Es werden nur Signale zugeordnet, die auch in der Literatur in den eindimensionalen Spektren sichtbar waren. In der unteren Abbildung ist ein ¹H-NMR-Spektrum einer Plasmaprobe mit Standardlösung abgebildet. Die Peakzuordnungen sind der folgenden Tabelle (Tabelle 3) zu entnehmen. Es werden nur die Signale aufgeführt, die für diese Untersuchung ausgewertet wurden. Dies sind neben den Signalen der Lipide, noch die Signale von Cholin (Bestandteil von Lipiden und Phospholipiden) und freiem Glycerin (Ausgangs- und Abbauprodukt von Lipiden und Phospholipiden), der Aminosäuren Valin und Alanin (Konzentration im Nierenzellkarzinomgewebe verändert), von Laktat (Veränderung bei Nierenerkrankungen möglich), der Acetylgruppen von Glykoproteinen (bilden proteinhaltigen Anteil von Zellmembranen), von Albumin (mit Lysin) (Veränderung bei Nierenerkrankungen möglich) und von Glukose (Veränderung bei Nierenerkrankungen möglich) ausgewertet worden. Eine genauere Beschreibung erfolgt auf Seite 53.

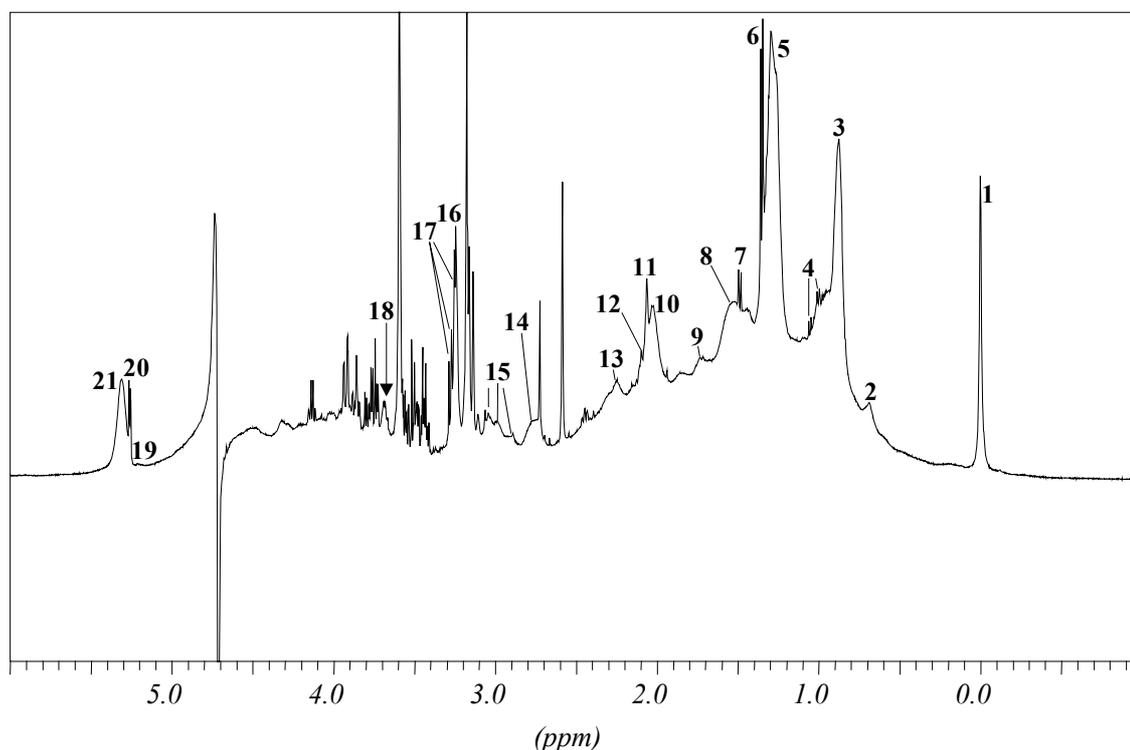


Abbildung 10 ¹H-NMR-Spektrum eines gesunden Probanden.

Tabelle 3 Chemische Verschiebung (in ppm), Multiplizität (aus Literatur) und Zuordnung der in Abbildung 10 aufgeführten und in dieser Arbeit ausgewerteten Signale. Die Zuordnung erfolgt von hohem zu tiefem Feld.

Peak	chemische Verschiebung (ppm)	Multiplizität	Substanz	Zuordnung
1	0	s	Standardsubstanz	<u>-CH₃</u> der Trimethylsilylgruppe
2	0,69	m	HDL	<u>C18</u> (-CH ₃) von Cholesterin in HDL
3	0,88	t	VLDL1+LDL1	LDL1 → <u>CH₃</u> (CH ₂) _n VLDL1 → <u>CH₃</u> CH ₂ CH ₂ HC= terminale CH ₃ -Gruppen von Fettsäuren
4	1,00 1,06	2 x d	Valin	<u>-CH₃</u>
5	1,28	m	VLDL2+LDL2	LDL2 → (<u>CH₂</u>) _n VLDL2 → <u>-CH₂</u> CH ₂ COOR
6	1,35	d	Laktat	<u>-CH₃</u>
7	1,49	d	Alanin	<u>-CH₃</u>
8	1,54	m	Lipid (hauptsächlich aus VLDL)	<u>-CH₂</u> CH ₂ COOR
9	1,74	m	Lipid	<u>-CH₂</u> CH ₂ HC=CH-
10	2,03	m	Lipid	<u>-CH₂</u> HC=CH-
11	2,06	s	Glykoprotein	<u>-NHCOCH₃</u> gehören beide zu Acetylsignalen von α ₁ -aciden Glykoproteinen
12	2,10	s	Glykoprotein	
13	2,25	m	Lipid	<u>-CH₂</u> COOR
14	2,76	m	Lipid	<u>-HC=CHCH₂</u> HC=CH-
15	2,89 2,98 3,04	3 x t	Albumin und Lysin	ε- <u>CH₂</u> -
16	3,25	s	Cholin	<u>-N⁺(CH₃)₃</u> Gruppen verschiedener cholinhaltiger Moleküle in Lipoproteinen
17	3,27	dd	β-Glukose	H2
18	3,67	dd	Glycerin (freies)	<u>-CH₂</u>
19	5,20	m	Glycerylgruppen von Lipiden	= <u>CH</u> COOR
20	5,26	d	α-Glukose	anomeres H1
21	5,31	m	Lipide	CH-Gruppen ungesättigter Fettsäuren in Lipiden, <u>-CH=CH</u> CH ₂ <u>CH=CH-</u> und = <u>CH</u> CH ₂ CH ₂ -

Abkürzungen: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dubletts, t = Triplett, m = Multipllett, unterstrichene Gruppen liefern die entsprechenden Signale, HDL = high density lipoproteine, LDL = low density lipoproteine, VLDL = very low density lipoproteine (s. Kap. 2.1.1).

Die Spektren wurden hier auf die Standardsubstanz (TMSP) bei 0 ppm kalibriert, in der Literatur wurde auf das Dublett des H1 der α -Glukose bei 5,223 ppm kalibriert. Es wird daher eine Abweichung der Signallagen um durchschnittlich 0,03 ppm von den in der Literatur beschriebenen beobachtet.

Die Signallagen können, je nach Probe um bis zu $\pm 0,02$ ppm abweichen. Es lassen sich keine Unterschiede in den chemischen Verschiebungen zwischen Patienten und Probanden feststellen, die über die durchschnittliche Abweichung von 0,02 ppm hinausgehen.

Ein weiteres Signal für Glukose, das des anomeren H1 der β -Glukose bei 4,66 ppm ist nur in einigen Spektren aufgelöst und wurde daher nicht mit ausgewertet.

Die ^1H -NMR-Spektren weisen eine Vielzahl von Signalen auf. Scharfe Signale erhält man von Substanzen mit kleinem Molekulargewicht, wie Aminosäuren und Zucker, sowie Laktat. Die breiten, schlechter getrennten Signale sind Lipidbestandteilen zuzuordnen, die, aufgrund des größeren Molekulargewichtes und des schon erwähnten Problems der Löslichkeit Signale mit einer großen Linienbreite aufweisen. Die Spektren von Patienten und Probanden unterscheiden sich nicht in der Art der Substanzen, sondern nur in deren Konzentration. Die Lipidsignale bestehen aus Signalen, die zu den Fettsäuren der Lipide gehören. Drei Lipidsignale lassen sich Fettsäuren, bzw. einer Cholesteringruppe aus verschiedenen Lipoproteinen zuordnen. VLDL1, bzw. VLDL2 erscheinen in einigen aber nicht in allen Spektren getrennt von LDL1, bzw. LDL2, daher wurden VLDL und LDL für die entsprechenden Signale zusammen ausgewertet. VLDL1/2 und LDL1/2 beziehen sich nicht auf Untergruppen der Lipoproteine, sondern auf die Gruppen, die die Signale liefern, welche beim VLDL1 und LDL1 CH_3 -Gruppen, beim VLDL2 und LDL2 CH_2 -Gruppen zuzuordnen sind. Für das HDL konnte nur eine CH_3 -Gruppe, die aus dem Cholesterin in HDL stammt, zugeordnet werden. Anteile von CH_3 -Gruppen und CH_2 -Gruppen aus Fettsäureresten von Triacylglycerinen, Phospholipiden und Cholesterinestern befinden sich im gleichen Bereich wie die von VLDL und LDL, können aber nicht getrennt zugeordnet werden. Eine Unterscheidung der Signale der Fettsäuren nach Art der Fettsäure, Kettenlänge und Sättigungsgrad ist nicht möglich.

Zusätzlich zu den Lipidsignalen sind noch die Signale von Cholin und freiem Glycerin, der Aminosäuren Valin und Alanin, von Laktat, der Acetylgruppen von Glykoproteinen, von Albumin (mit Lysin) und von Glukose ausgewertet worden.

Cholin ist ein Bestandteil von Lipiden bzw. Phospholipiden (s. Kap. 5.1), Glycerin dient sowohl zum Aufbau von Lipiden, ist aber auch ein Abbauprodukt von ihnen. Beide Substanzen gehören also zu den von Lipiden stammenden Signalen. Für das Glycerin konnte allerdings nur ein Signal ausgewertet werden, da das andere Signal von dem Signal für EDTA bei 3,60 ppm verdeckt wurde.

Die Signale für die Aminosäuren Valin und Alanin wurden ausgewertet, weil MAS-Messungen an Nierenzellkarzinomen gezeigt haben, daß diese Aminosäuren im Karzinomgewebe eine niedrigere Konzentration aufweisen als in gesundem Gewebe⁸ und es daher interessant erschien zu untersuchen, ob auch im Plasma Veränderungen der Konzentration dieser Aminosäuren nachzuweisen sind.

Die Signale von Laktat und Glukose wurden ausgewertet, weil ein erhöhter Laktatwert nicht nur nach intensiver körperlicher Betätigung, sondern auch bei der sogenannten Zuckerkrankheit auftreten kann und damit, zusammen mit Glukose ein Indikator für die Nierenfunktion der Patienten in unserer Untersuchung sein kann. Von den zu Glukose und Laktat gehörigen Signalen sind hier allerdings nur die intensivsten Signale ausgewertet worden. Die zu den Glykoproteinen gehörenden Signale wurden ausgewertet, weil Glykoproteine den proteinhaltigen Teil von Zellmembranen bilden. Allerdings können die Signale dieser Substanzen nach Angaben in der Literatur die Signale von anderen Substanzen mit niedrigem Molekulargewicht verdecken und daher ist es schwierig, exakte Konzentrationsangaben zu machen¹¹⁶. Die Signale, die zu den Albuminen gehören wurden ausgewertet, weil Albumine u. a. als Transportproteine für wasserunlösliche Stoffe im Blut dienen. Sie transportieren neben anderen Substanzen freie Fettsäuren und Acetylcholin. Bei einer Nierenerkrankung kann es zu einem Albuminmangel kommen.

Die hier untersuchten Substanzen konnten mit guter Reproduzierbarkeit ausgewertet werden, indem man die Signalflächen der Signale mit der des Standards verglich. Allerdings ist hierzu zwingend eine Methode zu verwenden, die eine getrennte Integration auch dann erlaubt, wenn sich mehrere Signale überlagern beziehungsweise wenn kleinere, scharfe Signale auf großen, breiten Signalen liegen. Für die iterative Dekonvolution der Signale mit Hilfe des Programms PERCH (PERCH-Projekt, Kupio)¹¹² ermöglichte dies, während bei halbautomatischen Auswertungsprogrammen wie AMIX 2.1.3 der Firma Bruker Analytische Meßtechnik GmbH eben diese Differenzierung nicht ermöglichen.

Gruppen, die durch das in der vorliegenden Arbeit verwendete Programm PERCH einer quantitativen Auswertung zugänglich waren, sind z. B. das Dublett des H1 der α -Glukose (5,26 ppm) neben CH-Gruppen ungesättigter Fettsäuren in Lipiden (5,31 ppm)(Peak 21 und Peak 20), NAC1 und NAC2 auf dem Lipidsignal bei 2,03 ppm (Peak 10, 11, 12) und das Laktatsignal auf VLDL2+LDL2 bei 1,28 ppm (Peak 6 und 5).

2.2.5 Patienten- und Probandenkollektiv

2.2.5.1 Allgemeines

Patienten- und Probandenkollektiv wurden so ausgesucht, daß möglichst alle Faktoren, die zu einer Veränderung im Lipid- bzw. Phospholipidstoffwechsel führen könnten, die nicht auf eine Krebserkrankung (bei den Patienten) zurückzuführen ist, ausgeschlossen wurden. Entsprechend wurden die Ausschlußkriterien definiert, die Voraussetzungen für die Blutabnahme spezifiziert und die Einteilung der verschiedenen Kollektive definiert.

Ausschlußkriterien

Patienten und Probanden durften keine Nierendysfunktion aufweisen oder unter Kachexie (Auszehrung, Ernährungsmangel) oder unter einer Erkrankung, die zu einer Störung im Lipidstoffwechsel führen könnte leiden.

Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte bei allen Patienten und Probanden morgens in nüchternem Zustand, da die Konzentration der Phospholipide bzw. der Lipide überhaupt im Blutplasma in nicht unerheblicher Weise von der Tageszeit, bzw. dem Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme abhängt.

Einteilung der verschiedenen Kollektive

Weitere Einflüsse auf die Lipid- und Phospholipidwerte sind grundsätzlich aufgrund von Lebensalter, Geschlecht zu erwarten, bei Frauen kommen die Faktoren prä-/postmenopausal und Einnahme von Ovulationshemmern hinzu. Bei dem Patientenkollektiv muß zusätzlich noch der Tumorstatus beachtet werden. Es bietet sich nicht an, diese Faktoren durch Ein- und Ausschlußkriterien zu kontrollieren, da sich hierdurch die Patienten- und Probandenzahl zu weit reduzieren würde. Statt dessen werden diese Faktoren durch Auswahl von Probandensubkollektiven, die möglichst gut

an das Patientenkollektiv angepaßt sind, weitgehend ausgeglichen beziehungsweise durch nach diesen Faktoren stratifizierte Auswertung ergänzt.

2.2.5.2 Patientenkollektiv

³¹P-NMR-Spektroskopie

Für die ³¹P-NMR-spektroskopischen Untersuchungen zu dieser Arbeit wurde präoperativ gewonnenes Blutplasma von 29 (21m, 8w) Patienten mit Nierenzellkarzinom, 6 (3m, 3w) Patienten mit Dickdarmkarzinom, 9 Patientinnen mit Ovarialkarzinom und 12 Patientinnen mit Mammakarzinom verwendet. Die Altersverteilung ist Tabelle 4, S.57 zu entnehmen und entsprach im wesentlichen den für die Krebsarten üblichen Verteilungen. Eine medikamentöse Behandlung hatte bis zu diesem Zeitpunkt nicht stattgefunden. Neben diesen Ausgangs- wurden zusätzlich Vergleichsuntersuchungen durchgeführt.

Von 8 (5m, 3w) Patienten mit Nierenzellkarzinom wurde sechs Monate nach Nephrektomie* ein zweitesmal Blutplasma entnommen und ³¹P-NMR-spektroskopisch untersucht. Untersuchungen im Rahmen der klinischen Nachsorge zeigten, daß sich die Patienten dieses Kollektives zu diesem Zeitpunkt in Remission† befanden, d.h. keine Tumoren nachweisbar waren. Der bei dieser Krebsart geringen Überlebensrate entsprechend, konnten Plasmaproben der anderen Patienten mit Nierenzellkarzinom nicht mehr gewonnen werden, da die Patienten zwischenzeitlich verstorben waren. Für einen Vergleich der Ergebnisse für Patienten mit Nierenzellkarzinom mit denen von Patienten mit anderen Tumoren in der Niere wurde zusätzlich Blutplasma einer Patientin mit einem Urothelkarzinom im Nierenbecken, einer Patientin mit einem Bronchialkarzinom, mit Metastasen in der Niere und einer Patientin mit einem gutartigen Nierentumor vermessen und ausgewertet.

Bei zwei Patientinnen mit Ovarialkarzinom wurde für einen Vergleich der Phospholipidkonzentrationen vor und nach der Operation wenige Tage nach der Operation noch einmal Blut entnommen und NMR-spektroskopisch untersucht.

Die folgende Tabelle gibt die Altersverteilung innerhalb einzelnen Patientenkollektive an.

* Operative Entfernung der Niere

† (Vorübergehendes) Zurückgehen von Krankheitserscheinungen

Tabelle 4 Altersverteilung innerhalb der einzelnen Patientenkollektive

Patientenkollektiv	Anzahl	Altersverteilung	Mittelwert
Nierenzellkarzinom	29 (21m, 8w)	37-88 Jahre	62 Jahre
Ovarialkarzinom	9	30-72 Jahre	56 Jahre
Mammakarzinom	12	32-63 Jahre	47 Jahre

Zu den Patienten mit Dickdarmkarzinom können keine Angaben gemacht werden.

¹H-NMR-Spektroskopie

Wie schon in der Problemstellung erläutert, werden die ¹H-NMR-spektroskopischen Messungen als Ergänzung zu den ³¹P-NMR-spektroskopischen Untersuchungen gesehen. Deshalb und aufgrund der begrenzten Menge an Plasma wurden nur ¹H-Spektren von vier Frauen und fünf Männern mit Nierenzellkarzinomen (Durchschnittsalter 65 Jahre) und von acht Frauen mit Ovarialkarzinom (Durchschnittsalter 56 Jahre) aufgenommen. Zu Vergleichszwecken wurde von zwei Frauen mit Ovarialkarzinom kurz nach der Operation entnommenes Blutplasma ebenfalls ¹H-NMR-spektroskopisch vermessen.

2.2.5.3 Probandenkollektiv

³¹P-NMR-Spektroskopie

Für das Probandenkollektiv wurde Blutplasma von insgesamt vierzig (17m, 23w) Männern und Frauen im Alter zwischen 20 und 60 Jahren ³¹P-NMR-spektroskopisch untersucht. Die im Verhältnis zur Zahl der Patienten größere Zahl der Probanden ermöglichte für den Vergleich mit den unterschiedlichen Karzinomarten eine Einteilung in alters- und geschlechtsangepaßte Subkollektive.

Auswahl der Probandensubkollektive für die ³¹P-NMR-spektroskopischen Messungen

Zur Abschätzung der durch Alter und Geschlecht verursachten Unterschiede in den Phospholipidkonzentrationen wurden diese Einflüsse zunächst untersucht um die Einteilung in die Probandenkollektive festzulegen.

Geschlechtsspezifische Untersuchung für ältere Probanden

Vergleicht man die Phospholipidkonzentrationen elf älterer Frauen (Durchschnitt 49 Jahre, 38-60 Jahre) mit denen acht älterer Männer (Durchschnitt 53 Jahre, 46-60 Jahre), so lassen sich, bis auf die Konzentrationen an PC, keine signifikanten Unterschiede in den Phospholipidkonzentrationen feststellen. Der zweiseitige T-Test nach Student¹¹⁷ wird hier, und im folgenden benutzt, um die statistische Signifikanz der Ergebnisse zu überprüfen. P-Werte $\leq 0,05$ werden als signifikant angesehen, d. h. die verglichenen Werte unterscheiden sich mit einer Wahrscheinlichkeit, die größer als 95 % ist. Die Signifikanz für den höheren PC-Wert der Frauen gegenüber den Männern liegt bei 99 %. Tendenziell (nicht signifikant) weisen dagegen Männer im Mittel etwas höhere Werte für PI, LPC1, LPC2 und LPC1+2 auf, während Frauen neben PC etwas höhere Werte für PE+SM und die Summe der Phospholipide aufweisen. Die Standardabweichungen der Phospholipidkonzentrationen sind für die Frauen, bis auf LPC1, LPC2 und LPC1+2 und PI etwas größer als für die Männer. Die hier verwendeten Kollektive sind identisch mit denen, die auch beim Nierenzellkarzinom verwendet werden. Die folgende Tabelle (Tabelle 5) zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte für den Vergleich der Phospholipidkonzentrationen älterer Frauen mit denen älterer Männer.

Tabelle 5 Mittelwerte, Standardabweichungen (Stabw) und p-Werte für ältere Frauen und ältere Männer. Mittelwerte und Standardabweichungen werden in mmol/l angegeben.

Phospholipide	Gesunde ältere Frauen		Gesunde ältere Männer		Differenz (%)	p-Werte
	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw		
PE+SM	0,498	0,083	0,489	0,056	1.840	0,7948
LPC1	0,296	0,044	0,297	0,049	- .337	0,9567
LPC2	0,044	0,014	0,068	0,024	-35.294	0,1632
LPC1+2	0,340	0,047	0,365	0,067	-6.849	0,3496
PI	0,052	0,018	0,057	0,019	-8.772	0,5162
PC	1,947	0,259	1,621	0,219	20.111^s	0,0105
Σ P	2,837	0,364	2,532	0,289	12.046	0,0681

s: signifikante Differenz ($p \leq 0,05$), zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben.

Die folgende Abbildung stellt die Unterschiede in der Konzentration der Phospholipide noch einmal graphisch dar.

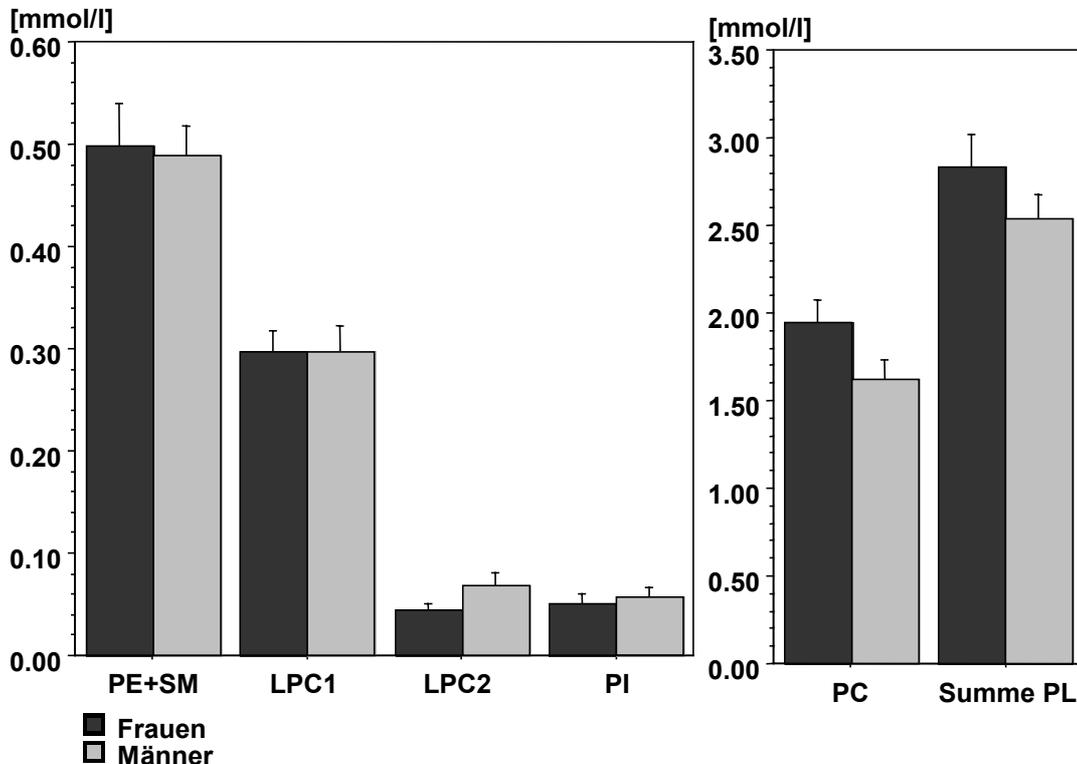


Abbildung 11 Mittelwerte der Konzentrationen an Phospholipiden im Blutplasma von gesunden älteren Frauen und Männern. Fehlerbalken = $\pm 0,5$ Standardabweichung.

Geschlechtsspezifische Untersuchung für jüngere Probanden

Bei einem Vergleich der Phospholipidkonzentrationen elf jüngerer Frauen (Durchschnitt 25 Jahre, Alter 23-29 Jahre) und neun jüngerer Männer (Durchschnitt 30 Jahre, Alter 20-37 Jahre) zeigen die Frauen signifikant höhere Phospholipidkonzentrationen für PE+SM, PI, PC und auch in der Summe der Phospholipide. Die Konzentrationen für LPC1, LPC2 und LPC1+2 dagegen sind bei beiden Gruppen nahezu gleich. Die Frauen zeigen in dieser Altersgruppe insgesamt kleinere Standardabweichungen für die Phospholipidkonzentrationen als die Männer. Die folgende Tabelle (Tabelle 6) zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte für den Vergleich der Phospholipidkonzentrationen jüngerer Männer mit denen jüngerer Frauen.

Tabelle 6 Mittelwerte, Standardabweichungen (Stabw) und p-Werte für junge Frauen und junge Männer. Mittelwerte und Standardabweichungen werden in mmol/l angegeben.

Phospholipide	Gesunde junge Frauen		Gesunde junge Männer		Differenz (%)	<i>p</i> -Werte
	<i>Mittelwert</i>	<i>Stabw</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Stabw</i>		
PE+SM	0,455	0,040	0,390	0,040	16.667^s	0,0019
LPC1	0,209	0,041	0,207	0,045	.966	0,9237
LPC2	0,028	0,009	0,028	0,009	.0 0	0,8781
LPC1+2	0,237	0,042	0,235	0,048	.851	0,9036
PI	0,055	0,015	0,038	0,017	44.737^s	0,0321
PC	1,846	0,246	1,447	0,357	27.574^s	0,0084
ΣPL	2,593	0,274	2,110	0,429	22.891^s	0,0067

s: signifikante Differenz ($p \leq 0,05$), zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben.

Die folgende Abbildung stellt die Unterschiede in der Konzentration der Phospholipide noch einmal graphisch dar.

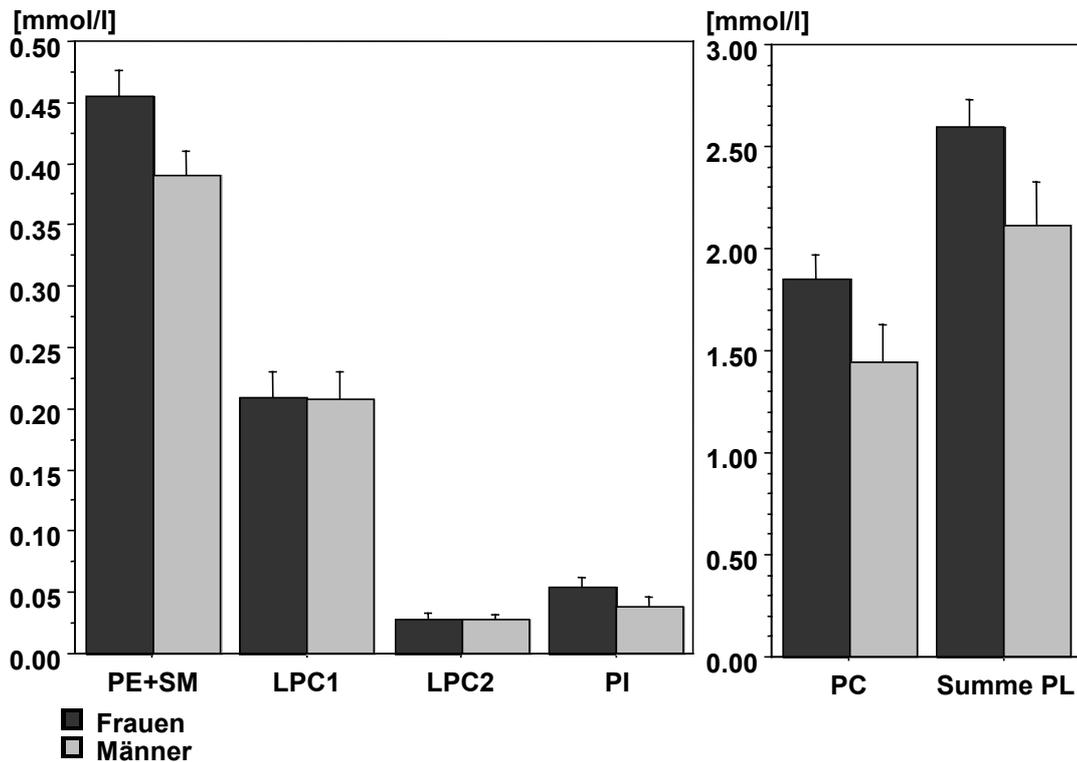


Abbildung 12 Mittelwerte der Konzentrationen an Phospholipiden im Blutplasma von gesunden jüngeren Frauen und Männern. Fehlerbalken = $\pm 0,5$ Standardabweichung.

Vergleicht man bei den jüngeren Frauen die Konzentrationen an Phospholipiden von Frauen, die Ovulationshemmer (Pille) benutzen mit den Werten von Frauen, die diese nicht benutzen, so zeigen die Frauen, welche die „Pille“ nehmen, im Mittel etwas höhere Phospholipidkonzentrationen. Die Abweichungen liegen allerdings im Rahmen der Meßgenauigkeit. Die Standardabweichungen für die Konzentrationen an Phospholipiden liegen bei dem Kollektiv der Frauen mit Pille etwas über denen der Frauen, die diese nicht benutzen.

Altersspezifische Untersuchung für weibliche Probanden

Bei einem Vergleich von jüngeren Frauen (\bar{x} 25 Jahre, 23-29 Jahre) mit älteren Frauen (\bar{x} 53 Jahre, 49-60 Jahre) zeigen die jüngeren Frauen niedrigere Konzentrationen an Phospholipiden für alle Phospholipidklassen, bis auf PI. Signifikant sind die niedrigeren Werte bei LPC1, LPC2, LPC1+2, PE+SM und der Summe der Phospholipide. Die

niedrigere Konzentrationen für PC ist allerdings nicht signifikant. Vergleicht man die Mittelwerte bei beiden Kollektiven, so weichen LPC1, LPC2 und LPC1+2 am stärksten voneinander ab (bei jüngeren Frauen 32-33 % niedrigere Mittelwerte). Bei den anderen Phospholipidklassen finden sich Abweichungen zwischen +6 % für PI, über -7 % für PC bis -11 % für PE+SM und die Summe der Phospholipide für die jüngeren Frauen. Die Standardabweichungen der Phospholipidkonzentrationen sind bei den jüngeren Frauen für alle Phospholipidklassen, außer bei PC, kleiner als bei den älteren Frauen. Bei diesem Vergleich wurden aus dem Kollektiv der älteren Frauen nur die ältesten Frauen ausgewählt (Altersdurchschnitt 53 Jahre, 49-60 Jahre) um einen Vergleich von Frauen vor und nach der Menopause zu ermöglichen. Die folgende Tabelle (Tabelle 7) zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte für den Vergleich der Phospholipidkonzentrationen jüngerer Frauen mit denen älterer Frauen.

Tabelle 7 Mittelwerte, Standardabweichungen (Stabw) und p-Werte für junge und ältere Frauen. Mittelwerte und Standardabweichungen werden in mmol/l angegeben.

Phospholipide	Gesunde jüngere Frauen		Gesunde ältere Frauen		Differenz (%)	p-Werte
	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw		
PE+SM	0,455	0,040	0,514	0,078	-11.479 ^s	0,0500
LPC1	0,209	0,041	0,310	0,043	-32.581 ^s	0,0001
LPC2	0,028	0,009	0,041	0,013	-31.707 ^s	0,0234
LPC1+2	0,237	0,042	0,351	0,044	-32.479 ^s	0,00005
PI	0,055	0,015	0,052	0,020	5.769	0,7361
PC	1,846	0,246	1,992	0,235	-7.329	0,2286
ΣPL	2,593	0,274	2,909	0,322	-10.863 ^s	0,0408

s: signifikante Differenz ($p \leq 0,05$), zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben.

Die folgende Abbildung stellt die Unterschiede in der Konzentration der Phospholipide noch einmal graphisch dar.

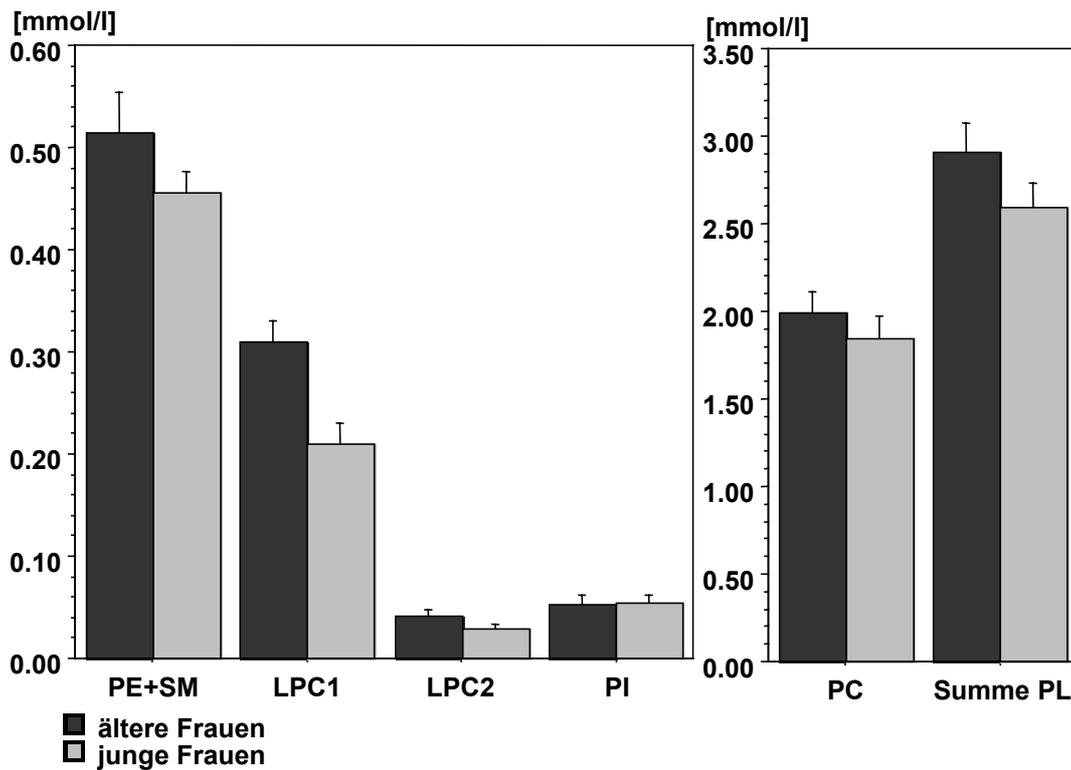


Abbildung 13 Mittelwerte der Konzentrationen an Phospholipiden im Blutplasma von gesunden älteren und jüngeren Frauen. Fehlerbalken = $\pm 0,5$ Standardabweichung.

Altersspezifische Untersuchung für männliche Probanden

Vergleicht man die Phospholipidkonzentrationen jüngerer Männer (\bar{x} 30 Jahre, Alter 20-37 Jahre) mit denen älterer Männer (\bar{x} 53 Jahre, 46-60 Jahre) so zeigen die jüngeren Männer, bis auf die Phospholipidklasse PC, signifikant niedrigere Phospholipidkonzentrationen als die älteren Männer. Die Unterschiede sind sehr signifikant (die p-Werte sind sehr niedrig). Vergleicht man die Mittelwerte der Konzentrationen an Phospholipiden aus beiden Kollektiven, so zeigen die jüngeren Männer niedrigere Mittelwerte, wobei die Abweichungen von -11% für PC über -17% für die Summe der Phospholipide und -20% für PE+SM bis hin zu -30% bei LPC1, -59% bei LPC2, -36% bei LPC1+2 und -33% bei PI reichen. Die Standardabweichungen der Phospholipidkonzentrationen sind in dem Kollektiv der jungen Männer für PE+SM, LPC1, LPC2, LPC1+2 und PI niedriger als bei den älteren Männer, für PC und die Summe der Phospholipide höher.

Die folgende Tabelle (Tabelle 8) zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte für den Vergleich der Phospholipidkonzentrationen jüngeren Männer mit denen älterer Männer.

Tabelle 8 Mittelwerte, Standardabweichungen (Stabw) und p-Werte für jüngere und ältere Männer. Mittelwerte und Standardabweichungen werden in mmol/l angegeben.

Phospholipide	Gesunde jüngere Männer		Gesunde ältere Männer		Differenz (%)	p-Werte
	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw		
PE+SM	0,390	0,040	0,489	0,056	-20.245^s	0,0007
LPC1	0,207	0,045	0,297	0,049	-30.303^s	0,0013
LPC2	0,028	0,009	0,068	0,024	-58.824^s	0,0003
LPC1+2	0,235	0,048	0,365	0,067	-35.616^s	0,0003
PI	0,038	0,017	0,057	0,019	-33.333^s	0,042
PC	1,447	0,357	1,621	0,219	-10.734	0,2499
ΣPL	2,110	0,429	2,532	0,289	-16.667^s	0,0326

s: signifikante Differenz ($p \leq 0,05$), zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben.

Die folgende Abbildung stellt die Unterschiede in der Konzentration der Phospholipide noch einmal graphisch dar.

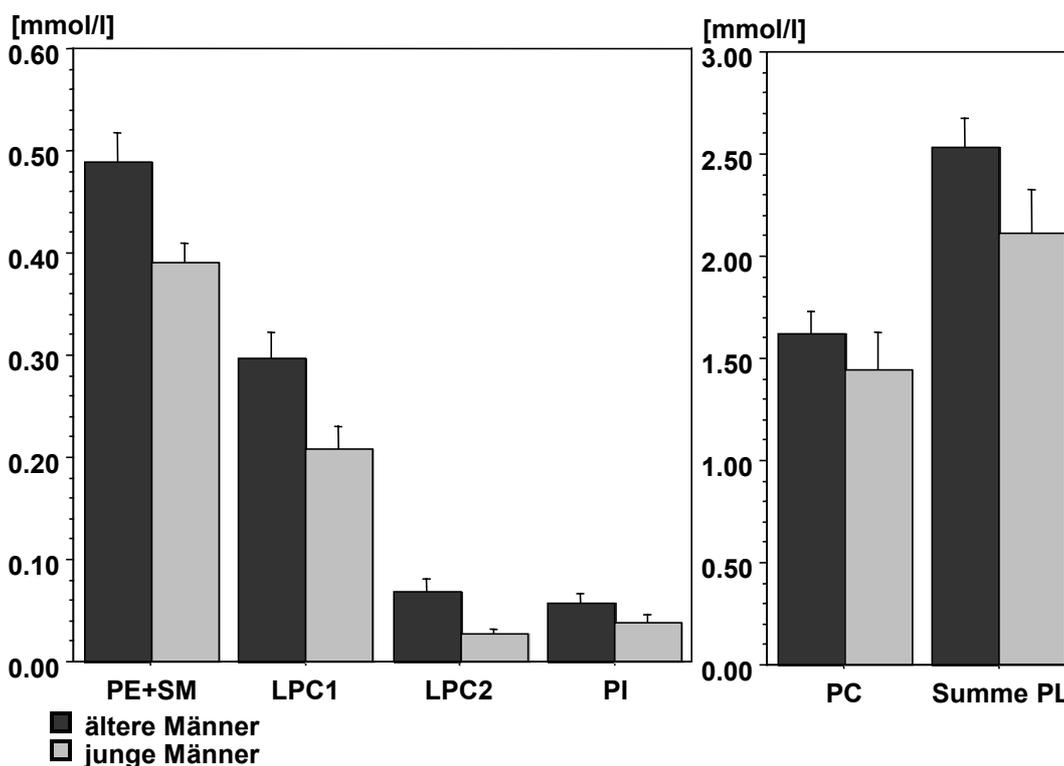


Abbildung 14 Mittelwerte der Konzentrationen an Phospholipiden im Blutplasma von gesunden älteren und jüngeren Männern. Fehlerbalken = $\pm 0,5$ Standardabweichung.

Demographischer Vergleich von Patienten- und Probandenkollektiven für die ^{31}P -NMR-spektroskopischen Messungen

Aufgrund der begrenzten Anzahl der zur Verfügung stehenden Probanden, vor allem solcher mit hohem Alter, konnte die vorliegende Auswahl der Probandenkollektive hinsichtlich Alters- und Geschlechtsverteilung nicht für alle Untersuchungen exakt an die vorgegebenen Patientenkollektive angepaßt werden. Der sich daraus ergebende mögliche Fehler kann jedoch weitgehend vernachlässigt werden, da die verbleibenden Altersunterschiede im Vergleich zu den im vorhergehenden Abschnitt für die ^{31}P -NMR-Spektroskopie beschriebenen nur gering sind. Zusätzlich werden soweit möglich in den Untersuchungen zu den einzelnen Karzinomarten alters- und geschlechtsspezifische Auswertungen vorgenommen.

Tabelle 9 Altersverteilung innerhalb der einzelnen Patientenkollektive

Untersuchungen zu	Patientenkollektiv		Probandenkollektiv	
	Altersverteilung, (Mittelwert) [Jahre]	Anzahl nach Geschlecht	Altersverteilung, (Mittelwert) [Jahre]	Anzahl/ Geschlecht
Nierenzellkarzinom	37-88 (62)	21m, 8w	38-60 (51)	8m, 11w
Ovarialkarzinom	30-72 (56)	9w	34-60 (47)	12w
Mammakarzinom	32-63 (47)	12w	34-60 (47)	12w
Dickdarmkarzinom	n.v.	3m, 3w	42-60 (51)	8m, 8w

n.v.: nicht verfügbar.

¹H-NMR-Spektroskopie

Für das Probandenkollektiv wurden acht gesunde Frauen (Durchschnittsalter 43 Jahre) und sieben gesunde Männer (Durchschnittsalter 37 Jahre) ausgewählt. Da die ³¹P-NMR-spektroskopischen Untersuchungen zeigen, daß ein altersgematchtes Probandenkollektiv unerlässlich für eine richtige Deutung der Ergebnisse ist, wurden hier nur ältere Probanden untersucht. Die geschlechtsspezifische ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung des Probandenkollektivs ergab folgende Ergebnisse:

Geschlechtsspezifische Untersuchung des Probandenkollektivs

Die Männer zeigen signifikant geringere Konzentrationen für die Fettsäurebestandteile, die den Lipoproteinen VLDL1+LDL1 und VLDL2+LDL2 (Peaks 3, 5) zuzuordnen sind, für Cholesterin in HDL (Peak 2), sowie für die Fettsäurebestandteile, die ungesättigten Fettsäuren zuzuordnen sind, wie -CH₂HC=CH- (Peak 10), -HC=CHCH₂HC=CH- (Peak 14) und -CH=CHCH₂CH=CH- bzw. =CHCH₂CH₂- (Peak 21) im Vergleich mit den Frauen (Zuordnungen, s. Kap. 2.2.4, S. 51). Auch die Konzentration an Glycerin als Ausgangs- und Abbauprodukt der Lipide und für die Glycerylgruppen der Lipide (Peaks 18, 19) sind bei den Männern signifikant niedriger als bei den Frauen. Die Abweichung zwischen den beiden Kollektiven sind für die Konzentration der Glycerylgruppen der Lipide am größten. Die Konzentrationen der anderen zu Fettsäuren gehörenden Gruppen sind nicht signifikant verändert, ebensowenig die Konzentrationen an Laktat, Glykoproteinen, Albumin, Cholin und Glukose und die der Aminosäuren Valin und Alanin. Bis auf Laktat und Alanin zeigten die Männer dort im Durchschnitt aber ebenfalls Konzentrationen, die unter den Werten für die Frauen liegen. Die Standardabweichungen sind im Durchschnitt in der Gruppe der Frauen (prozentual zur Konzentration der Substanzen gesehen) etwas größer als in der Gruppe der Männer. Eventuell läßt sich dies

mit dem hormonellen Status der Frauen (Frauen vor und nach der Menopause) erklären. Die folgende Tabelle zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen, Differenzen und p-Werte für den Vergleich der gesunden Frauen und Männer. Die Differenzen beziehen sich in diesem Fall auf den Vergleich Männer zu Frauen und zeigen bei niedrigeren Werten für die Männer negative Vorzeichen. Die folgende Abbildung zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der signifikant unterschiedlichen Substanzen beider Kollektive.

Tabelle 10 Mittelwerte, Standardabweichungen (Stabw) und p-Werte für gesunde Frauen und gesunde Männer. Mittelwerte und Standardabweichungen werden in mmol/l, bezogen auf die jeweilige CH_n-Gruppe, angegeben.

Peak	Zuordnung	F MW	Stabw	M MW	Stabw	Diff. %	p-Wert
2	<u>C18</u> (-CH ₃) von Cholesterin in HDL	0,0651	0,0264	0,0336	0,0088	- 48	0,010
3	LDL1 → <u>CH₃</u> (CH ₂) _n VLDL1 → <u>CH₃</u> CH ₂ CH ₂ HC= terminale CH ₃ -Gruppen von Fettsäuren	1,0075	0,1615	0,7622	0,1370	- 24	0,008
4	- <u>CH₃</u> , Valin	0,0083	0,0020	0,0080	0,0010	- 4	0,758
5	LDL2 → (<u>CH₂</u>) _n VLDL2 → - <u>CH₂</u> CH ₂ COOR	3,1574	0,7675	1,8528	0,5332	- 41	0,002
6	- <u>CH₃</u> , Laktat	0,1096	0,0302	0,1343	0,0561	22	0,300
7	- <u>CH₃</u> , Alanin	0,0125	0,0024	0,0162	0,0052	30	0,103
8	- <u>CH₂</u> CH ₂ COOR	0,6636	0,2528	0,5085	0,2308	- 23	0,239
9	- <u>CH₂</u> CH ₂ HC=CH-	0,0577	0,0183	0,0577	0,0079	0	0,999
10	- <u>CH₂</u> HC=CH-	0,8739	0,2694	0,6347	0,1194	- 27	0,050
11	-NHCO <u>CH₃</u> gehören beide zu Acetyl- signalen von α ₁ -aciden Glykoproteinen	0,0672	0,0227	0,0563	0,0087	- 16	0,252
12		0,0136	0,0057	0,0094	0,0040	- 31	0,121
13	- <u>CH₂</u> COOR	0,2128	0,0884	0,1915	0,0560	- 10	0,593
14	-HC=CH <u>CH₂</u> HC=CH-	0,2856	0,0628	0,1223	0,0317	- 57	3x10⁻⁵
15	ε- <u>CH₂</u> -, Albumin und Lysin	0,1590	0,0608	0,1494	0,0587	- 6	0,761
16	-N ⁺ (<u>CH₃</u>) ₃ Gruppen verschiedener cholinhaltiger Moleküle in Lipo- proteinen	0,0885	0,0187	0,0771	0,0185	- 13	0,261
17	H ₂ , β-Glukose	0,2087	0,0482	0,1718	0,0307	- 18	0,106
18	- <u>CH₂</u> , (freies) Glycerin	0,0475	0,0104	0,0333	0,0108	- 30	0,039
19	= <u>CH</u> COOR, Glycerolgruppen von Lipiden	0,0479	0,0219	0,0020	0,0013	- 96	0,038
20	anomeres H1, α-Glukose	0,0764	0,0170	0,0585	0,0165	- 23	0,060
21	CH-Gruppen ungesättigter Fettsäuren in Lipiden, -CH= <u>CH</u> CH ₂ CH=CH- und = <u>CH</u> CH ₂ CH ₂ -	1,0624	0,2600	0,6655	0,1507	- 37	0,004

nicht gesondert beschriftete Gruppen gehören zu Bestandteilen von Fettsäuren aus Lipiden, signifikante Unterschiede zur Vergleichsgruppe (p<0,05) werden zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben, F MW = Mittelwert für die Frauen, M MW = Mittelwert für die Männer, Stabw = Standardabweichung, Diff. = Differenz der Mittelwerte.

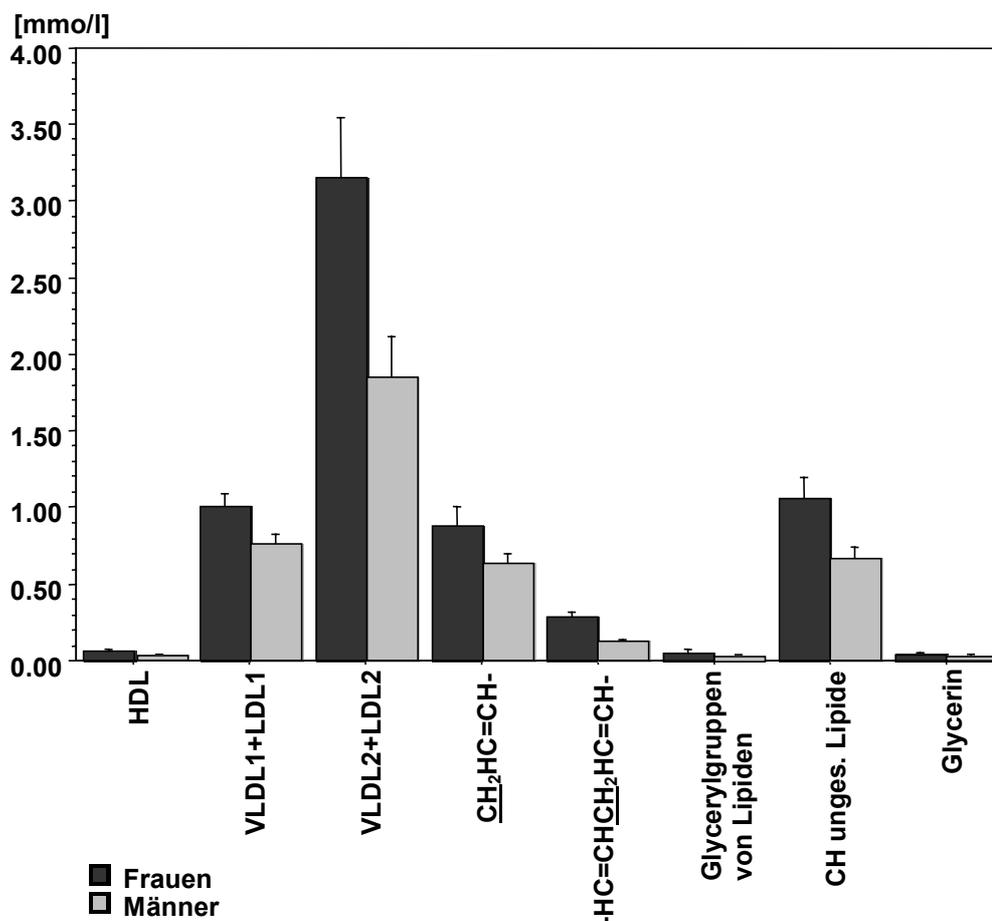


Abbildung 15 Mittelwerte der Konzentrationen an Lipidbestandteilen im Blutplasma von gesunden älteren Frauen und Männern. Fehlerbalken = $\pm 0,5$ Standardabweichung.

2.3 Ergebnisse der ³¹P-NMR-spektroskopischen Untersuchungen

2.3.1 Zum Nierenzellkarzinom

Für die ³¹P-NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurde präoperativ gewonnenes Blutplasma von 21 männlichen und 8 weiblichen Patienten mit Nierenzellkarzinom verwendet (s. 2.2.5.2, S.56). Das Durchschnittsalter der Patienten betrug 62 Jahre (37-88 Jahre). Die gesunde Vergleichsgruppe bestand aus 8 männlichen und 11 weiblichen Probanden, mit einem Durchschnittsalter von 51 Jahren (38-60 Jahre). Neben diesen Ausgangs- wurden zusätzlich Vergleichsuntersuchungen durchgeführt.

Blutplasma von 8 (5m, 3w) Patienten mit Nierenzellkarzinom wurde sechs Monate nach Nephrektomie ein zweitesmal untersucht. Untersuchungen im Rahmen der klinischen Nachsorge zeigten, daß sich die Patienten dieses Kollektives zu diesem Zeitpunkt in Remission befanden, d.h. keine Tumoren nachweisbar waren. Der bei dieser Krebsart geringen Überlebensrate entsprechend, konnten Plasmaproben der anderen Patienten mit Nierenzellkarzinom nicht mehr gewonnen werden, da die Patienten zwischenzeitlich verstorben waren. Für einen Vergleich der Ergebnisse für Patienten mit Nierenzellkarzinom mit denen von Patienten mit anderen Tumoren in der Niere wurde zusätzlich Blutplasma einer Patientin mit einem Urothelkarzinom im Nierenbecken, einer Patientin mit einem Bronchialkarzinom, mit Metastasen in der Niere und einer Patientin mit einem gutartigen Nierentumor vermessen und ausgewertet.

Gesamtvergleich

Die Mittelwerte und Standardabweichungen für die ermittelten Konzentrationen der Phospholipide der einzelnen Gruppen sind in den folgenden Tabellen (Tabelle 11, Tabelle 12) zusammengefaßt.

Tabelle 11 Für die verschiedenen Phospholipidklassen ermittelte Konzentrationen in mmol/l. Angegeben werden für die Frauen, in Abhängigkeit vom Kollektiv, Mittelwerte und Standardabweichungen, ermittelt aus den ³¹P-NMR-Spektren des Blutplasmas.

Kollektiv	PE+SM	LPC1	LPC2	PI	PC	ΣPL
Patienten mit NC (Frauen)	0,470 ±0,123	0,195^s ±0,056	0,037^s ±0,012	0,053 ±0,017	1,409^s ±0,268	2,164^s ±0,519
gesunde Probanden (Frauen)	0,498 ±0,083	0,296 ±0,044	0,044 ±0,014	0,052 ±0,018	1,947 ±0,259	2,837 ±0,364
Patientin mit Urothelkarzinom im Nierenbecken	0,405	0,170	0,047	0,059	1,369	2,050
Patientin mit Bronchialkarzinom (Metastasen in der Niere)	0,495	0,132	0,029	0,060	1,340	2,056
Patientin mit gutartigem Nieren- tumor	0,767	0,372	0,047	0,058	2,089	3,333

Abkürzungen: NC = Nierenzellkarzinom, ΣPL = Summe aller Phospholipide, s = signifikanter Unterschied zur Vergleichsgruppe (p<0,05), zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben.

Tabelle 12 Mittelwerte, Standardabweichungen (Stabw) und p-Werte für männliche Patienten mit Nierenzellkarzinom und gesunde Probanden. Mittelwerte und Standardabweichungen werden in mmol/l angegeben.

Phospholipide	Patienten mit NC (Männer)		Gesunde Probanden		Differenz (%)	p-Werte
	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw		
PE+SM	0,459	0,058	0,489	0,056	- 6	0,2232
LPC1	0,217	0,052	0,297	0,049	- 27 ^s	0,0031
LPC2	0,036	0,012	0,068	0,024	- 47 ^s	0,0002
PI	0,045	0,014	0,057	0,019	- 21	0,0618
PC	1,458	0,269	1,621	0,219	- 10	0,1384
ΣPL	2,215	0,331	2,532	0,289	- 13 ^s	0,0242

Abkürzungen: NC = Nierenzellkarzinom, ΣPL = Summe aller Phospholipide, s = signifikanter Unterschied zur Vergleichsgruppe ($p < 0,05$), zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben.

Im Vergleich der Konzentrationen der Phospholipide für Patienten mit Nierenzellkarzinom mit denen gesunder Probanden, zeigen sich für einige Phospholipidklassen signifikante Unterschiede. Die obigen Tabellen (Tabelle 11, Tabelle 12) und die folgende Abbildung (Abbildung 16) sollen dies verdeutlichen.

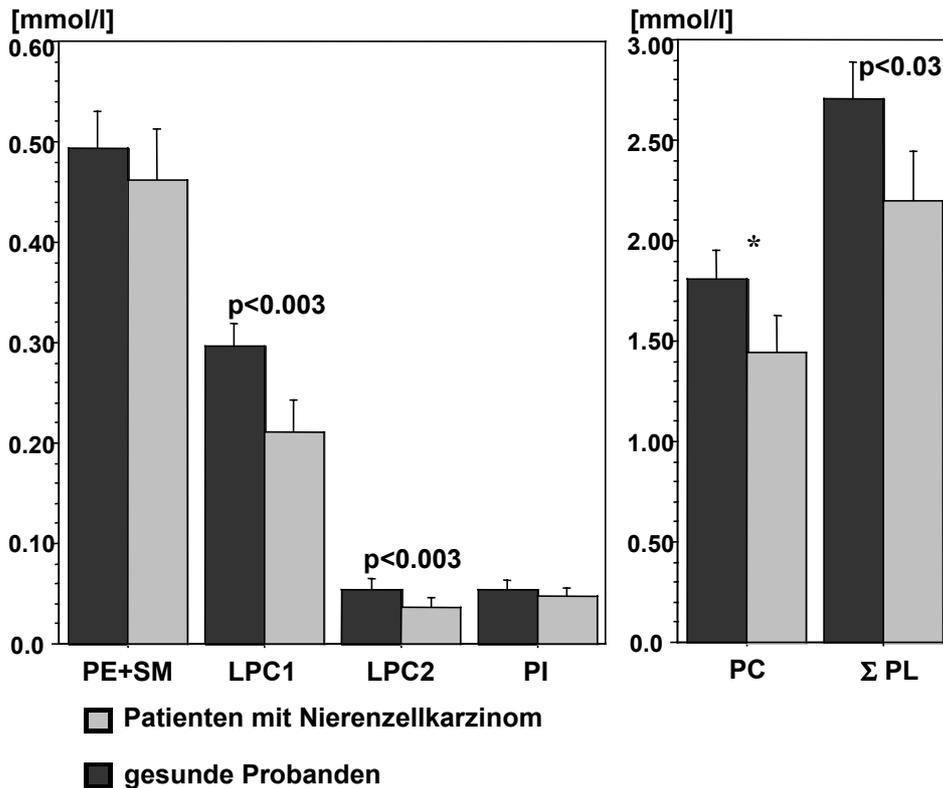


Abbildung 16 Mittelwerte der Konzentrationen an Phospholipiden im Blutplasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom und gesunden Probanden (Männer und Frauen). Fehlerbalken = $\pm 0,5$ Standardabweichung, p-Werte werden nur bei Signifikanz angegeben, * = nur bei Frauen signifikant ($p < 0,02$).

Die Konzentrationen an LPC1 und LPC2 liegen im Blutplasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom signifikant niedriger als im Plasma gesunder Probanden. Frauen mit Nierenzellkarzinomen zeigen zusätzlich noch eine signifikante Erniedrigung bei Phosphatidylcholin (PC). Für die anderen Phospholipidklassen lassen sich keine signifikanten Abweichungen zwischen Patienten und Probanden nachweisen, die Gesamtkonzentration an Phospholipiden (ΣPL) liegt bei den Patienten jedoch signifikant niedriger als bei den Probanden. Die Werte der Standardabweichungen der einzelnen Phospholipidklassen sind bei den Kranken insgesamt höher als bei den Gesunden, ein Grund dafür könnte sich aus den unterschiedlichen Tumorstadien ableiten lassen, über die hier gemittelt wurde. Eine Stratifikation nach Geschlecht ergibt zwar keinen signifikanten Unterschiede für die mittleren Konzentrationen, jedoch ist die Standardabweichung der Konzentrationen für die Gruppe der Frauen mit Nierenzellkarzinom, ebenso wie für gesunde Frauen, etwas größer als die der jeweiligen Vergleichsgruppe der Männer. Dieser Umstand könnte durch die durchgeführte Mittelung über Werte von prä- und

postmenopausalen Frauen sowie von Frauen in unterschiedlich Zyklusstadien verursacht sein.

Vergleich LPC/PC

Da die Konzentration an PC in direktem Zusammenhang mit der Konzentration an LPC steht (s. Anhang S. 169) ist es bei der hier ermittelten signifikanten Erniedrigung der Konzentrationen an LPC1+2 für Patienten mit Nierenzellkarzinom wichtig, den Quotienten aus beiden Werten zu vergleichen. Sowohl bei den Frauen als auch bei den Männern hat der Quotient LPC1+2/PC, wie erwartet, bei den Kranken im Mittel einen niedrigeren Wert als bei den Gesunden. Diese Erniedrigung ist bei Männern mit Nierenzellkarzinom signifikant, bei den Frauen mit Nierenzellkarzinom nicht. Für Frauen mit Nierenzellkarzinom liegt die Konzentration an PC allerdings auch signifikant unter der Konzentration gesunder Probandinnen.

Einfluß des Tumorstadiums auf die Phospholipidwerte

Die unterschiedlich großen Standardabweichungen zwischen Patienten und Probanden geben schon einen ersten Hinweis darauf, daß weitere Faktoren eine Rolle spielen. Die Rohdaten wurden daher weiteren Analysen unterzogen. Es wurden Auswertungen nach Tumorgröße, Zelldifferenzierung, Metastasierung durchgeführt und jeweils geschlechtsspezifisch betrachtet.

Für eine Beurteilung des Einflusses der Größe der Tumore auf die Phospholipidkonzentrationen werden Patienten mit verschieden großen Tumoren miteinander verglichen. Die Patienten dürfen zusätzlich keine Fernmetastasen aufweisen, da diese die Konzentrationen an Phospholipiden beeinflussen und so das Ergebnis verfälschen würden. Um den Einfluß von Metastasen auf die Konzentration an Phospholipiden zu beurteilen, werden die Patienten mit Tumoren des gleichen Tumorstadiums, aber mit zusätzlich vorhandenen Metastasen und ohne zusätzliche Metastasen verglichen.

Eine Unterteilung der Tumore erfolgt meist nach der sogenannten TNM-Klassifikation. Dabei steht T für Tumor, bzw. für die Ausdehnung des Primärtumors, N (Nodus) für das Fehlen bzw. Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen und M (Metastase) für das Vorhandensein von Fernmetastasen. Durch Hinzufügen von Zahlen

wird die anatomische Ausdehnung des malignen Prozesses angegeben. Für Patienten mit Nierenzellkarzinom gilt folgende TNM-Klassifikation (gekürzt)²⁰:

T1 kleiner Tumor ohne Vergrößerung der Niere

T2 großer Tumor mit Vergrößerung der Niere, Nierenkapsel nicht durchbrochen

T3 Infiltration in Gewebe außerhalb der Niere

T4 Infiltration in benachbarte Organe

M0/M1 M0 = keine Fernmetastasen, M1 = Fernmetastasen vorhanden

N0/N1* N0 = kein Befall eines Lymphknotens, N1 = Befall eines einzelnen Lymphknotens

*N0/N1 werden hier nicht betrachtet.

Als weitere Möglichkeit zur Einteilung der Tumore wird das sogenannte Grading verwendet. Es beschreibt den Differenzierungs- und Malignitätsgrad von malignen Tumoren. Dabei bedeutet Grad 1 (G1) hochdifferenziertes Gewebe geringer Malignität, Grad 2 (G2) mitteldifferenziertes Gewebe mäßiger Malignität und Grad 3 (G3) niedrig differenziertes Gewebe hoher Malignität²⁰.

Untersucht man bei den Frauen mit Nierenzellkarzinom die Abhängigkeit der Phospholipidkonzentrationen vom Tumorstadium, und vergleicht Patienten mit Tumoren der Klassifikation T4 bzw. T3-4 mit Patienten mit Tumoren der Klassifikation T2, so zeigen die Patienten mit den größeren Tumoren sehr viel niedrigere Phospholipidwerte als die Patienten mit den kleineren Tumoren. Die größte Differenz zwischen beiden Gruppen zeigt sich bei LPC1, LPC2, LPC1+2 und PC. Bei zwei Patientinnen mit einem Tumor der gleichen Tumorklassifikation, von denen die eine Patientin Metastasen aufweist, die andere aber nicht, zeigt die Patientin mit Metastasen niedrigere Phospholipidwerte als die Patientin ohne Metastasen. Die größte Differenz findet sich hier bei PC. Die Differenzen der verschiedenen Phospholipidklassen in diesem Kollektiv sind nicht so groß, wie die in Abhängigkeit vom Tumorstadium (der Tumorklassifikation) ermittelten.

Bei Männern zeigt sich ein ähnliches Bild. Auch hier liegen die Phospholipidkonzentrationen der Patienten mit den größeren Tumoren niedriger als bei

den Patienten mit kleineren Tumoren (beide Gruppen ohne Metastasen). Die größte Abweichung findet sich hier bei LPC1, LPC2 und LPC1+2. Auch schon für die Patienten mit Tumoren in dem relativ frühen Stadium T2 sind die Werte signifikant niedriger als der Mittelwert der gesunden Probanden. Bei Patienten mit Tumoren des gleichen Tumorstadiums zeigen die Patienten, die Metastasen aufweisen, niedrigere Phospholipidwerte als Patienten ohne Metastasen. Die stärkste Abweichung besteht auch hier bei LPC1, LPC2 und LPC1+2. Die Abnahme der Phospholipidwerte bei Patienten mit Metastasen ist bei Patienten mit Tumoren des Tumorstadiums T2 weniger ausgeprägt als bei Patienten mit Tumoren des Tumorstadiums T3. Die bisher beschriebenen Ergebnisse für die Abhängigkeit der Konzentration an LPC1+2 von der Tumorgröße und dem Vorhandensein von Metastasen sollen in der folgenden Abbildung (Abbildung 17) noch einmal graphisch dargestellt werden. Die Abbildung zeigt die Konzentrationen an LPC1+2 bei Männern und Frauen mit Nierenzellkarzinom. Zusätzlich sind noch die Werte für Patienten in Remission und für gesunde Probanden angegeben.

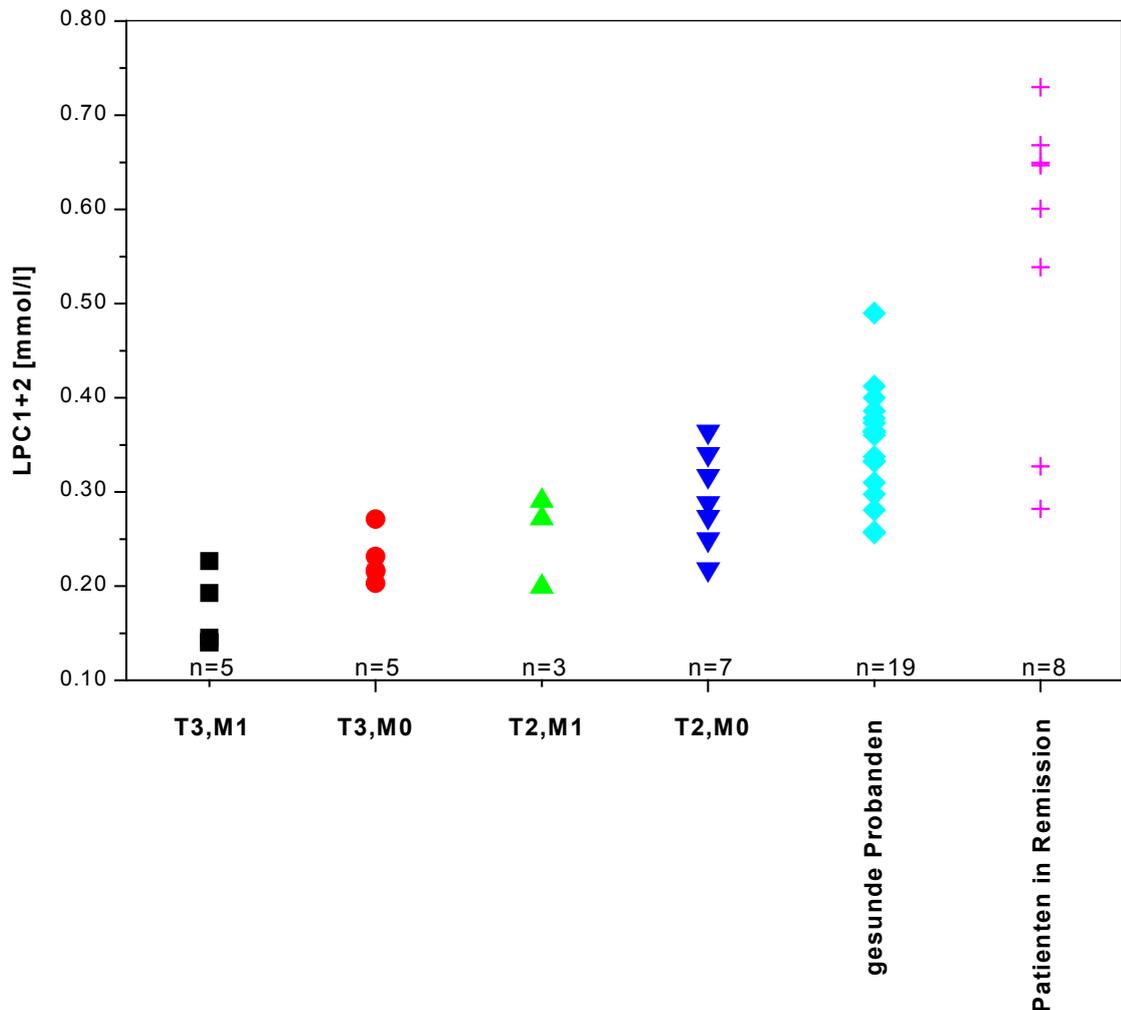


Abbildung 17 Konzentrationen an LPC1+2 bei Patienten mit Tumoren des Tumorstadiums T2 und T3 (Tumorklassifikation s. vorher in diesem Abschnitt) mit und ohne Metastasen sowie bei gesunden Probanden und Patienten in Remission.

Auch der Differenzierungs- und Malignitätsgrad (Grading) des Tumors scheint mit den Phospholipidkonzentrationen zu korrelieren (Einteilung s. vorher). Bei Patienten mit Tumoren des gleichen Tumorstadiums zeigen die Patienten mit dem höher eingestuftem Tumor niedrigere Phospholipidkonzentrationen, hauptsächlich für LPC1+2, als Patienten mit einem Tumor, eingestuft mit einem niedrigeren Grading.

Einfluß des Tumorstadiums auf die Konzentration des anorganischen Phosphats

Die Werte für das anorganische Phosphat lassen sich ebenfalls aus den Phosphorspektren ermitteln. Die Werte für das Pi liegen bei den Männern mit Nierenzellkarzinom etwas

über denen der gesunden Probanden, bei Frauen ist es umgekehrt. Bei Frauen zeigt sich bei einem Vergleich der Pi-Werte in Abhängigkeit vom Tumorstadium, daß die Patienten mit Tumoren eines höheren Tumorstadiums niedrigere Pi-Werte aufweisen. Bei einem Vergleich von Patienten mit Tumoren des gleichen Tumorstadiums zeigen Patienten mit Metastasen niedrigere Pi-Werte als Patienten ohne Metastasen. Bei Männern ergibt sich ein anderes Bild. Hier weisen die Patienten mit Tumoren eines höheren Tumorstadiums höhere Werte an Pi auf als Patienten mit kleineren Tumoren. Patienten mit Metastasen zeigen höhere Werte als Patienten ohne Metastasen, wenn ihre Tumore das gleiche Tumorstadium aufweisen.

Patienten in Remission

Um herauszufinden, ob sich die Veränderungen der Konzentration an Phospholipiden bei Patienten mit Nierenzellkarzinom zurückbilden, wenn eine Remission der Krankheit eintritt, werden die Phospholipidkonzentrationen von Patienten in Remission (sechs Monate nach Nephrektomie) mit ihren Werten vor der Operation verglichen. Es zeigt sich ein Anstieg der Phospholipidkonzentrationen aller Phospholipidklassen wenn die Patienten in Remission sind. Wie die folgende Abbildung zeigt (Abbildung 18), ist der höchste Anstieg bei LPC1+2 zu finden.

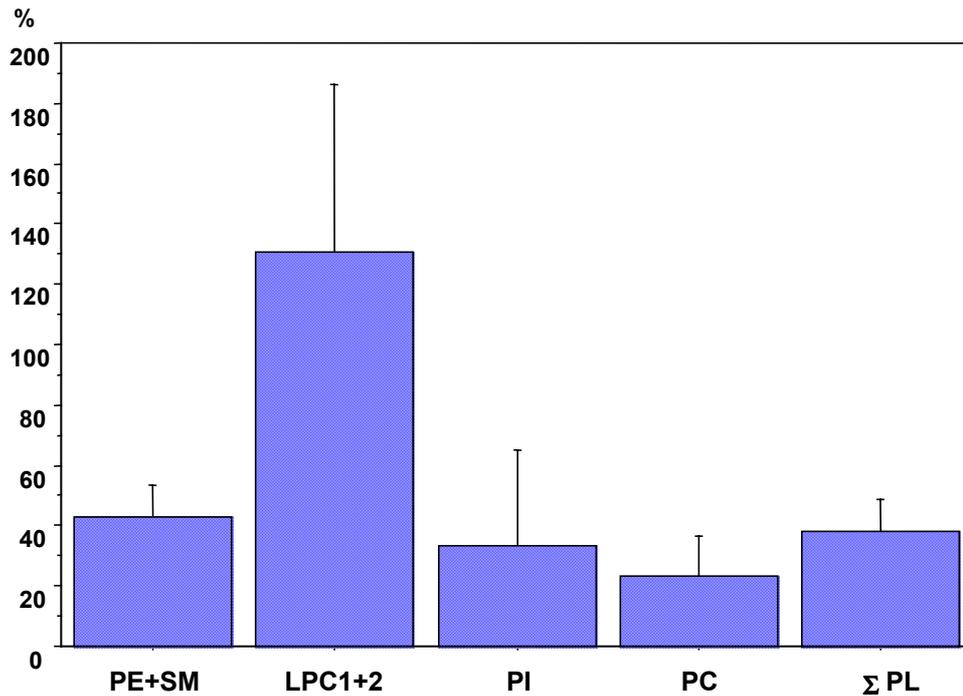


Abbildung 18 Prozentualer Anstieg (Mittelwerte) der Phospholipidkonzentrationen bei Patienten in Remission im Vergleich mit ihren Werten vor der Nephrektomie (Fehlerbalken = $\pm 0,5$ Standardabweichung).

Die prozentuale Erhöhung der Phospholipidkonzentrationen bewegt sich dabei im Mittel zwischen +23 % für PC und +131 % für LPC1+2. Die folgende Grafik zeigt die Unterschiede in den Phospholipidkonzentrationen eines Patienten mit Nierenzellkarzinom vor und nach der Nephrektomie (Abbildung 19).

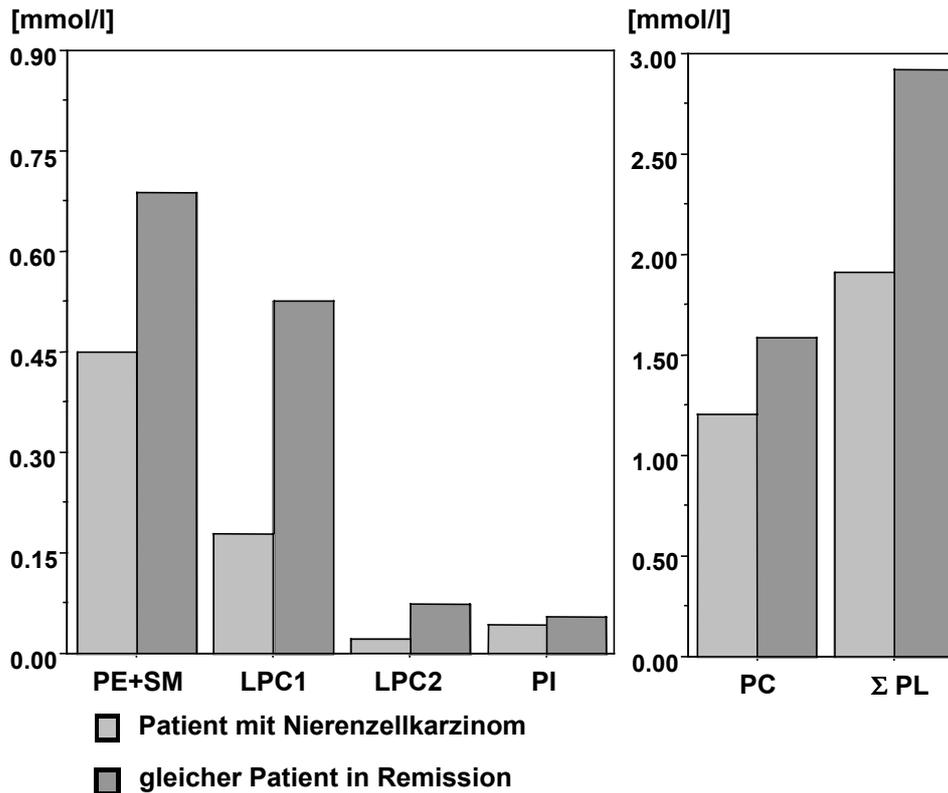


Abbildung 19 Konzentrationen der Phospholipide eines Patienten mit Nierenzellkarzinom und des gleichen Patienten in Remission.

Beide Abbildungen (Abbildung 18 und Abbildung 19) zeigen den starken Anstieg der Phospholipidkonzentrationen für Patienten in Remission. Die Phospholipidkonzentrationen dieses Kollektivs liegen über den Mittelwerten für gesunde Probanden und der Anstieg für LPC1+2 ist beträchtlich. Bis auf eine Frau hatte keiner der hier in Remission untersuchten Patienten Metastasen vor der Operation. Diese Frau zeigte nach der Operation und einer anschließend durchgeführten Chemotherapie als Patientin in Remission den geringsten Anstieg für LPC1+2 aller Patienten in Remission. Für die anderen Phospholipidklassen ließen sich bei ihr ebenfalls höhere Konzentrationen im Vergleich zu den Werten vor der Operation nachweisen, nur bei PC zeigte sich keine Veränderung.

Geschlechtsspezifische Unterschiede der Phospholipidkonzentrationen

Um geschlechtsspezifische Unterschiede in den Konzentrationen der Phospholipide von Patienten mit Nierenzellkarzinom auszumachen, werden die Phospholipidwerte von Frauen mit Nierenzellkarzinom mit denen von Männern mit Nierenzellkarzinom verglichen. Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede in den Phospholipidkonzentrationen beider Gruppen feststellen. Allerdings liegt der Mittelwert für LPC1+2, PC und die Summe aller Phospholipide bei den Frauen unter den

entsprechenden Mittelwerten für die Männer. Die Mittelwerte für PE+SM und PI liegen bei den Frauen etwas über den Mittelwerten der Männer. Es handelt sich bei diesen Abweichungen aber um kleine Unterschiede, ausgenommen LPC1+2 (-8,7 % für Frauen) und PI (+20 % für Frauen).

Altersspezifische Unterschiede

Über den Einfluß des Alters bei Patienten mit Nierenzellkarzinom Aussagen zu machen ist schwierig, denn sowohl bei den Männern, wie bei den Frauen gibt es nur einen jüngeren Patienten. Die Phospholipidwerte des jüngeren Mannes (37 Jahre) liegen, bis auf LPC1+2, etwas unter dem Mittelwert der Patienten, welche Tumore des gleichen Tumorstadiums aufweisen (T3, M1). Für die jüngere Frau (46 Jahre) ergibt sich das gleiche Bild. In ihrer Vergleichsgruppe befindet sich aber nur eine weitere Frau (Tumorstadium T2, M1). Die jüngere zeigt gegenüber der älteren Patientin zusätzlich noch etwas höhere Werte an PE+SM. Bei einer paarweisen Gegenüberstellung dieser beiden jüngeren Patienten zu Gesunden gleichen Alters zeigen diese beiden Patienten Abweichungen in den Phospholipidkonzentrationen, wie sie auch für das Gesamtkollektiv der Patienten beobachtet werden können.

Abgrenzung zu anderen Tumoren der Niere

Für eine Abgrenzung der Veränderungen der Phospholipidkonzentrationen bei Patienten mit Nierenzellkarzinom zu Patienten mit anderen Tumoren in der Niere werden die Phospholipidkonzentrationen einer Patientin mit Urothelkarzinom im Nierenbecken, einer Patientin mit einem Bronchialkarzinom, mit Metastasen in der Niere und einer Patientin mit einem gutartigen Nierentumor ermittelt und mit denen der Patientinnen mit Nierenzellkarzinom verglichen. Obwohl es sich hierbei noch um Untersuchungen an Einzelfällen handelt und daher von Signifikanz nicht gesprochen werden kann, konnten deutliche Unterschiede aber auch Gemeinsamkeiten in den Konzentrationen der Phospholipide aufgezeigt werden.

Die Patientin mit dem gutartigen Tumor zeigt sehr viel höhere Phospholipidkonzentrationen als das Mittel der Patientinnen mit Nierenzellkarzinom. Die größte Abweichung läßt sich bei LPC1+2 finden. Die Phospholipidwerte dieser Patientin liegen sogar über dem Mittelwert der gesunden Probandinnen, wobei der größte Unterschied in der Phospholipidklasse PE+SM zu finden ist. Auch der Wert für das

anorganische Phosphat liegt bei dieser Patientin über dem Wert der Gesunden und dem Mittelwert für die Patientinnen mit Nierenzellkarzinom.

Die Patientin mit dem in die Niere metastasierenden Bronchialkarzinom und die Patientin mit dem Urothelkarzinom im Nierenbecken zeigen im Vergleich mit den Mittelwerten gesunder Probanden niedrigere Konzentrationen für alle Phospholipidklassen, außer PI. Die größten Unterschiede lassen sich bei LPC1, LPC1+2, PC und der Summe der Phospholipide finden. Sie zeigen somit ein ähnliches Phospholipidmuster wie weibliche Patienten mit Nierenzellkarzinom auch. Für die Patientin mit dem Urothelkarzinom im Nierenbecken konnte auch eine Bestimmung der Phospholipidkonzentrationen in Remission durchgeführt werden. Die Patientin zeigt im Vergleich mit ihren Werten vor der Operation einen Anstieg der Phospholipidwerte für PE+SM, LPC1, LPC1+2, PC und der Summe der Phospholipide. Die größten Anstiege finden sich bei dieser Patientin aber, im Gegensatz zu Patientinnen mit Nierenzellkarzinom in Remission, bei PC und der Summe der Phospholipide. Für die Phospholipidklassen LPC2 und PI läßt sich in Remission kein Anstieg feststellen, die Konzentrationen sind in Remission sogar niedriger als in der akuten Krankheitsphase.

2.3.2 Zum Dickdarmkarzinom

Bei diesem Patientenkollektiv wurde Blutplasma von 6 Patienten (3 Frauen, 3 Männer) mit Dickdarmkarzinom ^{31}P -NMR-spektroskopisch vermessen, ausgewertet und die Konzentrationen an Phospholipiden mit denen 16 gesunder Probanden (8 Frauen, 8 Männer) verglichen.

Gesamtvergleich

Da aufgrund der geringen Zahl an Patienten eine nach Männern und Frauen getrennte Auswertung nicht statistisch sinnvoll durchgeführt werden konnte, wurde auch das Probandenkollektiv zu gleichen Teilen aus Männern und Frauen zusammengestellt, um eine geschlechtsspezifische Beeinflussung der Ergebnisse zu vermeiden. Patienten mit Dickdarmkarzinom zeigen signifikant niedrigere Konzentrationen an PC und insgesamt signifikant niedrigere Konzentrationen an Phospholipiden im Vergleich mit gesunden Probanden. Für PI und PE+SM liegen die Mittelwerte bei Kranken und Gesunden im gleichen Konzentrationsbereich. Für LPC1 und LPC1+2 findet man eine Erhöhung von 23 % bzw. 17 % des Mittelwertes der Kranken gegenüber dem Mittelwert der Gesunden.

Diese Veränderungen sind jedoch nicht signifikant. Auch der Wert an Pi ist bei den Kranken im Mittel etwas höher als bei den Gesunden. Die Standardabweichungen der Phospholipidkonzentrationen sind für die Kranken größer als für die Gesunden, was sich besonders bei LPC2, LPC1+2, sowie PE+SM zeigt. In der folgenden Tabelle (Tabelle 13) werden die Mittelwerte und Standardabweichungen der Phospholipidkonzentrationen für Patienten mit Dickdarmkarzinom und gesunde Probanden angegeben. Zusätzlich werden noch die p-Werte für den Vergleich Krank/Gesund aufgeführt.

Tabelle 13 Mittelwerte, Standardabweichungen (Stabw) und p-Werte für Patienten mit Dickdarmkarzinom und gesunde Probanden. Mittelwerte und Standardabweichungen werden in mmol/l angegeben.

Phospholipide	Dickdarmkarzinom		Gesund		Differenz (%)	p-Werte
	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw		
PE+SM	0,492	0,141	0,489	0,066	.613	0,9487
LPC1	0,356	0,146	0,290	0,045	22.759	0,1169
LPC2	0,052	0,025	0,057	0,023	-8.772	0,6671
LPC1+2	0,407	0,169	0,347	0,061	17.291	0,2192
PI	0,053	0,019	0,053	0,019	.0 0	0,9702
PC	1,343	0,287	1,761	0,261	-23.737^s	0,0039
ΣPL	2,296	0,381	2,650	0,325	-13.358^s	0,0415

s: signifikante Differenz ($p \leq 0,05$), zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben.

Die im Text und in der Tabelle dargestellten Ergebnisse des Vergleichs zwischen Patienten mit Dickdarmkarzinom und gesunden Probanden sollen in der folgenden Abbildung noch einmal graphisch dargestellt werden.

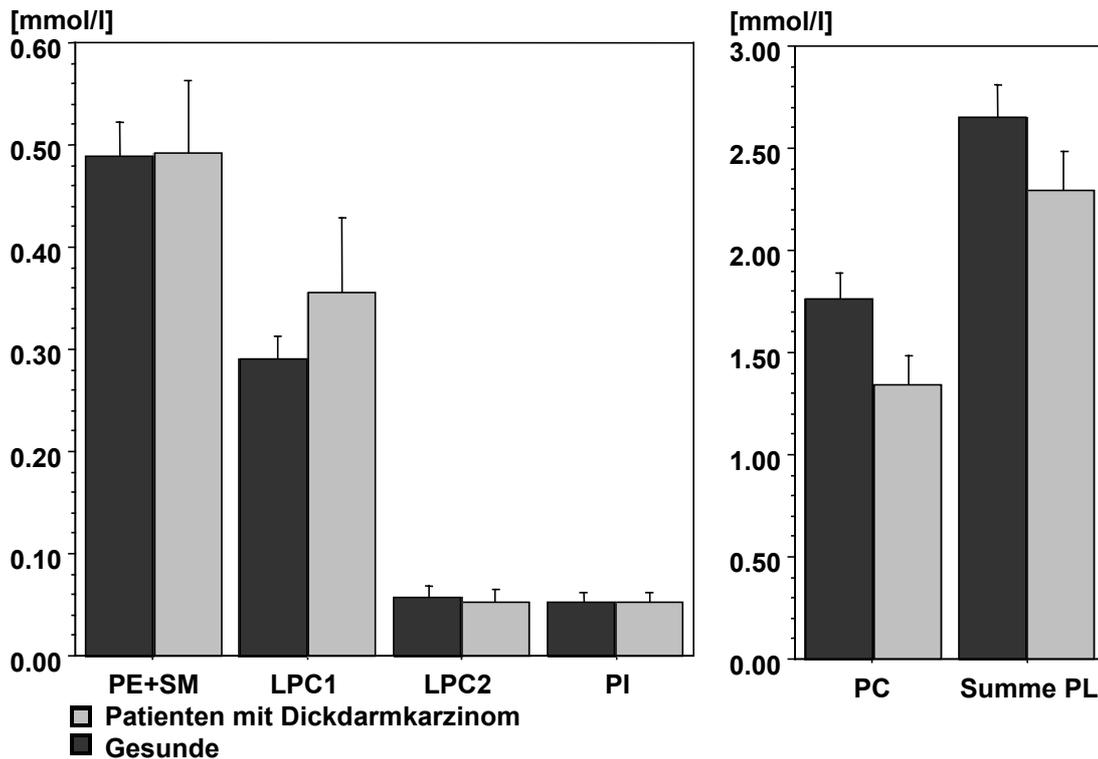


Abbildung 20 Mittelwerte der Konzentrationen an Phospholipiden im Blutplasma von Patienten mit Dickdarmkarzinom und gesunden Probanden (Männer und Frauen). Fehlerbalken = $\pm 0,5$ Standardabweichung.

Spezifische Betrachtungen

Eine Unterteilung in Männer und Frauen ist, wie erwähnt, aufgrund der geringen Patientenzahl statistisch nicht sinnvoll. Zu den Tumorstadien der Patienten können bisher, ebenso wie zum Alter der Patienten, keine Angaben gemacht werden.

Wie schon beim Nierenzellkarzinom beschrieben, werden für das Patientenkollektiv auffallend große Standardabweichungen einzelner Phospholipidkonzentrationen beobachtet. Bei einer genaueren Betrachtung der Einzelwerte des Patientenkollektivs, läßt sich dieses in zwei Gruppen aufteilen. Die eine Gruppe (3 Personen, 2m, 1w) zeigt höhere Konzentrationen für PE+SM, LPC1, LPC2, LPC1+2 und PI aber niedrigere Konzentrationen für PC und die Summe der Phospholipide im Vergleich mit den Mittelwerten der gesunden Probanden. Der Unterschied der Konzentrationen für LPC1, LPC2 und der Summe der beiden beträgt im Vergleich mit der zweiten Gruppe über

100 %. Die zweite Gruppe (3 Personen, 1m, 2w) zeigt niedrigere Phospholipidkonzentrationen für alle Phospholipidklassen im Vergleich mit gesunden Probanden. Die Größenordnung der Erniedrigung der Konzentrationen an PC und der Summe der Phospholipide liegt bei 20 %, für PI bei 30 %, für LPC1+2 bei 23 %, für LPC2 bei 42 %, für LPC1 bei 20 % und für PE+SM bei 13 %. Vergleicht man die beiden Gruppen der Patienten untereinander, so zeigt die erste Gruppe deutlich höhere Phospholipidkonzentrationen, besonders bei LPC1+2 (s. o.), nur bei PC liegt der Mittelwert der ersten Gruppe um 10 % unter dem Mittelwert der zweiten Gruppe. Warum die Patienten sich in zwei Gruppen einteilen lassen, sollte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

2.3.3 Zum Ovarialkarzinom

Die Phospholipidkonzentrationen von 9 Patientinnen mit Ovarialkarzinom (Durchschnittsalter 56 Jahre, 30-72 Jahre) wurden aus den ³¹P-NMR-Spektren des Blutplasmas bestimmt und mit den aus dem Blutplasma von 12 gesunden Frauen (Durchschnittsalter 47 Jahre, 34-60 Jahre) erhaltenen Phospholipidkonzentrationen verglichen. Zusätzlich wurde Blutplasma von zwei Patientinnen, welches direkt nach der Operation gewonnen wurde, vermessen und ausgewertet.

Gesamtvergleich

Die folgende Tabelle (Tabelle 14) zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte für die beiden Kollektive.

Tabelle 14 Mittelwerte, Standardabweichungen (Stabw) und p-Werte für Patientinnen mit Ovarialkarzinom und gesunde Probandinnen. Mittelwerte und Standardabweichungen werden in mmol/l angegeben.

Phospholipide	Ovarialkarzinom		Gesund		Differenz (%)	p-Werte
	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw		
PE+SM	0,368	0,088	0,481	0,098	-23.493^s	0,0132
LPC1	0,185	0,093	0,286	0,054	-35.315^s	0,0054
LPC2	0,027	0,012	0,044	0,014	-38.636^s	0,0096
LPC1+2	0,212	0,095	0,330	0,057	-35.758^s	0,0067
PI	0,025	0,016	0,052	0,018	-51.923^s	0,0031
PC	1,138	0,165	1,877	0,346	-39.371^s	0,00001
ΣPL	1,743	0,322	2,740	0,482	-36.387^s	0,0001

s: signifikante Differenz ($p \leq 0,05$), zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben.

Bei Frauen mit Ovarialkarzinom zeigen sich signifikant niedrigere Konzentrationen in allen Phospholipidklassen im Vergleich mit gesunden Frauen. Dabei zeigen die Unterschiede bei PC und dem Gesamtgehalt an Phospholipiden den kleinsten p-Wert (Signifikanz 99,99 %). Die folgende Abbildung soll die Unterschiede zwischen Kranken und Gesunden noch einmal graphisch darstellen.

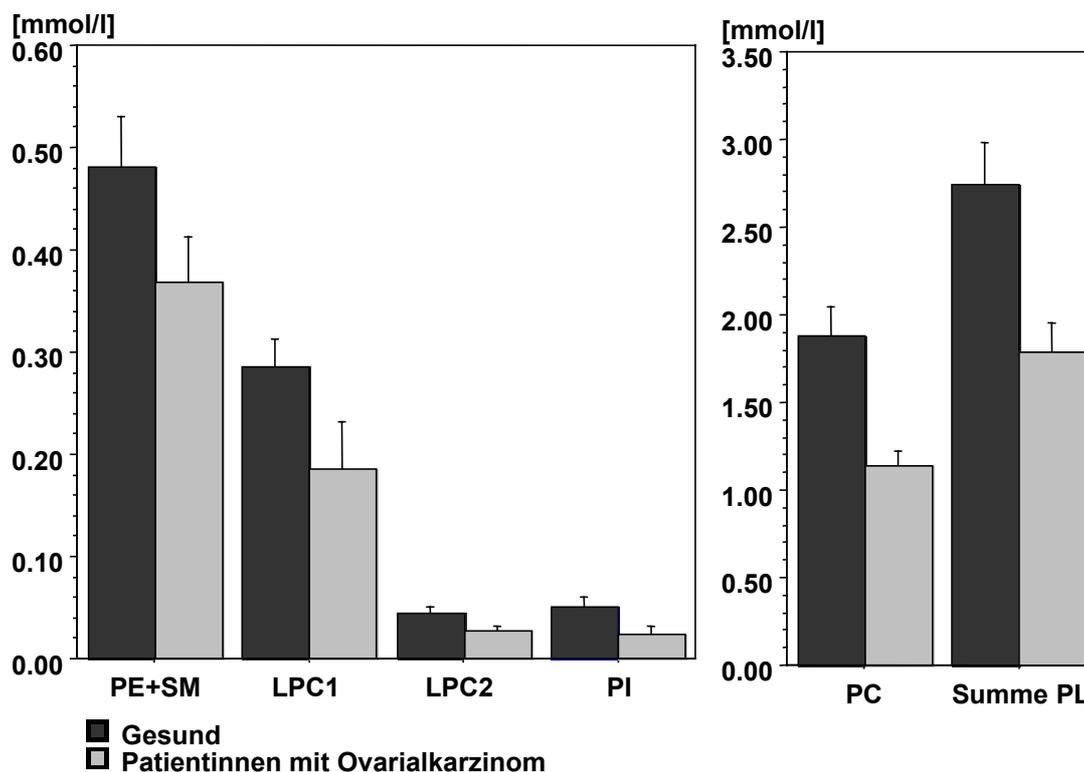


Abbildung 21 Mittelwerte der Konzentrationen an Phospholipiden im Blutplasma von Patientinnen mit Ovarialkarzinom und gesunden Probanden. Fehlerbalken = $\pm 0,5$ Standardabweichung.

Der Vergleich der Mittelwerte der Kranken mit denen der Gesunden zeigt für die Kranken niedrigere Konzentrationen an Phospholipiden, wobei die Abweichungen von 23 % (PE+SM) bis hin zu 52 % (PI) reichen. Der Mittelwert für die Konzentration an anorganischem Phosphat liegt bei den Kranken ebenfalls unter dem der Gesunden. Die Standardabweichungen liegen für PE+SM, PC und der Summe der Phospholipide bei Kranken unter denen der Gesunden. Nur bei LPC1, LPC2, LPC1+2 und PI zeigen die Kranken eine deutlich größere Standardabweichung im Vergleich mit den Gesunden.

Einfluß des Tumorstadiums

Betrachtet man die Phospholipidkonzentrationen in Abhängigkeit von der Größe des Tumors, so läßt sich feststellen, daß die Patientin mit der am weitesten fortgeschrittenen Krankheit für alle Phospholipidklassen, bis auf LPC1, die niedrigsten Werte aufweist. Verglichen werden können hier nur die Konzentrationen an Phospholipiden für drei

Patientinnen. Eine Patientin zeigte einen Tumor der Klassifikation T4, M0, eine einen Tumor der Klassifikation T3, M0 und eine Tumor der Klassifikation T2, M0. Schon die Patientin mit dem kleinsten Tumor (T2; M0) zeigt, bis auf PI sehr viel niedrigere Phospholipidkonzentrationen im Vergleich zu den gesunden Probanden. Zur Tumorklassifikation beim Ovarialkarzinom siehe unten. Die folgende Abbildung zeigt die Phospholipidkonzentrationen der einzelnen Phospholipidklassen für die drei Patientinnen. Die Patientinnen dürfen für eine Betrachtung der Abhängigkeit der Phospholipidwerte vom Tumorstadium keine Metastasen aufweisen, da diese, die Konzentration an Phospholipiden ebenfalls beeinflussen und so das Ergebnis verfälschen könnten.

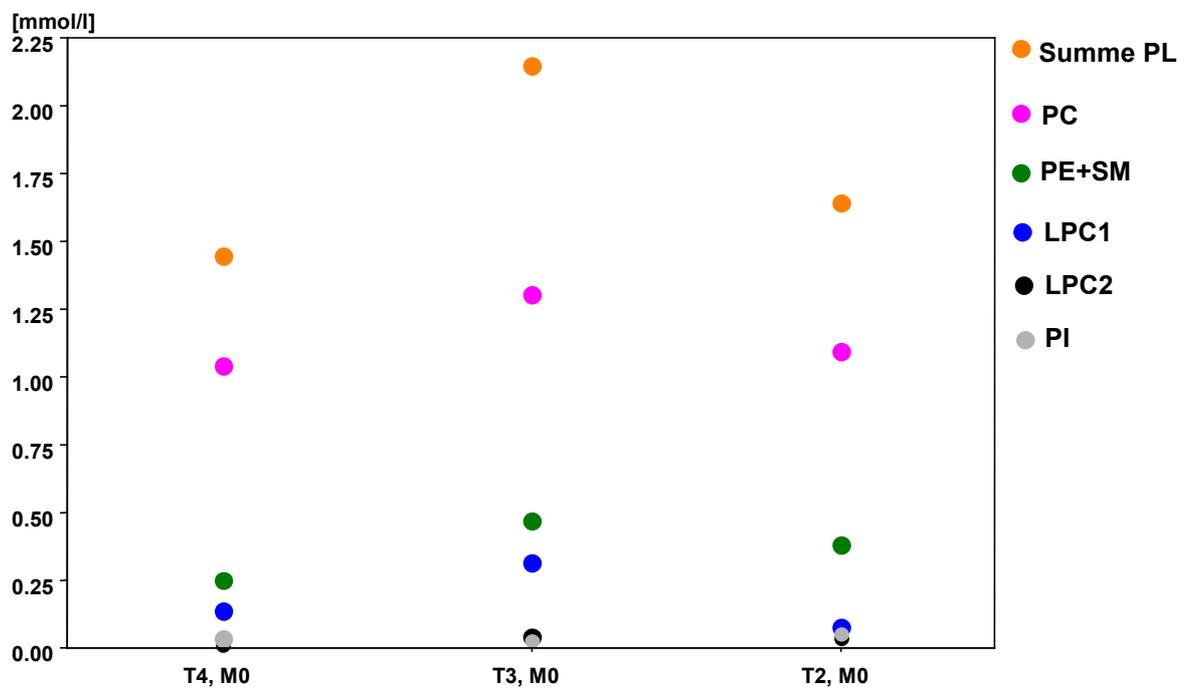


Abbildung 22 Konzentrationen an Phospholipiden im Blutplasma von Patientinnen mit Ovarialkarzinom in Abhängigkeit vom Tumorstadium.

Auch die Konzentration an anorganischem Phosphat ist bei der Patientin mit dem weit fortgeschrittenen Tumor ebenfalls niedriger als bei den anderen Patientinnen in ihrer Vergleichsgruppe. Die höchsten Phospholipidkonzentrationen, abgesehen von PI, weist allerdings die Patientin mit dem Tumor der Klassifikation T3, M0 auf.

Für Patientinnen mit Ovarialkarzinom gilt folgende TNM-Klassifikation¹¹⁸:

T1 Tumor begrenzt auf Ovarien

T2 Befall eines oder beider Ovarien, Tumorausbreitung im Becken

T3 Befall eines oder beider Ovarien, Tumorgewebe außerhalb des Beckens und/oder Tumorgewebe an der Leberkapsel

T4 Infiltration weiterer Organe

M0/M1 M0 = keine Fernmetastasen, M1 = Fernmetastasen vorhanden

N0/N1* N0 = keine regionären Lymphknotenmetastasen, N1 = regionäre Lymphknotenmetastasen

* N0/N1 werden hier nicht betrachtet

Einfluß von Metastasen

Vergleicht man die Phospholipidkonzentrationen von Patientinnen mit Tumoren im gleichen Tumorstadium aber einmal mit zusätzlich vorhandenen und einmal ohne Metastasen, so läßt sich in der ersten Gruppe (T3, M0 gegen T3, M1) erkennen, das eine Patientin ohne Metastasen höhere Phospholipidwerte in allen Phospholipidklassen aufweist als der Durchschnitt aus vier Patientinnen mit Metastasen und zwar mit einem prozentualen Anstieg von 21 % (PC) bis zu 77 % (LPC1+2). Nur PI ist leicht abgesunken (-3,35 %). Der Wert für das anorganische Phosphat liegt bei der Patientin ohne Metastasen ebenfalls über den Werten der Patientinnen mit Metastasen (8,3 %). Die folgende Abbildung zeigt noch einmal die Unterschiede zwischen der Patientin mit der Tumorklassifikation T3, M0 und den Patientinnen mit Tumoren der Tumorklassifikation T3, M1.

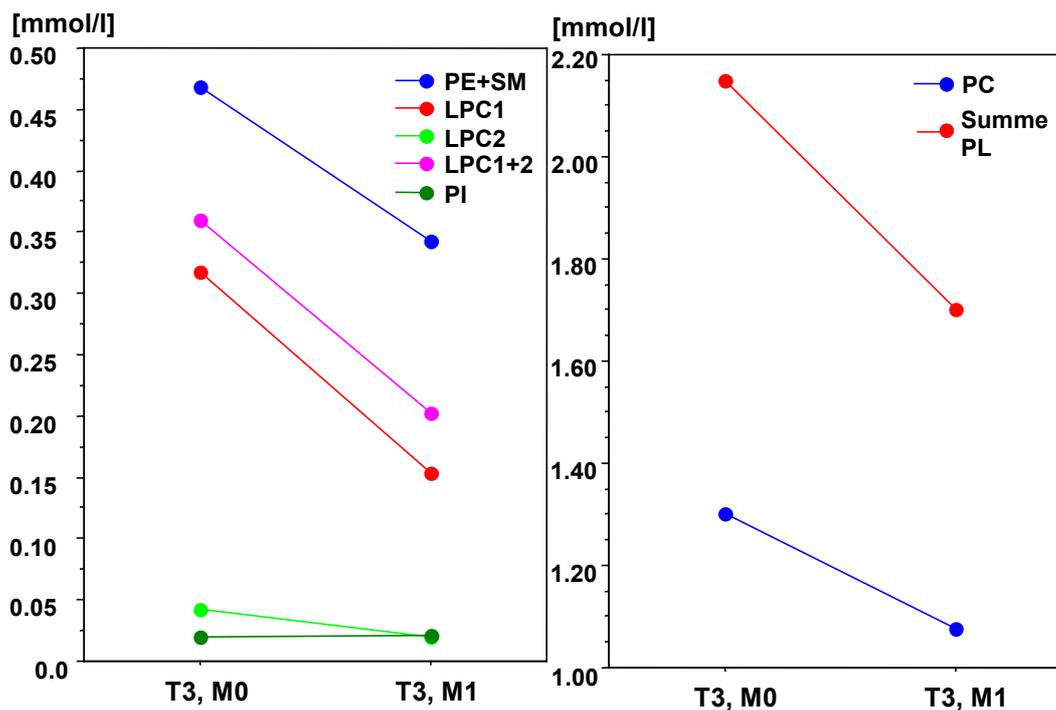


Abbildung 23 Konzentrationen an Phospholipiden im Blutplasma von zwei Patientinnen mit Ovarialkarzinom (Tumorstadium T3) in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Metastasen.

In der zweiten Vergleichsgruppe, in der aber nur zwei Patientinnen miteinander verglichen werden können (T4, M0 gegen T4, M1) treffen diese Ergebnisse allerdings nicht zu. Die Patientin mit einem Tumorstadium T4, M1 zeigt im Vergleich mit einer Patientin im Tumorstadium T4, M0 deutlich höhere Phospholipidkonzentrationen. Allerdings ist die Patientin mit den Metastasen deutlich älter als die Vergleichspatientin ohne Metastasen (68 zu 30 Jahren). Der Wert an anorganischem Phosphat ist für beide Patientinnen nahezu gleich.

Vergleich der Phospholipidkonzentrationen vor und kurz nach der Operation

Für einen Vergleich der Phospholipidkonzentrationen vor und kurz nach der Operation wurden bei zwei Patientinnen nach der Operation noch einmal Blut entnommen und vermessen. Beide Patientinnen zeigen im Vergleich mit den anderen Patientinnen schon vor der Operation verhältnismäßig hohe Konzentrationen an Phospholipiden. Für die jüngere der beiden ist der größte Unterschied der Phospholipidkonzentrationen vor und nach der Operation bei LPC1, LPC2 und LPC1+2 zu finden. Die Konzentration an

LPC1+2 ist nach der Operation um die Hälfte niedriger als vor der Operation. Die Konzentrationen an PI und PC sind leicht angestiegen bzw. nahezu gleich geblieben, während PE+SM und die Summe der Phospholipide niedrigere Konzentrationen als vor der Operation aufweisen. Die Abnahme an PE+SM und der Gesamtsumme der Phospholipide ist jedoch viel geringer als die an LPC1+2. Der Wert an Pi ist nach der Operation höher als vor der Operation. Für die ältere Patientin, die zusätzlich noch Metastasen aufweist, finden sich niedrigere Konzentrationen für alle Phospholipidklassen im Vergleich zu den Werten vor der Operation. Der stärkste Abfall läßt sich für LPC1 und PI ermitteln, gefolgt von PE+SM, LPC1+2 und der Summe der Phospholipide, sowie PC und LPC2. Der Wert für Pi ist nur sehr wenig niedriger als vor der Operation. Die Patientin hatte einen Tumor der Klassifikation T3, M1 und zeigt im Vergleich mit anderen Frauen mit gleicher Tumorklassifikation deutlich höhere Phospholipidwerte für alle Phospholipidklassen. Bei beiden Patientinnen ist der Einfluß der Operation spürbar, der sich in einer weiteren Absenkung der Phospholipidwerte bemerkbar macht. Warum bei der einen Patientin nicht alle Phospholipidklassen erniedrigt sind, kann nicht erklärt werden. Es sollten weitere Untersuchungen erfolgen, bei denen den Patientinnen in regelmäßigen Abständen Blut entnommen und untersucht wird. Die folgende Abbildung zeigt noch einmal die Konzentrationen der Phospholipide für die zwei Patientinnen vor und nach der Operation.

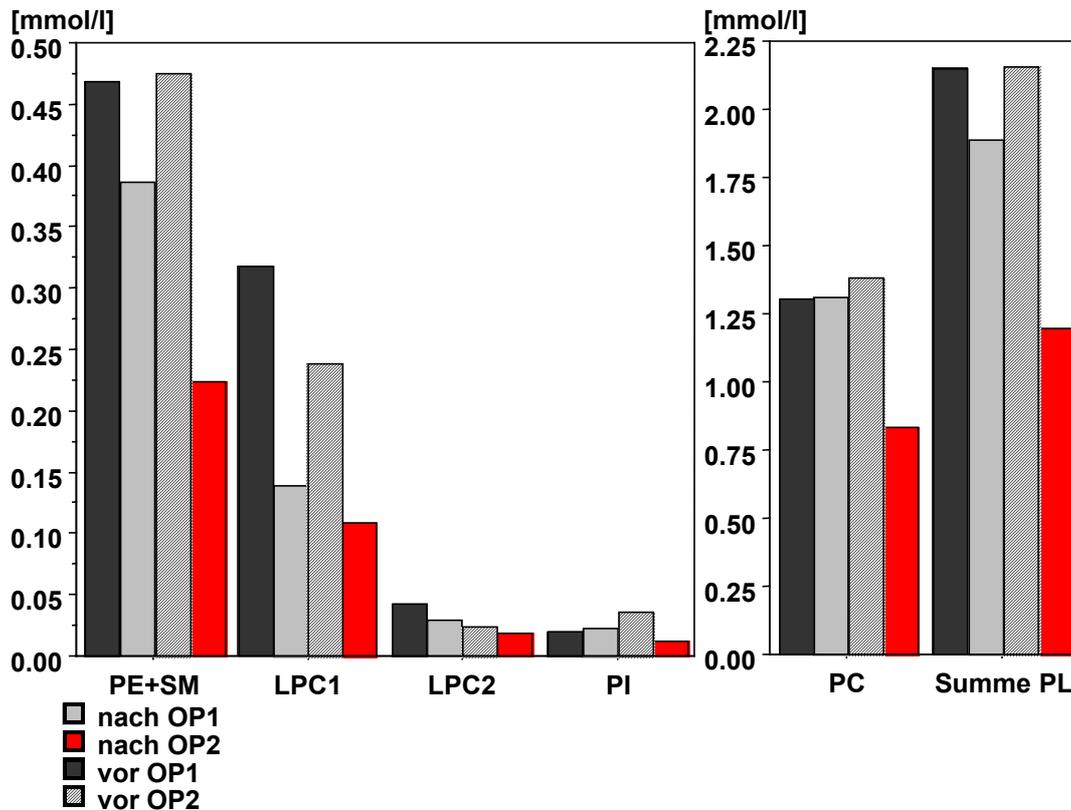


Abbildung 24 Konzentrationen der Phospholipide für die zwei Patientinnen vor und nach der Operation.

Altersspezifische Betrachtung

Ein Vergleich der Phospholipidkonzentrationen jüngerer und älterer Patientinnen kann hier nicht erfolgen, da jüngere und ältere Patientinnen Tumore verschiedener Tumorklassifikation aufweisen. Vergleicht man paarweise Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit Gesunden, wobei beide genau gleiches Alter aufweisen, so zeigen auch hier die Patientinnen niedrigere Konzentrationen an Phospholipiden für alle Phospholipidklassen, unabhängig vom Tumorstadium.

2.3.4 Zum Mammakarzinom

Für einen Vergleich der Phospholipidkonzentrationen von zwölf Frauen mit Mammakarzinom den Werten von zwölf gesunden Frauen (Altersdurchschnitt bei beiden Gruppen 47 Jahre, 32-63 Jahre und 34-60 Jahre) wurde Blutplasma ^{31}P -NMR-spektroskopisch vermessen.

Gesamtvergleich

Für die Phospholipidklassen PI, PC und die Summe der Phospholipide finden sich signifikant niedrigere Konzentrationen bei den Erkrankten gegenüber den Gesunden. Die Patientinnen mit Mammakarzinom zeigen außerdem niedrigere Konzentrationen an LPC1 und LPC1+2, diese Erniedrigung ist jedoch nicht signifikant. LPC2 weist im Mittel bei beiden Kollektiven nahezu gleiche Werte auf. Die Werte für PE+SM liegen bei den Kranken über den Werten der Gesunden, eine Veränderung, die aber ebenfalls nicht signifikant ist. Für den Wert an anorganischem Phosphat findet sich bei den Kranken eine niedrigere Konzentration als bei den Gesunden. Die prozentualen Abweichungen der Mittelwerte der Phospholipidkonzentrationen der Kranken im Vergleich mit den Mittelwerten der Gesunden reichen von +8 % für PE+SM, -12 % bei LPC1 bzw. -11 % bei LPC1+2, -33 % bei PI, -21 % bei PC bis zu -15 % bei der Summe der Phospholipide. Die Standardabweichungen für die Konzentrationen an Phospholipiden sind bei den Erkrankten, bis auf PE+SM, PC und der Summe der Phospholipide, höher als bei den Gesunden. Die folgende Tabelle (Tabelle 15) zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen und die p-Werte für den Vergleich der Phospholipidkonzentrationen bei Patientinnen mit Mammakarzinom mit gesunden Frauen.

Tabelle 15 Mittelwerte, Standardabweichungen (Stabw) und p-Werte für Patientinnen mit Mammakarzinom und gesunde Probandinnen. Mittelwerte und Standardabweichungen werden in mmol/l angegeben.

Phospholipide	Mammakarzinom		Gesund		Differenz (%)	p-Werte
	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw		
PE+SM	0,520	0,089	0,481	0,098	8.108	0,3221
LPC1	0,252	0,077	0,286	0,054	-11.888	0,2172
LPC2	0,043	0,016	0,044	0,014	-2.273	0,9385
LPC1+2	0,295	0,084	0,330	0,057	-10.606	0,2456
PI	0,035	0,018	0,052	0,018	-32.692^s	0,0364
PC	1,480	0,252	1,877	0,346	-21.151^s	0,0041
ΣPL	2,330	0,354	2,740	0,482	-14.964^s	0,0270

s: signifikante Differenz ($p \leq 0,05$), zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben.

Die folgende Abbildung stellt die Unterschiede noch einmal graphisch dar.

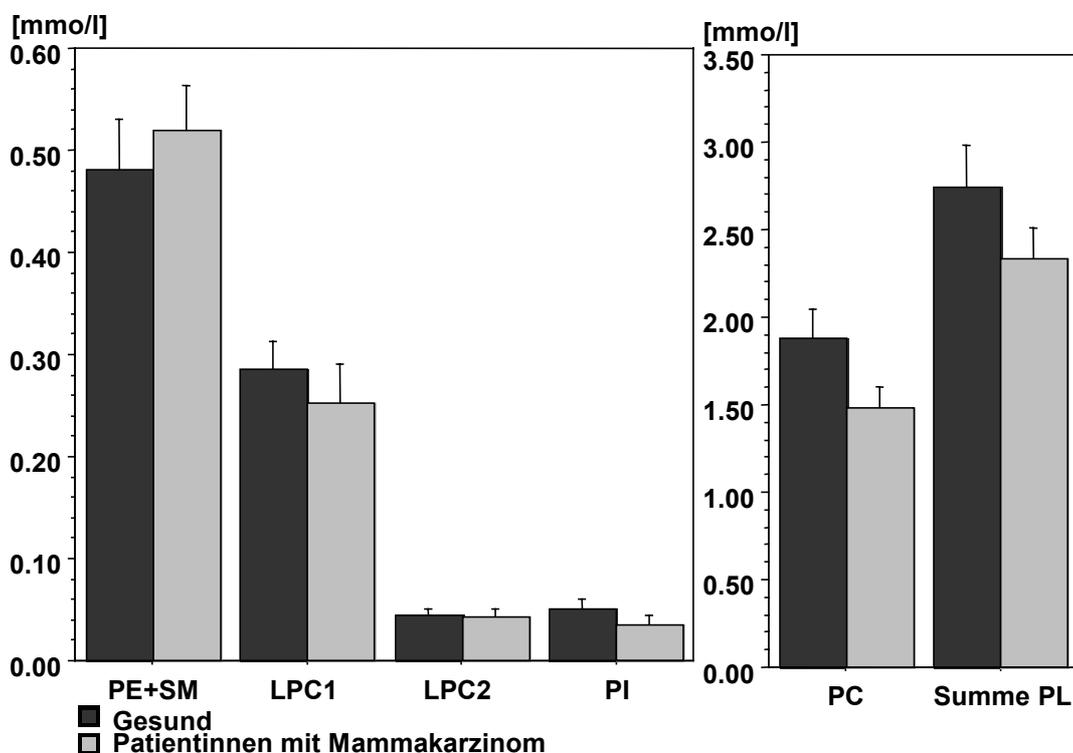


Abbildung 25 Mittelwerte der Konzentrationen an Phospholipiden im Blutplasma von Patientinnen mit Mammakarzinom und gesunden Probanden. Fehlerbalken = $\pm 0,5$ Standardabweichung.

Einfluß des Tumorstadiums auf die Phospholipidwerte

Bei einem Vergleich der Phospholipidkonzentrationen der Patientinnen untereinander in Abhängigkeit von der Klassifikation des Tumors (Patientinnen ohne Metastasen, M0) läßt sich erkennen, daß die Patientin mit einem kleinen Tumor (T1) höhere Konzentrationen an Phospholipiden aufweist als die Patientinnen mit einem Tumorstadium T2 oder T3. Die Phospholipidkonzentrationen der Patientinnen mit Tumoren des Tumorstadiums T2 liegen über denen der Patientinnen mit Tumoren des Tumorstadiums T3. Die einzige Ausnahme bilden LPC1 und LPC1+2. Dort sind die Werte für die Patientinnen mit dem größeren Tumor, bzw. dem Tumor mit der Tumorklassifikation T3 höher. Die Phospholipidkonzentrationen für die Patientin mit dem Tumor des Tumorstadiums T4, die zusätzlich noch Metastasen aufweist, liegen über den Konzentrationen der anderen Patientinnen, bis auf LPC1 und LPC1+2 sogar über denen der Patientin mit

Tumorstadium T1. Allerdings ist diese Patientin auch deutlich älter als die anderen Patientinnen, wodurch sich ihre trotz der fortgeschrittenen Krankheit hohen Phospholipidwerte erklären könnten. Die Patientin mit dem kleinsten Tumor (T1, M0) zeigt im Vergleich zu den Mittelwerten der gesunden Probanden niedrigere Phospholipidkonzentrationen an PI, PC und der Summe der Phospholipide, die Werte für LPC1+2 und PE+SM sind aber höher als die Mittelwerte der Gesunden. Die Patientin ist etwas älter als der Durchschnitt der Gesunden (vergleiche auch nächsten Abschnitt). Die Konzentration an anorganischem Phosphat liegt für sie unter der gesunder Probanden. Die Konzentration an für Pi ist für diese Patientin mit dem Tumor des Tumorstadiums T1 am höchsten und wird von Patientinnen mit Tumoren der Tumorklassifikation T2 über T3 zu T4 niedriger. Die folgende Abbildung zeigt die Konzentrationen an Phospholipiden für Patientinnen mit Tumoren im Tumorstadium T1, M0; T2, M0 und T3, M0.

Zum Einfluß von Metastasen können zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Aussagen gemacht werden, da nur eine Patientin Metastasen zum Zeitpunkt der Operation aufwies.

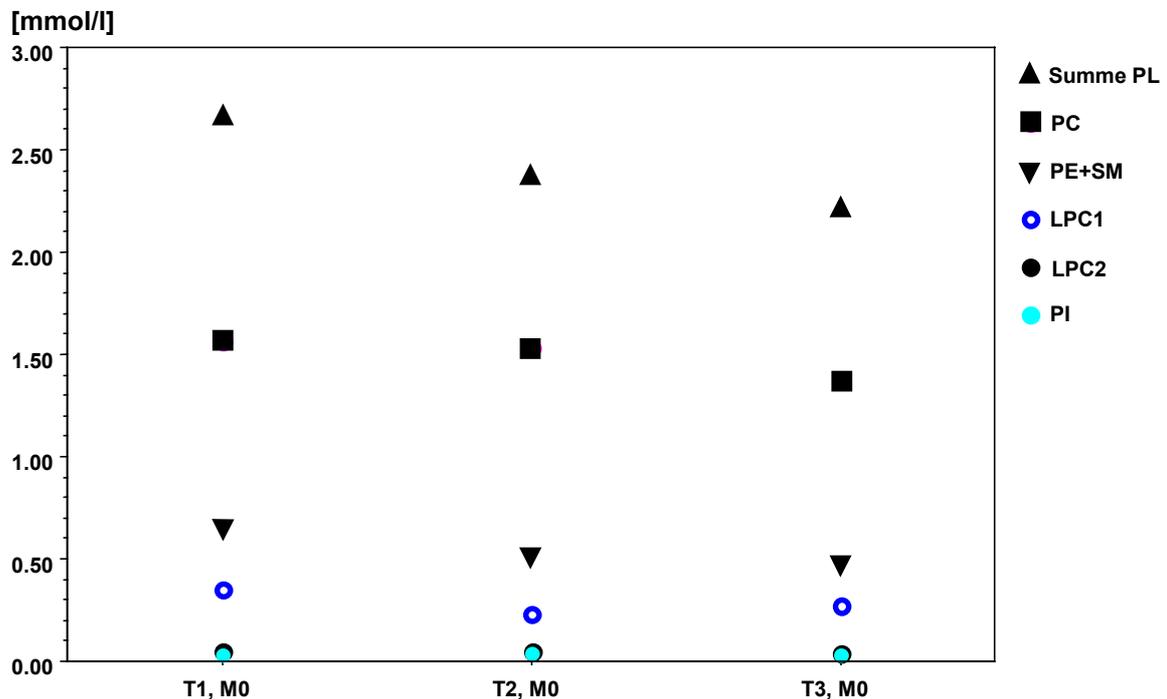


Abbildung 26 Konzentrationen an Phospholipiden im Blutplasma von Patientinnen mit Mammakarzinom in Abhängigkeit vom Tumorstadium.

Die Einteilung der Mammakarzinome erfolgt nach der TNM-Klassifikation¹¹⁹:

T1 Tumor ≤ 2 cm in größter Ausdehnung

T2 Tumor > 2 cm aber ≤ 5 cm in größter Ausdehnung

T3 Tumor > 5 cm in größter Ausdehnung

T4 Tumor mit Infiltration von Brustwand oder Haut

M0/M1 M0 = keine Fernmetastasen, M1 = Fernmetastasen vorhanden

N0/N1* N0 = keine regionären Lymphknotenmetastasen, N1 = regionäre Lymphknotenmetastasen

* N0/N1 werden hier nicht betrachtet.

Altersspezifische Betrachtung

Vergleicht man ältere und jüngere Patientinnen, welche Tumore des gleichen Tumorstadiums (ohne Metastasen) aufweisen, so läßt sich bei Patientinnen mit Tumoren des Stadium T2 feststellen, daß die jüngeren Patientinnen durchgehend etwas niedrigere Phospholipidwerte aufweisen als die Älteren. In der Gruppe der Patientinnen mit Tumoren der Klassifikation T3 trifft das nur für PC und die Summe der Phospholipide zu. Die anderen Phospholipide sind nicht erniedrigt. Allerdings gibt es in dieser Gruppe auch nur eine jüngere Frau. Die Konzentrationen für das anorganische Phosphat liegen bei jüngeren Patientinnen mit Tumoren der Tumorklassifikation T2, M0 niedriger als bei den älteren Patientinnen mit Tumoren der gleichen Klassifikation. Für die Gruppe mit Tumoren des Tumorstadiums T3, M0 trifft dies nicht zu, doch gibt es, wie erwähnt, dort auch nur eine jüngere Patientin.

Vergleicht man paarweise die Phospholipidkonzentrationen von Patientinnen mit Mammakarzinom und gesunden Probanden gleichen Alters so finden sich für die Patientin mit dem Tumor des Tumorstadiums T1, M0 im Vergleich zu einer gesunden Probandin gleichen Alters deutlich geringere Konzentrationen an PI, PC und der Summe der Phospholipide. Die Werte für PE+SM, LPC1, LPC2, LPC1+2 sind nahezu gleich. Vergleicht man paarweise die Phospholipidkonzentrationen von Patientinnen mit einem Tumorstadium T2, M0 und gesunden Probandinnen gleichen Alters, findet man die Veränderungen, die allgemein zwischen Patientinnen mit Mammakarzinom und gesunden

Probandinnen zu finden sind, ebenfalls. Die Standardabweichungen der Phospholipidkonzentrationen liegen, wie beim Gesamtkollektiv der Erkrankten, bei den Patientinnen für LPC1, LPC2 und LPC1+2, sowie PI über dem Wert für die Gesunden, für PC, PE+SM und die Summe der Phospholipide darunter. Vergleicht paarweise Patientinnen mit einem Tumorstadium T3, M0 und gesunde Probanden gleichen Alters, findet man die gleichen Veränderungen der Konzentrationen der Phospholipide wie bei dem Vergleich aller Patientinnen mit Tumoren der Klassifikation T3, M0 mit den Mittelwerten der Phospholipidkonzentrationen der Gesunden. Die Standardabweichungen der Phospholipidkonzentrationen für Patientinnen mit Tumoren im Tumorstadium T3, M0 ist bei LPC1+2 und PI größer als bei Konzentrationen der Gesunden, bei PE+SM, PC und der Summe der Phospholipide kleiner.

2.3.5 Vergleich der Phospholipidkonzentrationen von Patienten mit unterschiedlichen Karzinomarten

Neben der Frage, ob es einen signifikanten Unterschied in den Phospholipidkonzentrationen zwischen Probanden und Karzinompatienten gibt ist natürlich von grundlegender Bedeutung, ob diese Unterschiede tumorspezifisch sind (s. Kap. 1.4 Problemstellung). Daher wurden Analysen durchgeführt zum Vergleich Nierenzellkarzinom mit Dickdarmkarzinom sowie Ovarialkarzinom und Mammakarzinom.

Vergleich Nierenzellkarzinom mit Dickdarmkarzinom

Die Phospholipidkonzentrationen von Patienten mit Nierenzellkarzinomen unterscheiden sich signifikant von den für Patienten mit Dickdarmkarzinom ermittelten. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der Phospholipidkonzentrationen dieser Kollektive, sowie die p-Werte werden in der folgenden Tabelle (Tabelle 16) aufgeführt.

Tabelle 16 Mittelwerte, Standardabweichungen (Stabw) und p-Werte für Patienten mit Nierenzellkarzinom und Patienten mit Dickdarmkarzinom. Mittelwerte und Standardabweichungen werden in mmol/l angegeben.

Phospholipide	Nierenzellkarzinom		Dickdarmkarzinom		Differenz (%)	<i>p</i> -Werte
	<i>Mittelwert</i>	<i>Stabw</i>	<i>Mittelwert</i>	<i>Stabw</i>		
PE+SM	0,465	0,099	0,492	0,141	-5.488	0,5422
LPC1	0,206	0,065	0,356	0,146	-42.135^s	0,0004
LPC2	0,037	0,018	0,052	0,025	-28.846	0,0785
LPC1+2	0,243	0,076	0,407	0,169	-40.295^s	0,0007
PI	0,049	0,018	0,053	0,019	-7.547	0,4544
PC	1,434	0,365	1,343	0,287	6.776	0,5257
ΣPL	2,191	0,497	2,296	0,381	-4.573	0,6575

s: signifikante Differenz ($p \leq 0,05$), zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben.

Wie in der folgenden Abbildung zu erkennen, zeigen Patienten mit Nierenzellkarzinom signifikant niedrigere Konzentrationen für LPC1 und LPC1+2 als Patienten mit Dickdarmkarzinom.

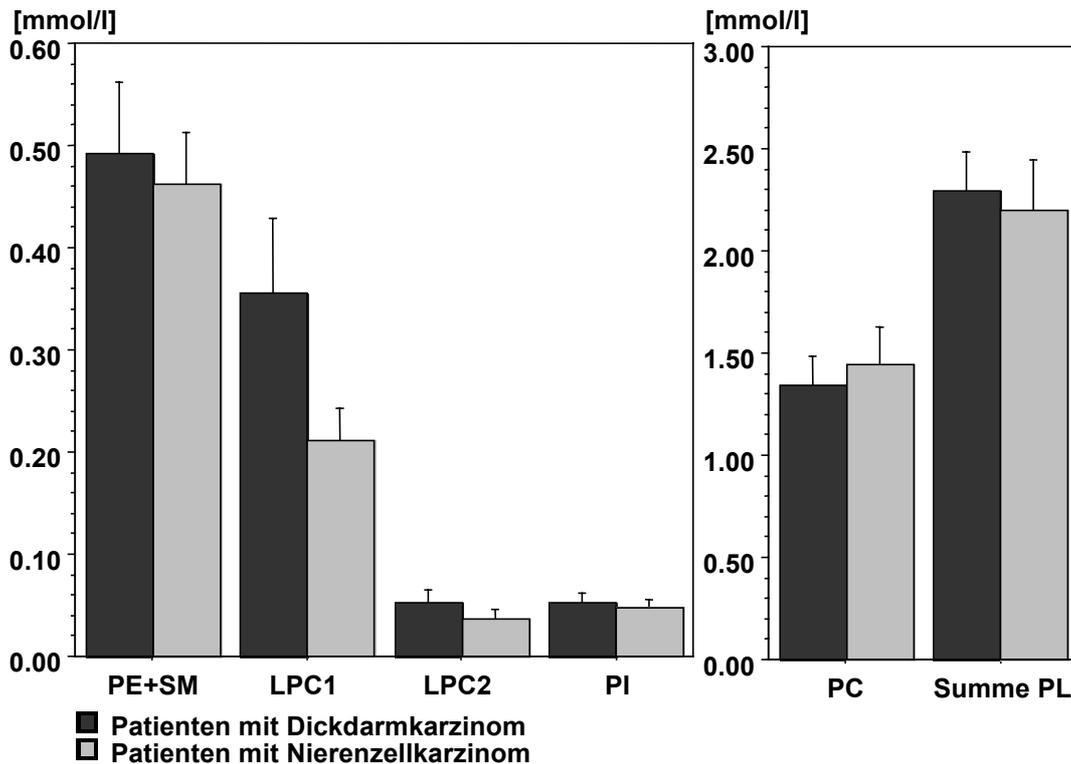


Abbildung 27 Mittelwerte der Konzentrationen an Phospholipiden im Blutplasma von Patienten mit Dickdarmkarzinom und Patienten mit Nierenzellkarzinom. Fehlerbalken = $\pm 0,5$ Standardabweichung.

Der Mittelwert der Konzentration an LPC1+2 für Patienten mit Nierenzellkarzinom zeigt einen um 40 % niedrigeren Wert im Vergleich mit dem Mittelwert für die Patienten mit Dickdarmkarzinom. Für den Mittelwert an PE+SM ergibt sich ein um 5 % niedrigerer Wert für Patienten mit Nierenzellkarzinom, ebenso für die Summe der Phospholipide. Der Mittelwert an PC liegt für die Patienten mit Nierenzellkarzinom allerdings um 7 % über dem der Patienten mit Dickdarmkarzinom. Die Standardabweichung liegt bei den Patienten mit Nierenzellkarzinom für PE+SM, LPC1, LPC2, LPC1+2 und PI unter der der Patienten mit Dickdarmkarzinom. Für PC und die Summe der Phospholipide ist es genau umgekehrt. Die Konzentration an anorganischem Phosphat ist für Patienten mit Nierenzellkarzinom sehr viel niedriger als bei den Patienten mit Dickdarmkarzinom.

Vergleich Ovarialkarzinom mit Mammakarzinom

Verglichen werden hier die Konzentrationen an Phospholipiden von neun Frauen mit Ovarialkarzinom (Durchschnittsalter 56 Jahre, 30-72 Jahre) mit den aus dem Blutplasma

von zwölf Frauen mit Mammakarzinom erhaltenen (Durchschnittsalter 47 Jahre, 32-63 Jahre). Wie aus der unten aufgeführten Tabelle (Tabelle 17) zu entnehmen, zeigen die Patientinnen mit Ovarialkarzinom signifikant niedrigere Konzentrationen an PE+SM, LPC2, PC und der Summe der Phospholipide.

Tabelle 17 Mittelwerte, Standardabweichungen (Stabw) und p-Werte für Patientinnen mit Ovarialkarzinom und Patientinnen mit Mammakarzinom. Mittelwerte und Standardabweichungen werden in mmol/l angegeben.

Phospholipide	Ovarialkarzinom		Mammakarzinom		Differenz (%)	p-Werte
	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw		
PE+SM	0,368	0,088	0,520	0,089	-29.231^s	0,0010
LPC1	0,185	0,093	0,252	0,077	-26.587	0,0868
LPC2	0,027	0,012	0,043	0,016	-37.209^s	0,0237
LPC1+2	0,212	0,095	0,295	0,084	-28.136	0,1056
PI	0,025	0,016	0,035	0,018	-28.571	0,2030
PC	1,138	0,165	1,480	0,252	-23.108^s	0,0022
ΣPL	1,743	0,322	2,330	0,354	-25.193^s	0,0028

s: signifikante Differenz ($p \leq 0,05$), zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben.

Die Mittelwerte der Konzentrationen an LPC1, LPC1+2 und PI liegen für die Frauen mit Ovarialkarzinom ebenfalls unter den Werten für die Frauen mit Mammakarzinom, diese Abweichungen sind jedoch nicht signifikant. Die Mittelwerte der Phospholipidkonzentrationen liegen für Patientinnen mit Ovarialkarzinom bei PE+SM 29 %, bei LPC1 27 %, bei LPC2 37 %, bei PI 29 %, bei PC 23 % und bei der Summe der Phospholipide 25 % unter den Mittelwerten der Konzentrationen für die Frauen mit Mammakarzinom. Der Mittelwert der Konzentration an anorganischem Phosphat liegt für die Frauen mit Ovarialkarzinom höher als bei den Frauen mit Mammakarzinom. Die Standardabweichungen der Phospholipidkonzentrationen liegen für die Frauen mit Ovarialkarzinom für LPC1 und LPC1+2 über den Werten für die Frauen mit Mammakarzinom. Bei PE+SM zeigen die Standardabweichungen für beide Kollektive nahezu gleiche Werte, für LPC2, PI, PC und die Summe der Phospholipide sind die

Standardabweichungen der Konzentrationen an Phospholipiden bei den Frauen mit Ovarialkarzinom kleiner. Die folgende Abbildung zeigt noch einmal graphisch die Unterschiede in den Phospholipidkonzentrationen der Patientinnen mit Ovarialkarzinom im Vergleich mit den Patientinnen mit Mammakarzinom.

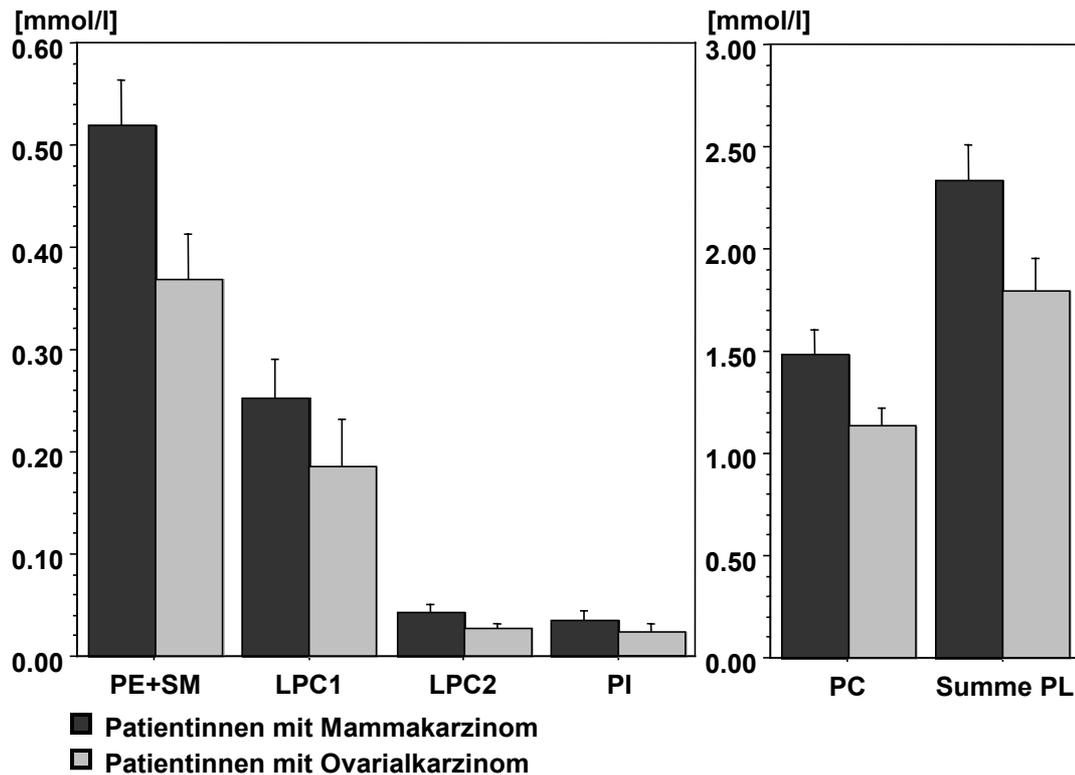


Abbildung 28 Mittelwerte der Konzentrationen an Phospholipiden im Blutplasma von Patientinnen mit Ovarialkarzinom und Patientinnen mit Mammakarzinom. Fehlerbalken = $\pm 0,5$ Standardabweichung.

Einfluß des Tumorstadiums auf die Phospholipidwerte

Von den neun Patientinnen mit Ovarialkarzinom zeigen zwei einen Tumor der Klassifikation T4, fünf einen Tumor der Klassifikation T3, eine einen Tumor der Klassifikation T2 und keine einen Tumor der Klassifikation T1. Bei einer Patientin ist die Klassifikation des Tumors nicht bekannt. Von den acht Patientinnen mit Ovarialkarzinomen bekannter Tumorklassifikation zeigten fünf Patientinnen Metastasen zum Zeitpunkt der Operation. Von den zwölf Patientinnen mit Mammakarzinom zeigte nur eine einen Tumor der Klassifikation T4, vier Patientinnen wiesen Tumore der Klassifikation T3, fünf Patientinnen

Tumore der Klassifikation T2 und eine einen Tumor der Klassifikation T1 auf. Bei einer Patientin ist die Tumorklassifikation nicht bekannt. Von den elf Patientinnen mit bekannter Tumorklassifikation zeigte nur eine Patientin Metastasen zum Zeitpunkt der Operation. Vergleicht man nun gruppenweisen die Patientinnen mit Tumoren der gleichen Tumorklassifikation aus beiden Kollektiven, so lassen sich zwei Patientinnen mit Tumoren der Klassifikation T4, M1, eine mit Ovarialkarzinom und eine mit Mammakarzinom, finden. Die Patientin mit dem Ovarialkarzinom zeigt durchweg eine niedrigere Phospholipidkonzentration für alle Phospholipidklassen als die Patientin mit dem Mammakarzinom. Für die meisten Phospholipidklassen (bis auf PE+SM und LPC2) liegen die Konzentrationen für die Patientin mit dem Ovarialkarzinom ca. 30 % unter den Konzentrationen für die Patientin mit Mammakarzinom. Die Konzentrationen der einzelnen Phospholipidklassen weichen etwas stärker voneinander ab, als die Mittelwerte der Phospholipide aller Patientinnen der jeweiligen Krankheitsbilder. Der Wert für das anorganische Phosphat liegt bei der Patientin mit Ovarialkarzinom über dem für die Patientin mit Mammakarzinom. Für Patientinnen mit Tumoren der Tumorklassifikation T3, M0 ergeben sich folgende Unterschiede zwischen beiden Kollektiven. Die Phospholipidkonzentrationen liegen für die Patientin mit Ovarialkarzinom unter den Mittelwerten der Konzentrationen für Patientinnen mit Mammakarzinom. Nur die Konzentrationen an LPC1 bzw. LPC1+2 sind für die Patientin mit Ovarialkarzinom höher (16 % bzw. 14 %) als für die Mittelwerte der Patientinnen mit Mammakarzinom. Die Konzentrationen an LPC2 unterscheiden sich nicht wesentlich bei beiden Gruppen. die prozentualen Abweichungen liegen, bis auf PI, deutlich niedriger als für den Vergleich der Mittelwerte aller Patientinnen. Der Wert für Pi liegt für die Patientin mit dem Ovarialkarzinom über dem Mittelwert für die Patientinnen mit Mammakarzinom. Für den Vergleich der Patientinnen mit Tumoren der Tumorklassifikation T2, M0 ergeben sich folgende Unterschiede in den Phospholipidkonzentrationen. Die Phospholipidkonzentrationen der Patientin mit Ovarialkarzinom liegen unter dem Mittelwert der Konzentrationen der Patientinnen mit Mammakarzinom. Nur der Wert für PI liegt für die Patientin mit dem Ovarialkarzinom 40 % über dem Mittelwert für die Patientinnen mit Mammakarzinom. die größte Abweichung zwischen beiden Gruppen findet sich allerdings bei LPC1 und LPC1+2. Dort liegt der Wert für die Patientin mit Ovarialkarzinom 67 % bzw. 61 % unter dem Wert für die Patientinnen mit Mammakarzinom. Die Abweichungen der Phospholipidkonzentrationen der anderen Phospholipidklassen liegen nur etwas höher als bei dem Vergleich aller

Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit allen Patientinnen mit Mammakarzinom. Der Wert für P_i liegt bei der Patientin mit Ovarialkarzinom über dem Mittelwert der Patientinnen mit Mammakarzinom. Die Unterschiede zwischen dem Vergleich der Gesamtkollektive und dem Vergleich der Einzelkollektive können auch damit zusammenhängen, daß es bei den hier untersuchten Patientinnen Ovarialkarzinom vier Frauen mit einem Tumor der Tumorklassifikation T3, M1 gibt, aber keine Patientinnen mit Mammakarzinom einen Tumor dieser Klassifikation aufweist. Da bei den Patientinnen mit Mammakarzinom nur eine Metastasen aufweist kann eine Unterteilung nach dieser Kategorie nicht erfolgen. Tumore der Klassifikation T4, M0 finden sich ebenfalls nur bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom, nicht aber bei Patientinnen mit Mammakarzinom. Tumor der Klassifikation T2, M1 sind in dieser Untersuchung in beiden Kollektiven nicht vertreten.

2.3.6 Vergleich der jüngeren Probanden mit den verschiedenen Kollektiven der Kranken

Vergleicht man die einzelnen Kollektive von Patienten mit der Gruppe der jüngeren Probanden, so stellt man fest, daß die Ergebnisse nicht mehr von der Krankheit, sondern dem Altersunterschied dominiert werden. Im Durchschnitt zeigen die Patienten dann höhere Konzentrationen an Phospholipiden als die Probanden, diese Änderungen sind z. T. signifikant. Die prinzipiellen Tendenzen innerhalb der Krankheitsbilder zu einer Erniedrigung bestimmter Phospholipidklassen bleiben bestehen, werden jedoch von den generell niedrigeren Phospholipidkonzentrationen für jüngere Probanden überlagert.

2.4 Ergebnisse der $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopischen Untersuchungen

2.4.1 Zu Patienten mit Nierenzellkarzinomen

Es wurden ^1H -Spektren von vier Frauen und fünf Männern mit Nierenzellkarzinomen (Durchschnittsalter 65 Jahre) aufgenommen und die Ergebnisse der Auswertung mit denen für das Gesamtkollektiv an gesunden Probanden erhaltenen (Durchschnittsalter 40 Jahre) verglichen. Eine Unterteilung nach Geschlecht ist aufgrund der geringen Probenzahl nicht möglich, da sonst keine Aussagen zur Signifikanz gemacht werden können, d. h. der T-Test nicht mehr anwendbar ist. Daher wurden männliche und weibliche Patienten und Probanden zusammengefaßt und das Kollektiv der Kranken mit

dem der Gesunden verglichen. Die Ergebnisse diese Gesamtvergleiches sollen im folgenden vorgestellt werden.

Gesamtvergleich

In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte, Standardabweichungen, Differenzen und p-Werte für den Vergleich der Patienten mit Nierenzellkarzinom mit gesunden Frauen und Männern dargestellt.

Tabelle 18 Mittelwerte, Standardabweichungen (Stabw) und p-Werte für Patienten mit Nierenzellkarzinom (NCMW) und gesunde Probanden (GPMW). Mittelwerte und Standardabweichungen werden in mmol/l, bezogen auf die jeweilige CH_n-Gruppe, angegeben.

Peak	Zuordnung	NCMW	Stabw	GPMW	Stabw	Diff. %	p-Wert
2	<u>C18</u> (-CH ₃) von Cholesterin in HDL	0,0444	0,0234	0,0504	0,0254	- 12	0,5687
3	LDL1 → <u>CH</u> ₃ (CH ₂) _n VLDL1 → <u>CH</u> ₃ CH ₂ CH ₂ C= terminale <u>CH</u> ₃ -Gruppen von Fettsäuren	0,8274	0,3900	0,8930	0,1927	- 7	0,5855
4	- <u>CH</u> ₃ , Valin	0,0082	0,0027	0,0082	0,0017	0	0,9437
5	LDL2 → (<u>CH</u> ₂) _n VLDL2 → - <u>CH</u> ₂ CH ₂ CO	2,1033	0,9163	2,5486	0,9329	- 17	0,2669
6	- <u>CH</u> ₃ , Laktat	0,2487	0,1567	0,1211	0,0444	105	0,0066
7	- <u>CH</u> ₃ , Alanin	0,0106	0,0038	0,0139	0,0040	- 24	0,0678
8	- <u>CH</u> ₂ CH ₂ CO	0,2636	0,1055	0,5913	0,2474	- 55	0,0011
9	- <u>CH</u> ₂ CH ₂ C=C-	0,0441	0,0112	0,0577	0,0139	- 24	0,0208
10	- <u>CH</u> ₂ C=C-	0,6344	0,2727	0,7623	0,2401	- 17	0,2426
11	-NHCO <u>CH</u> ₃ gehören beide zu Acetyl- signalen von α ₁ -aciden Glykoproteinen	0,0791	0,0305	0,0621	0,0179	27	0,0980
12		0,0161	0,0081	0,0117	0,0053	38	0,1790
13	- <u>CH</u> ₂ CO	0,1766	0,0843	0,2029	0,0733	- 13	0,4309
14	-C=C <u>CH</u> ₂ C=C-	0,1682	0,0668	0,2094	0,0976	- 20	0,2773
15	ε- <u>CH</u> ₂ -, Albumin und Lysin	0,1140	0,0499	0,1545	0,0579	- 26	0,0950
16	-N ⁺ (<u>CH</u> ₃) ₃ Gruppen verschiedener cholinhaltiger Moleküle in Lipo- proteinen	0,0934	0,0511	0,0832	0,0189	12	0,6904
17	H ₂ , β-Glukose	0,1389	0,0788	0,1915	0,0439	- 27	0,0466
18	- <u>CH</u> ₂ , (freies) Glycerin	0,0380	0,0122	0,0420	0,0124	- 10	0,4524
19	= <u>CH</u> OCOR, Glycerylgruppen von Lipiden	0,0078	0,0052	0,0232	0,0111	- 66	0,2914
20	anomeres H1, α-Glukose	0,0516	0,0201	0,0681	0,0186	- 24	0,1828
21	CH-Gruppen ungesättigter Fettsäuren in Lipiden, -CH= <u>CH</u> CH ₂ <u>CH</u> =CH- und = <u>CH</u> CH ₂ CH ₂ -	0,6944	0,2885	0,8772	0,2924	- 21	0,1506

nicht gesondert beschriftete Gruppen gehören zu Bestandteilen von Fettsäuren aus Lipiden, signifikante Unterschiede zur Vergleichsgruppe (p<0,05) werden zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben, NC MW = Mittelwert für die Patienten mit Nierenzellkarzinom, GP MW = Mittelwert für die gesunden Probanden, Stabw = Standardabweichung, Diff. = Differenz der Mittelwerte.

Die folgende Abbildung zeigt die signifikanten Konzentrationsunterschiede der hier untersuchten Substanzen bei Patienten mit Nierenzellkarzinom im Vergleich mit gesunden Probanden.

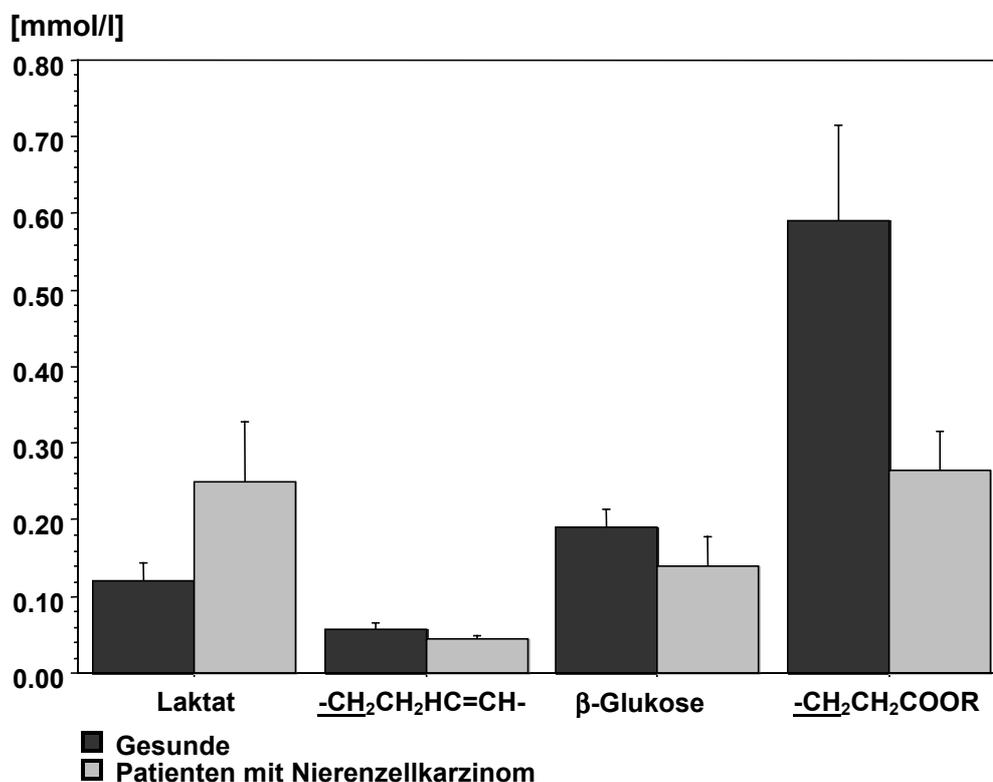


Abbildung 29 Konzentrationsunterschiede der hier untersuchten Substanzen bei Patienten mit Nierenzellkarzinom im Vergleich mit gesunden Probanden.

Die Patienten mit Nierenzellkarzinom zeigen im Vergleich mit den gesunden Probanden signifikant niedrigere Konzentrationen für Bestandteile von Fettsäuren, die sich CH_2 -Gruppen von $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{COOR}$ und $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{HC=CH-}$ (Peak 8 und 9) zuordnen lassen. Für die anderen Bestandteile der Fettsäuren und auch für den Teil, der sich VLDL und LDL, sowie Cholesterin aus HDL zuordnen läßt, zeigen die Patienten im Mittel niedrigere Werte als die gesunden Probanden. Die Unterschiede sind allerdings nicht signifikant. Die Konzentration an freiem Glycerin liegt bei den Patienten ebenfalls niedriger als bei den Probanden. Die Konzentration an Cholin dagegen, ist für die Patienten sogar höher als für die Probanden, wenn auch nicht signifikant höher. Die Konzentration an β -

Glukose ist für die Patienten mit Nierenzellkarzinom niedriger als die für gesunde Probanden, eine Veränderung, die signifikant ist. Der Wert für die α -Glukose liegt für die Patienten ebenfalls niedriger als bei den Probanden, eine Veränderung, die nicht signifikant ist. Ein weiterer signifikanter Unterschied ist dagegen die höhere Konzentration an Laktat im Blutplasma der Patienten im Vergleich mit den Probanden. Auch die Werte für Albumin (zusammen mit Lysin) liegen unter denen der gesunden Probanden, wenn auch nicht signifikant niedriger. Glukose, Laktat und Albumin wurden untersucht, um einen Hinweis auf die Nierenfunktion zu geben. Hohe Glukose- und Laktatwerte können, ebenso wie ein Albuminmangel einen Hinweis auf eine gestörte Nierenfunktion liefern, ein Umstand, der sich auch auf den Lipidhaushalt auswirken kann. Die im Nierenzellkarzinomgewebe gefundene Erniedrigung der Konzentration an Alanin und Valin gegenüber gesundem Nierengewebe kann im Blutplasma von Patienten nicht gefunden werden. Die Konzentration an Valin sind für Patienten und Probanden gleich, der Wert für Alanin liegt allerdings für die Patienten deutlich unter dem der Probanden. Ein Wert, der für die Patienten mit Nierenzellkarzinomen über dem Wert für die gesunden Probanden liegt, ist die Konzentration an Glykoproteinen. Für die Standardabweichungen der Konzentrationen zeigen die Patienten prozentual höhere Werte als die gesunden Probanden. Die Werte sind zum Teil sehr hoch, was bei den Patienten mit der geringen Patientenzahl zusammenhängen kann, allgemein aber auch durch die Zusammenfassung von Männern und Frauen bedingt sein kann, da schon gesunde Männer und Frauen erhebliche Unterschiede zeigen. Bei einigen Signalen der Spektren ist außerdem eine Anpassung sehr schwierig, da sie sehr klein sind, ein Umstand, der für alle hier ausgewerteten Spektren und damit auch für alle Kollektive gilt.

Obwohl die Patientengruppe nicht sehr groß ist, wurde trotzdem einmal eine Trennung der Kollektive nach Frauen und Männern durchgeführt, wobei, wie erwähnt, keine Aussagen zur Signifikanz der Unterschiede gemacht werden können. Die Mittelwerte für den Vergleich von Frauen und Männern mit Nierenzellkarzinom mit gesunden Frauen und Männern finden sich in der folgenden Tabelle.

Tabelle 19 Mittelwerte für Frauen mit Nierenzellkarzinom (F NC), gesunde Frauen (F), Männer mit Nierenzellkarzinom (M NC) und gesunde Männer (M). Die Mittelwerte werden in mmol/l, bezogen auf die jeweilige CH_n-Gruppe, angegeben.

Peak	Zuordnung	F NC	F	Diff.%	M NC	M	Diff.%
2	<u>C18</u> (-CH ₃) von Cholesterin in HDL	0,0597	0,0651	- 8	0,0321	0,0336	- 5
3	LDL1 → <u>CH</u> ₃ (CH ₂) _n VLDL1 → <u>CH</u> ₃ CH ₂ CH ₂ HC= terminale CH ₃ -Gruppen von Fettsäuren	0,8017	1,0075	- 20	0,8480	0,7622	11
4	- <u>CH</u> ₃ , Valin	0,0078	0,0083	- 7	0,0084	0,0080	5
5	LDL2 → (<u>CH</u> ₂) _n VLDL2 → - <u>CH</u> ₂ CH ₂ COOR	2,0578	3,1574	- 35	2,1397	1,8528	15
6	- <u>CH</u> ₃ , Laktat	0,2211	0,1096	102	0,2708	0,1343	102
7	- <u>CH</u> ₃ , Alanin	0,0086	0,0125	- 31	0,0123	0,0162	- 24
8	- <u>CH</u> ₂ CH ₂ COOR	0,3262	0,6636	- 51	0,2135	0,5085	- 58
9	- <u>CH</u> ₂ CH ₂ HC=CH-	0,0442	0,0577	- 23	0,0440	0,0577	- 24
10	- <u>CH</u> ₂ HC=CH-	0,6218	0,8739	- 29	0,6445	0,6347	2
11	-NHCO <u>CH</u> ₃ gehören beide zu Acetyl- signalen von α ₁ -aciden Glykoproteinen	0,0976	0,0672	45	0,0643	0,0563	14
12		0,0228	0,0136	67	0,0108	0,0094	15
13	- <u>CH</u> ₂ COOR	0,1559	0,2128	- 27	0,1933	0,1915	1
14	-HC=CH <u>CH</u> ₂ HC=CH-	0,2066	0,2856	- 28	0,1375	0,1223	12
15	ε- <u>CH</u> ₂ -, Albumin und Lysin	0,1331	0,1590	- 16	0,0986	0,1494	- 34
16	-N ⁺ (<u>CH</u> ₃) ₃ Gruppen verschiedener cholinartig. Moleküle in Lipoproteinen	0,0664	0,0885	- 25	0,1150	0,0771	49
17	H2, β-Glukose	0,1811	0,2087	- 13	0,1052	0,1718	- 39
18	- <u>CH</u> ₂ , (freies) Glycerin	0,0332	0,0475	- 30	0,0418	0,0333	25
19	= <u>CH</u> COOR, Glycerylgruppen von Lipiden	0,0140	0,0479	- 71	0,0028	0,0020	42
20	anomeres H1, α-Glukose	0,0729	0,0764	- 5	0,0346	0,0585	- 41
21	CH-Gruppen ungesättigter Fettsäuren in Lipiden, -CH= <u>CH</u> CH ₂ <u>CH</u> =CH- und = <u>CH</u> CH ₂ CH ₂ -	0,7377	1,0624	- 31	0,6598	0,6655	- 1

nicht gesondert beschriftete Gruppen gehören zu Bestandteilen von Fettsäuren aus Lipiden, Diff. = Differenz der Mittelwerte.

Vergleicht man die Mittelwerte der Konzentrationen der verschiedenen Substanzen für Frauen mit Nierenzellkarzinom mit denen gesunder Frauen, so zeigen die Frauen mit Nierenzellkarzinomen niedrigere Werte für alle Bestandteile von Fettsäuren, die hier ausgewertet wurden. Die Werte für Cholin, Glycerin, Glukose und Albumin sind für die Patientinnen ebenfalls niedriger als für die Probanden. Nur die Konzentrationen an Laktat und der Glykoproteine sind bei den Patientinnen höher. Die größten Abweichungen der

Lipidbestandteile zwischen Patientinnen und Probanden lassen sich bei VLDL2+LDL2, bei $-\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2\text{COOR}$ und für die Glycerylgruppen ausmachen. Bei den Männern mit Nierenzellkarzinom läßt sich keine generelle Erniedrigung für die Konzentrationen ausmachen, die zu den Lipidbestandteilen gehören. Die Werte für VLDL1+LDL1, VLDL2+LDL2, $-\text{HC}=\text{CH}\underline{\text{CH}}_2\text{HC}=\text{CH}-$ liegen für Patienten höher als für Probanden, ebenso die Konzentrationen an Cholin, Glycerin und der Glycerylgruppen von Lipiden. Die anderen Bestandteile von Lipiden zeigen für Patienten und Probanden ähnliche Werte oder liegen für die Patienten unterhalb der Werte von Probanden. Die größten (negativen) Abweichungen der Lipidbestandteile zwischen beiden Gruppen finden sich bei $-\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2\text{COOR}$ und $-\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2\text{HC}=\text{CH}-$. Der Wert für Laktat und Glykoproteine liegen für die männlichen Patienten, wie bei den weiblichen Patienten auch, über den Werten der gesunden Probanden, die für Albumin und Glukose erhaltenen Werte unterhalb der Werte für die gesunden Probanden. Zu beachten ist bei dem Vergleich, daß die Männer mit Nierenzellkarzinom doch erheblich älter sind als die gesunden Probanden. Hier müssen noch weitere Auswertungen erfolgen.

Bei einem Vergleich der Frauen mit Nierenzellkarzinom mit Männern mit Nierenzellkarzinom lassen sich keine eindeutigen Trends ermitteln. Im Durchschnitt zeigen die Frauen etwas höhere Werte für die Bestandteile von Lipiden. Die größten Abweichungen finden sich bei Glycerylgruppen von Lipiden.

Für eine Abschätzung des Einflusses des Tumorstadiums und der Präsenz von Metastasen auf die Konzentrationen der hier bestimmten Substanzen im Blutplasma können nur vier Patienten verglichen werden. Trotzdem sollen ihre Werte in der folgenden Tabelle angegeben und anschließend erläutert werden.

Tabelle 20 Konzentrationen der aus $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ermittelten Werte für Patienten mit Nierenzellkarzinom in unterschiedlichen Tumorstadien. Zur Einteilungen der Tumorstadien, siehe Kap. 2.3. Die Werte werden in mmol/l, bezogen auf die jeweilige CH_n -Gruppe, angegeben.

Peak	Zuordnung	T2,N0	T2,N1	T3,N0	T3,N1	Diff. %	Diff. %	Diff. %
						T2,N0 T3,N0	T2,N0 T2,N1	T3,N0 T3,N1
2	<u>C18</u> (-CH ₃) von Cholesterin in HDL	0,0261	0,0662	0,0462	0,0363	- 44	- 61	27
3	LDL1 → <u>CH</u> ₃ (CH ₂) _n VLDL1 → <u>CH</u> ₃ CH ₂ CH ₂ HC= terminale CH ₃ -Gruppen von Fettsäur.	1,6824	0,9189	0,9267	0,7045	82	83	32
4	- <u>CH</u> ₃ , Valin	0,0051	0,0051	0,0121	0,0095	- 58	1	27
5	LDL2 → (<u>CH</u> ₂) _n VLDL2 → - <u>CH</u> ₂ CH ₂ COOR	2,4658	1,8040	3,3831	1,6529	- 27	37	105
6	- <u>CH</u> ₃ , Laktat	0,1032	0,0450	0,2413	0,1831	- 57	129	32
7	- <u>CH</u> ₃ , Alanin	0,0093	0,0059	0,0137	0,0049	- 32	57	181
8	- <u>CH</u> ₂ CH ₂ COOR	0,1904	0,4478	0,2846	0,2624	- 33	- 57	8
9	- <u>CH</u> ₂ CH ₂ HC=CH-	0,0481	0,0456	0,0585	0,0356	- 18	5	64
10	- <u>CH</u> ₂ HC=CH-	0,7715	0,8430	0,7990	0,5771	- 3	- 8	38
11	-NHCO <u>CH</u> ₃ gehören beide zu Acetyl- signalen von α_1 -aciden Glykoprotein.	0,0901	0,0684	0,0423	0,0968	113	32	- 56
12		0,0153	0,0049	0,0069	0,0259	121	211	- 73
13	- <u>CH</u> ₂ COOR	0,2814	0,2505	0,2911	0,0723	- 3	12	303
14	-HC=CH <u>CH</u> ₂ HC=CH-	0,1376	0,1676	0,1894	0,2550	- 27	- 18	- 26
15	ϵ - <u>CH</u> ₂ -, Albumin und Lysin	0,0768	0,1754	0,1838	0,1220	- 58	- 56	51
16	-N ⁺ (<u>CH</u> ₃) ₃ Gruppen verschiedener cholinhaltiger Moleküle in Lipoproteinen	0,3453	0,0720	0,0755	0,0509	357	380	48
17	H2, β -Glukose	0,1241	0,1572	0,1150	0,1654	8	- 21	- 30
18	- <u>CH</u> ₂ , (freies) Glycerin	0,0241	0,0254	0,0317	0,0278	- 24	- 5	14
19	= <u>CH</u> COOR, Glycerylgr. von Lipiden	0,0015	0,0038	0,0037	0,0034	- 60	- 61	7
20	anomeres H1, α -Glukose	0,0460	0,0921	0,0443	0,0574	4	- 50	- 23
21	CH-Gruppen ungesättigter Fettsäuren in Lipiden, -CH= <u>CH</u> CH ₂ <u>CH</u> =CH- und = <u>CH</u> CH ₂ CH ₂ -	0,5575	0,7089	1,0810	0,5320	- 48	- 21	103

nicht gesondert beschriftete Gruppen gehören zu Bestandteilen von Fettsäuren aus Lipiden, Diff. = Differenz der Werte.

Einfluß des Tumorstadiums

Ein Patient mit einem Tumor der Tumorklassifikation T2, M0 (zur Tumorklassifikation siehe Kapitel zum Nierenzellkarzinom im $^{31}\text{P-NMR}$ -spektroskopischen Teil) zeigt im Vergleich zu einem Patienten mit einem Tumor der Klassifikation T3, M0 niedrigere

Konzentrationen für die Fettsäureketten aus Lipiden für alle hier detektierten Substanzen, außer bei VLDL1 und LDL1, sowie Cholin. Diese beiden Gruppen, Cholin (+ 357 %) und VLDL1+LDL1 (+82 %), zeigen auch die größten Unterschiede in den Werten zwischen diesen Patienten. Die Werte für Laktat sind bei dem Patienten mit dem kleineren Tumor niedriger als bei dem Patienten mit dem größeren Tumor. Die Werte für Glukose liegen im gleichen Bereich, die Werte für die Glykoproteine liegen höher als bei dem Patienten mit dem größeren Tumor, die Werte für Albumin niedriger. Die Konzentrationen an Alanin und Valin liegen für den Patienten mit dem kleinen Tumor unter denen des Patienten mit dem größeren Tumor.

Einfluß von Metastasen

Ein Patient mit einem Tumor im Tumorstadium T3, M0 zeigt im Vergleich mit einem Patienten mit einem Tumor der Tumorklassifikation T3, M1 (beide männlichen Geschlechts) höhere Konzentrationen für alle Substanzen, die sich Lipiden zuordnen ließen, d. h. sowohl für die zu Fettsäureketten gehörenden, wie auch die dem Glycerin und dem Cholin zuzuordnenden (einzige Ausnahme Peak 14). Die größte Konzentrationsdifferenz für die Lipidbestandteile läßt sich bei $-\underline{\text{CH}}_2\text{COOR}$ (Peak 13) ausmachen (+303 %), gefolgt von VLDL2+LDL2 (+105 %) und CH-Gruppen aus ungesättigten Fettsäuren. Die Werte für Glukose liegen beide bei dem Patienten mit dem Tumorstadium T3, M0 deutlich unter den Werten des Patienten (-30 und -23 %) mit dem Tumor im Tumorstadium T3, M1. Die Werte für Albumin und die für Laktat liegen für den Patienten ohne Metastasen höher als für den Patienten mit Metastasen. Auch die Werte für Alanin und Valin lagen bei diesem Patienten deutlich höher, ebenso die Konzentration an Glykoproteinen. Bei einem Vergleich von zwei Patienten mit Tumoren des Tumorstadiums T2, von denen der eine keine Metastasen zeigt, der andere aber doch, lassen sich nicht so eindeutige Beziehungen herstellen. Nicht alle Konzentrationen von Substanzen, die zu den Lipiden gehören sind für den Patienten mit Metastasen niedriger. Nur die Konzentrationen für VLDL1+LDL1, VLDL2+LDL2, $-\underline{\text{CH}}_2\text{CH}_2\text{HC}=\text{CH}-$, $-\underline{\text{CH}}_2\text{COOR}$ und Cholin liegen für den Patienten ohne Metastasen über dem Wert des Patienten mit Metastasen. Der Wert für Glukose ist bei dem Patienten ohne Metastasen niedriger als bei dem mit Metastasen, der Wert für Laktat allerdings deutlich höher. Der Wert für Albumin ist für den Patienten ohne Metastasen niedriger, die Konzentration an Glykoproteinen höher. Die Konzentration an Alanin liegt ebenfalls über der des Patienten mit Metastasen, während sich der Wert für Valin nicht unterscheidet. Das bei diesem

Vergleich nicht so eindeutige Ergebnisse wie für die Patienten mit Tumorstadium T3 erhalten werden konnten, könnte daran liegen, daß die Patienten mit dem Tumorstadium T2 unterschiedlichen Geschlechts waren. Um genauere Aussagen über Zusammenhänge zwischen Konzentrationen an Lipidbestandteilen im Blutplasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom und dem Tumorstadium der Patienten, sowie dem Vorhandensein von Metastasen machen zu können, sind also noch weitere Untersuchungen nötig.

Ein altersabhängiger Vergleich der Werte für Patienten mit Nierenzellkarzinomen kann hier nicht durchgeführt werden, da es keine jüngeren Patienten im Kollektiv gab.

2.4.2 Zu den Patienten mit Ovarialkarzinomen

Für diese Untersuchung wurden die Plasmaspektren von acht Frauen mit Ovarialkarzinom (Durchschnittsalter 56 Jahre) aufgenommen und ausgewertet und mit Werten von acht gesunden Frauen (Durchschnittsalter 43 Jahre) verglichen. Für einen Vergleich der Werte vor und kurz nach der Operation wurden von zwei Patientinnen ^1H -Spektren von Plasma aufgenommen, welches kurz nach der Operation abgenommen wurde. Zunächst sollen jedoch die Ergebnisse die Vergleichs der Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit gesunden Probanden vorgestellt werden. Die folgende Tabelle zeigt die Mittelwerte, Standardabweichungen und Differenz der Konzentrationen, der hier ausgewerteten Substanzen, sowie die p-Werte für die Vergleich der beiden Kollektive. Da hier eine Vielzahl von signifikanten Unterschieden besteht, wird auf eine Abbildung verzichtet.

Tabelle 21 Mittelwerte, Standardabweichungen (Stabw) und p-Werte für Patientinnen mit Ovarialkarzinom und gesunde Probanden. Mittelwerte und Standardabweichungen werden in mmol/l, bezogen auf die jeweilige CH_n -Gruppe, angegeben.

Peak	Zuordnung	OVMW	Stabw	GPMW	Stabw	Diff. %	p-Wert
2	<u>C18</u> (- CH_3) von Cholesterin in HDL	0,0210	0,0101	0,0651	0,0264	- 68	0,0006
3	LDL1 → <u>CH_3</u> (CH_2) _n VLDL1 → <u>CH_3</u> $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{HC=}$ terminale CH_3 -Gruppen von Fettsäuren	0,5313	0,1369	1,0075	0,1615	- 47	2×10^{-5}
4	- <u>CH_3</u> , Valin	0,0056	0,0017	0,0083	0,0020	- 32	0,0309
5	LDL2 → (<u>CH_2</u>) _n VLDL2 → - <u>CH_2</u> CH_2COOR	1,3962	0,4608	3,1574	0,7675	- 56	0,0001
6	- <u>CH_3</u> , Laktat	0,1216	0,0908	0,1096	0,0302	11	0,8030
7	- <u>CH_3</u> , Alanin	0,0086	0,0037	0,0125	0,0024	- 31	0,0417
8	- <u>CH_2</u> CH_2COOR	0,1432	0,0662	0,6636	0,2528	- 78	0,0001
9	- <u>CH_2</u> $\text{CH}_2\text{HC=CH-}$	0,0303	0,0145	0,0577	0,0183	- 48	0,0050
10	- <u>CH_2</u> HC=CH-	0,4808	0,1245	0,8739	0,2694	- 45	0,0022
11	- <u>NHCOCH_3</u> gehören beide zu Acetyl- signalen von α_1 -aciden Glykoproteinen	0,0417	0,0139	0,0672	0,0227	- 38	0,0167
12		0,0073	0,0040	0,0136	0,0057	- 46	0,0219
13	- <u>CH_2</u> COOR	0,1389	0,0723	0,2128	0,0884	- 35	0,0887
14	- <u>$\text{HC=CHCH}_2\text{HC=CH-}$</u>	0,0895	0,0330	0,2856	0,0628	- 69	2×10^{-6}
15	ϵ - <u>CH_2</u> -, Albumin und Lysin	0,0754	0,0446	0,1590	0,0608	- 53	0,0073
16	- <u>$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$</u> Gruppen verschiedener cholinhaltiger Moleküle in Lipo- proteinen	0,0418	0,0158	0,0885	0,0187	- 53	0,0001
17	H2, β -Glukose	0,1486	0,0321	0,2087	0,0482	- 29	0,0109
18	- <u>CH_2</u> , (freies) Glycerin	0,0308	0,0093	0,0475	0,0104	- 35	0,0140
19	= <u>CHCOOR</u> , Glycerylgruppen von Lipiden	0,0023	0,0009	0,0479	0,0219	- 95	0,0268
20	anomeres H1, α -Glukose	0,0486	0,0213	0,0764	0,0170	- 36	0,0119
21	CH-Gruppen ungesättigter Fettsäuren in Lipiden, - <u>$\text{CH=CHCH}_2\text{CH=CH-}$</u> und = <u>$\text{CHCH}_2\text{CH}_2$</u> -	0,4906	0,1283	1,0624	0,2600	- 54	0,0001

nicht gesondert beschriftete Gruppen gehören zu Bestandteilen von Fettsäuren aus Lipiden, signifikante Unterschiede zur Vergleichsgruppe ($p < 0,05$) werden zusätzlich durch Fettdruck hervorgehoben, OV MW = Mittelwert für die Patientinnen mit Ovarialkarzinom, GP MW = Mittelwert für die gesunden Probandinnen, Stabw = Standardabweichung, Diff. = Differenz der Mittelwerte.

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, zeigen die Patientinnen mit Ovarialkarzinom für alle hier ausgewerteten Substanzen, bis auf Laktat, niedrigere Konzentrationen im Vergleich mit den gesunden Probanden. Bis auf die Unterschiede bei CH_2 COOR und Laktat sind

alle diese Konzentrationsunterschiede signifikant. Dieses Bild paßt zu dem, was schon bei der Auswertung der Phospholipide beobachtet werden konnte. Die Standardabweichungen sind für die Gesunden kleiner als für die Patientinnen, wobei sich wahrscheinlich auch Unterschiede bezüglich der Tumorklassifikation bei den Patientinnen bemerkbar machen. Der Einfluß des Tumorstadiums soll im nächsten Abschnitt behandelt werden. Die folgende Tabelle zeigt Werte von Patientinnen in unterschiedlichen Tumorstadien, geordnet nach Tumorstadien und der Präsenz von Metastasen.

Tabelle 22 Konzentrationen der aus $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ermittelten Werte für Patientinnen mit Ovarialkarzinom in unterschiedlichen Tumorstadien. Zur Einteilungen der Tumorstadien, siehe Kap. 2.3.3. Die Werte werden in mmol/l, bezogen auf die jeweilige CH_n -Gruppe, angegeben.

Peak	Zuordnung	T2,N0	T3,N0	T3,N1	T4,N0	Diff. % T2,N0 T3,N0	Diff. % T3,N0 T4,N0	Diff. % T3,N0 T3,N1
2	<u>C18</u> (-CH ₃) von Cholesterin in HDL	0,0158	0,0136	0,0262	0,0133	16	2	- 48
3	LDL1 → <u>CH</u> ₃ (CH ₂) _n VLDL1 → <u>CH</u> ₃ CH ₂ CH ₂ HC= terminale CH ₃ -Gruppen von Fettsäur.	0,3430	0,4928	0,4305	0,4590	- 30	7	14
4	- <u>CH</u> ₃ , Valin	0,0063	0,0038	0,0082	0,0049	65	- 21	- 53
5	LDL2 → (<u>CH</u> ₂) _n VLDL2 → - <u>CH</u> ₂ CH ₂ COOR	0,8672	1,4546	1,1478	1,0403	- 40	40	27
6	- <u>CH</u> ₃ , Laktat	0,0546	0,0390	0,0637	0,0903	40	- 57	- 39
7	- <u>CH</u> ₃ , Alanin	0,0073	0,0064	0,0044	0,0113	15	- 44	44
8	- <u>CH</u> ₂ CH ₂ COOR	0,0996	0,0318	0,1685	0,2602	213	- 88	- 81
9	- <u>CH</u> ₂ CH ₂ HC=CH-	0,0177	0,0168	0,0254	0,0602	5	- 72	- 34
10	- <u>CH</u> ₂ HC=CH-	0,4084	0,4351	0,3428	0,5028	- 6	- 13	27
11	-NHCO <u>CH</u> ₃ gehören beide zu Acetyl- signalen von α_1 -aciden Glykoprotein.	0,0348	0,0348	0,0582	0,0470	- 0,04	- 26	- 40
12		0,0048	0,0054	0,0144	0,0039	- 11	39	- 62
13	- <u>CH</u> ₂ COOR	0,1113	0,1648	0,0480	0,2759	- 32	- 40	243
14	-HC=CH <u>CH</u> ₂ HC=CH-	0,0762	0,0667	0,1047	0,0948	14	- 30	- 36
15	ϵ - <u>CH</u> ₂ -, Albumin und Lysin	0,0700	0,0254	0,0776	0,0076	175	233	- 67
16	-N ⁺ (<u>CH</u> ₃) ₃ Gruppen verschiedener cholinhaltiger Moleküle in Lipoproteinen	0,0301	0,0351	0,0508	0,0284	- 14	24	- 31
17	H2, β -Glukose	0,1778	0,1489	0,1566	0,1630	19	- 9	- 5
18	- <u>CH</u> ₂ , (freies) Glycerin	0,0237	0,0353	0,0186	0,0355	- 33	- 0,4	90
19	= <u>CH</u> COOR, Glycerylgr. von Lipiden	0,0029	0,0027	0,0027	0,0025	10	7	- 1
20	anomeres H1, α -Glukose	0,0633	0,0496	0,0360	0,0715	28	- 31	38
21	CH-Gruppen ungesättigter Fettsäuren in Lipiden, -CH= <u>CH</u> CH ₂ <u>CH</u> =CH- und = <u>CH</u> CH ₂ CH ₂ -	0,4692	0,5374	0,4170	0,3293	- 13	63	29

nicht gesondert beschriftete Gruppen gehören zu Bestandteilen von Fettsäuren aus Lipiden, Diff. = Differenz der Werte.

Einfluß des Tumorstadiums

Für eine Aussage zum Einfluß des Tumorstadiums stehen nur drei Patientinnen zur Verfügung, von denen die eine einen Tumor der Klassifikation T2, M0, eine einen Tumor der Klassifikation T3, M0 und eine einen Tumor der Klassifikation T4, M0 aufweist (zur

Tumorklassifikation beim Ovarialkarzinom siehe Ergebnisse der ^{31}P -NMR-spektroskopischen Messungen). Die Patientin mit dem Tumor der Klassifikation T3, M0 hat gegenüber der Patientin mit dem Tumor der Klassifikation T4, M0 höhere Werte für die Bestandteile der Fettsäuren, die sich HDL, VLDL1+LDL1, VLDL2+LDL2, Cholin und Glycerylgruppen von Lipiden, sowie CH-Gruppen aus ungesättigten Fettsäuren zuordnen lassen. Für alle anderen Substanzen, die sich Bestandteilen von Fettsäuren zuordnen lassen und ausgewertet wurden zeigt die Patientin mit dem größeren Tumor die höheren Werte. Die Werte für andere Substanzen, wie Glukose und die Aminosäuren liegen bei der Patientin mit dem größeren Tumor (T4) ebenfalls über der mit dem kleineren Tumor (T3). Nur bei Albumin zeigt sich eine höhere Konzentration für die Patientin mit dem kleineren Tumor. Vergleicht man diese Patientin jetzt wiederum mit der Patientin mit dem Tumorstadium T2, M0, so zeigt die Patientin mit dem kleineren Tumor insgesamt höhere Lipidwerte als die Patientin mit dem größeren Tumor. Die Ausnahme bilden VLDL1+LDL1 und VLDL2+LDL2, $-\text{CH}_2\text{HC}=\text{CH}-$, Cholin, Glycerin, CH-Gruppen ungesättigter Fettsäuren und die Konzentration der CH_2 -Gruppen, die $-\text{CH}_2\text{COOR}$ zuzuordnen sind, wobei die Werte für $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOR}$ für die Patientin mit dem kleineren Tumor wiederum viel höher sind. Die Patientin mit dem kleineren Tumor zeigt außerdem höhere Konzentrationen an Glukose und Albumin.

Einfluß von Metastasen

Hier wurden nur Patientinnen mit einem Tumorstadium T3 mit und ohne zusätzliche Metastasen miteinander verglichen, da die andere Gruppe (T4) nur jeweils eine Patientin mit und ohne Metastasen enthält und beide sehr unterschiedlich alt sind (siehe Phosphorkapitel), wodurch der Einfluß des Alters den der Krankheit überdeckt. Im Vergleich mit Patientinnen mit Metastasen zeigt die Patientin ohne Metastasen höhere Werte für viele Bestandteile (allerdings nicht alle) der Lipide. Die Differenzen zwischen beiden Kollektiven sind bei den Lipidbestandteilen am höchsten für die die Patientin ohne Metastasen höhere Werte zeigt. Die Werte für Glukose, Laktat, die Glykoproteine, Alanin, Valin und Albumin (mit Lysin) sind aber für die Patientinnen mit Metastasen höher als für die Patientin ohne Metastasen. Sowohl für einen Vergleich der Patientinnen in verschiedenen Tumorstadien, wie auch für Patientinnen mit und ohne Metastasen müssen noch weitere Patientinnen untersucht werden.

Vergleich der Patientinnen vor und kurz nach der Operation

Für die zwei Patientinnen, denen vor und kurz nach der Operation Blut abgenommen wurde, zeigen sich unterschiedliche Ergebnisse. Die Werte der Patientinnen vor und nach der Operation, sowie die Differenzen der Werte werden in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 23 Konzentrationen der aus $^1\text{H-NMR}$ -Spektren ermittelten Werte für zwei Patientinnen mit Ovarialkarzinom vor und nach der Operation. Die Werte werden in mmol/l, bezogen auf die jeweilige CH_n -Gruppe, angegeben.

Peak	Zuordnung	vor <i>OP 1</i>	nach <i>OP 1</i>	vor <i>OP 2</i>	nach <i>OP 2</i>	Diff. 1 % nach vor	Diff. 2 % nach vor
2	<u>C18</u> (-CH ₃) von Cholesterin in HDL	0,0227	0,0099	0,0180	0,0076	- 56	- 58
3	LDL1 → <u>CH</u> ₃ (CH ₂) _n VLDL1 → <u>CH</u> ₃ CH ₂ CH ₂ HC= terminale CH ₃ -Gruppen von Fettsäure.	0,6835	0,9382	0,4941	0,2527	37	- 49
4	- <u>CH</u> ₃ , Valin	0,0051	0,0024	0,0043	0,0015	- 53	- 65
5	LDL2 → (<u>CH</u> ₂) _n VLDL2 → - <u>CH</u> ₂ CH ₂ COOR	1,9813	0,3639	1,4799	1,0460	- 82	- 29
6	- <u>CH</u> ₃ , Laktat	0,1345	0,1007	0,4349	0,2517	- 25	- 42
7	- <u>CH</u> ₃ , Alanin	0,0135	0,0040	0,0256	0,0087	- 71	- 66
8	- <u>CH</u> ₂ CH ₂ COOR	0,1374	0,6549	0,1351	0,2144	377	59
9	- <u>CH</u> ₂ CH ₂ HC=CH-	0,0373	0,0720	0,0314	0,0364	93	16
10	- <u>CH</u> ₂ HC=CH-	0,6399	0,7883	0,4675	0,2471	23	- 47
11	-NHCO <u>CH</u> ₃ gehören beide zu Acetyl- signalen von α_1 -aciden Glykoprotein.	0,0608	0,3067	0,0203	0,0194	404	- 5
12		0,0109	0,0704	0,0042	0,0024	545	- 43
13	- <u>CH</u> ₂ COOR	0,1974	0,4954	0,0911	0,0496	151	- 46
14	-HC=CH <u>CH</u> ₂ HC=CH-	0,0951	0,2094	0,0709	0,0399	120	- 44
15	ϵ - <u>CH</u> ₂ -, Albumin und Lysin	0,1246	0,0348	0,0973	0,0655	- 72	- 33
16	-N ⁺ (<u>CH</u> ₃) ₃ Gruppen verschiedener cholinhaltiger Moleküle in Lipoproteinen	0,0538	0,0717	0,0311	0,0377	33	21
17	H2, β -Glukose	0,1798	0,1535	0,0820	0,0660	- 15	- 20
18	- <u>CH</u> ₂ , (freies) Glycerin	0,0409	0,0076	0,0357	0,0095	- 81	- 73
19	= <u>CH</u> COOR, Glycerylgr. von Lipiden	0,0024	0,0015	0,0001	0,0038	- 37	4010
20	anomeres H1, α -Glukose	0,0574	0,0595	0,0025	0,0231	4	824
21	CH-Gruppen ungesättigter Fettsäuren in Lipiden, -CH= <u>CH</u> CH ₂ <u>CH</u> =CH- und = <u>CH</u> CH ₂ CH ₂ -	0,6013	0,2123	0,4199	0,3391	- 65	- 19

nicht gesondert beschriftete Gruppen gehören zu Bestandteilen von Fettsäuren aus Lipiden, Diff. = Differenz der Werte.

Die eine Patientin (2) weist nach der Operation für alle Substanzen niedrigere Werte auf als vorher, mit Ausnahme von -CH₂CH₂COOR, -CH₂CH₂HC=CH-, Cholin, α -Glukose und der Konzentration an Glycerylgruppen von Lipiden. Die zweite Frau (1) zeigt ebenfalls für einige der hier untersuchten Substanzen eine Erniedrigung, bei ihr sind aber VLDL1+LDL1, -CH₂CH₂COOR, -CH₂CH₂HC=CH-, -CH₂HC=CH-, -CH₂COOR,

-HC=CHCH₂HC=CH-, sowie Cholin, Albumin und die Glykoproteine höher als vor der Operation. Da der Zeitraum zwischen der Abnahme der ersten und zweiten Blutprobe nur wenige Tage beträgt, sollten hier noch Einflüsse der Operation spürbar sein, die sich in einer (vorübergehenden) Verminderung der Lipidwerte äußern können. Um eine mögliche Remission erkennen zu können, muß ein längerer Zeitraum (mehrere Wochen) vergangen sein, bevor erneut eine Blutprobe untersucht werden kann.

Einfluß des Alters

Junge und ältere Patientinnen miteinander zu vergleichen, ist aufgrund der unterschiedlichen Tumorstadien leider nicht möglich. Bei einem paarweisen Vergleich von Patientinnen und Probanden im gleichen Alter lassen sich die gleichen Veränderungen wie für das Gesamtkollektiv finden.

2.5 In-vivo ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchungen von Patienten mit Nierenzellkarzinomen

2.5.1 Allgemeines¹²⁰

Sowohl für die Bildgebung in der Kernspintomographie wie auch für die in-vivo ¹H-NMR-Spektroskopie wird das Verfahren der sogenannten selektive Schichtanregung verwendet. Dies Verfahren soll daher kurz vorgestellt werden. Es wird zunächst dem homogenen Grundfeld ein magnetisches Zusatzfeld mit einer definierten Ortsabhängigkeit, ein sogenanntes Gradientenfeld, überlagert, so daß die Larmorfrequenz des Kernresonanzsignals eine Funktion des Ortes wird. In der Kernspintomographie werden die Gradientenfelder auf zwei unterschiedliche Arten genutzt:

- Für die selektive Anregung der Kernspins in einer definierten Region des Meßobjektes (z. B. einer dünnen Objektschicht) oder
- Für die Ortskodierung innerhalb einer definierten Region des Meßobjektes (z. B. einer Schicht oder eines Volumens).

In diesem Abschnitt ist aber nur die erste der oben aufgezählten Möglichkeiten von Interesse. Um eine bestimmte Körperschicht selektiv anzuregen, wird dem homogenen Grundfeld, wie erwähnt, ein Gradient (Schichtauswahlgradient) senkrecht zur Schichtebene überlagert. Aufgrund dieser Überlagerung variiert die Larmorfrequenz ω der Kerne entlang

der Richtung des Gradienten. Wird z. B. ein Gradientenfeld $B^{z*} = G^z \cdot z$ überlagert, so gilt $\omega(z) = \gamma(B_0 + G^z \cdot z)$, wobei γ das gyromagnetische Verhältnis bezeichnet. Die Objektschicht $z_1 \leq z \leq z_2$ wird demnach durch ein schmales Frequenzintervall $\gamma(B_0 + G^z \cdot z_1) \leq \omega \leq \gamma(B_0 + G^z \cdot z_2)$ charakterisiert. Strahlt man nun einen HF-Puls (Hochfrequenzpuls) ein, dessen Frequenzspektrum mit diesem Frequenzintervall übereinstimmt, so werden nur die Kerne innerhalb der gewünschten Schicht angeregt, ein Verfahren, welches sich im gleichen Maße für die beiden anderen Raumrichtungen anwenden läßt. Die Dicke der Schicht kann über die Bandbreite des HF-Pulses (Breite der Frequenzverteilung) oder die Gradientenstärke G^z verändert werden. Die Lage der Schicht kann verändert werden, indem das Frequenzspektrum des HF-Pulses bei gleicher Bandbreite verschoben wird.

Die hier beschriebene selektive Schichtanregung wird, wie einleitend erwähnt, auch in der in-vivo Spektroskopie benutzt. Das Kernresonanzsignal wird nach Abschalten des Gradienten detektiert. Die selektive Schichtanregung wird in allen drei Raumrichtungen durchgeführt. Eine Pulssequenz, die diese Methode benutzt, wird unter dem Namen PRESS geführt. Die PRESS-Sequenz (PRESS = point-resolved spectroscopy) verwendet eine Carr-Purcell Spin-Echo-Sequenz. Der Vorteil dieser Sequenz liegt darin, daß das gewählte Volumen mit einem Zyklus in allen drei Raumrichtungen präzise definiert werden kann. Der Nachteil dieser Sequenz, wie aller Sequenzen, die die selektive Schichtanregung benutzen, liegt in dem Zeitintervall, welches zwischen Anregung und Detektion erforderlich ist (mindestens 10 msec.), damit die Feldgradienten geschaltet werden können, bzw. die Wirbelströme abklingen. Im in-vivo Bereich bedeutet das, daß bei Metaboliten mit kurzen T_2 -Zeiten ein Signalverlust auftreten kann. Daher werden diese Pulssequenzen in der in-vivo Spektroskopie nur für ^1H -spektroskopische Untersuchungen eingesetzt, in denen T_2 ausreichend groß ist.

Für Substanzen mit kurzen T_2 -Zeiten, wie sie z. B. bei ^{31}P -NMR-Signalen des ATP (Adenosintriphosphat) vorkommen, wird eine andere Methode verwendet. Diese Methode benutzt zur Ortsauswahl keine selektive Anregung, sondern eine selektive Sättigung. Die Bereiche, die nicht untersucht werden sollen erfahren dabei Sättigung. Eine Pulssequenz, in der diese Methode verwendet wird und die bei der ^{31}P -Spektroskopie Anwendung findet, ist die sogenannte ISIS-Sequenz (ISIS = image selected in-vivo spectroscopy).

* B^z ist die Komponente des Zusatzfeldes, dessen Feldvektor in z-Richtung zeigt und dessen Feldstärke linear von der Ortskoordinate z abhängt.

Schichtselektive 180° -Pulse werden in der Volumenpräparationsphase mit zugehörigen Selektionsgradienten geschaltet. Ein Zyklus dieser Sequenz besteht aus 8 Einzelmessungen, bei denen die FIDs nach einem vorgegebenen Schema entweder addiert oder subtrahiert werden. Das aus dem gewählten Volumen stammende Signal erhält man durch Aufsummierung der Einzelmessungen, während sich die aus dem Restvolumen stammenden Signale wegmitteln.

Bisher sind nicht viele in-vivo spektroskopische Untersuchungen zum Nierenzellkarzinom bekannt. Auf eine ^{31}P -NMR-spektroskopische Untersuchung wurde in der Einleitung zum Nierenzellkarzinom hingewiesen, eine weitere Untersuchung wird im folgenden Abschnitt besprochen (s. Ergebnisse der Untersuchungen).

2.5.2 Bedingungen für die Aufnahme der in-vivo ^1H -NMR-Spektren und Ergebnisse der Untersuchungen

Allgemeines

Nachdem die Wahl der Pulssequenz durch die Art der zu untersuchenden Verbindungen vorgegeben ist (PRESS für ^1H und ISIS für ^{31}P) sind außerdem die Wahl der Spule, die Wahl des richtigen Anregungspulses und die Wahl der Methode zur Wasserunterdrückung (bei ^1H -spektroskopischen Untersuchungen) zu treffen. In der in-vivo Spektroskopie wird meist mit sogenannten Oberflächenspulen gearbeitet. Der Vorteil gegenüber anderen Spulentypen liegt in dem guten Signal/Rausch-Verhältnis welches sich durch Verwendungen dieser Spulen, die sehr nah am zu untersuchenden Objekt lokalisiert sind, erzielen läßt; ihr Nachteil liegt in der begrenzten Eindringtiefe. Die für die Untersuchungen in dieser Arbeit verwendeten Oberflächenspulen für die ^1H -Spektroskopie haben allerdings einen weiteren Vorteil, mit diesen Spulen können sowohl Bildgebung wie auch Spektroskopie durchgeführt werden, wodurch eine gute Kontrolle der Lage der VOI (volumes of interest) möglich ist.

Für die Auswahl des richtigen Anregungspulses ist es wichtig zu wissen, daß bei Rechteckpulsen der Pulswinkel bei konstanter Pulsamplitude in der Regel durch die Wahl der Pulslänge eingestellt wird. Da der resultierende Pulswinkel aber gleichzeitig eine Funktion der Hochfrequenzfeldstärke ist, ändert er sich bei Oberflächenspulen mit der Entfernung von der Spule. Frequenzmodulierte adiabatische Pulse zeichnen sich dagegen dadurch aus, daß der Pulswinkel auch in inhomogenen HF-Feldern genau eingestellt werden kann. Gerade in Verbindung mit Oberflächenspulen können durch Verwendung

fequenzmodulierter Pulse in einem weiten Bereich optimale Pulswinkel erreicht werden¹²⁰.

Für die Wasserunterdrückung in der in-vivo Spektroskopie bieten sich vor allem zwei Methoden an: Die erste ist die sogenannte Inversionsmethode. Sie folgt der inversion recovery Methode, wobei der Delay so eingestellt wird, daß die Aquisition startet, wenn die Inversion der Magnetisierung für Wasser gerade durch Null geht. Dabei hängen die optimalen Werte, wie bei der folgenden Methode auch, von der Echo-Zeit der Pulssequenz ab. Für die Wasserunterdrückung mit Hilfe einer selektiven Anregung des Wassersignals, gefolgt von einer selektiven Zerstörung der Magnetisierung für das Wassersignal mittels eines sogenannten „Crusher“-Gradienten, muß der Winkel des Anregungspulses genau bestimmt werden. Nach dem Anregungspuls wird die Magnetisierung dann mit Hilfe des Crusher-Gradienten zerstört. Da diese Gradienten eine endliche Länge haben, kann die Magnetisierung für das Wasser wieder zunehmen, bevor die eigentliche Pulssequenz startet. Der optimale Anregungswinkel ist daher etwas größer als 90°. Der Winkel sollte für jedes Experiment neu bestimmt werden, um eine optimale Wasserunterdrückung zu erzielen. Allerdings gelingt dies bei beweglichen Objekten, wie z. B. der Niere, nicht immer in zufriedenstellendem Maße.

Spektroskopie, Wahl der Aufnahmeparameter

Bevor die in-vivo Spektroskopie durchgeführt werden konnte, wurden Bilder der zu untersuchenden, vom Nierenzellkarzinom betroffenen, bzw. bei gesunden Probanden von gesunden Nieren in verschiedenen Schnittebenen aufgenommen. Die folgende Abbildung zeigt zwei dieser Bilder, anhand derer sich das Volumen für die in-vivo Spektroskopie definieren läßt. Es handelt sich hier um sogenannte T₁-gewichtete Bilder, d. h. Fett stellt sich im Bild heller dar, Wasser (aus Blut) dunkler. Tumorgewebe ist oftmals gut durchblutetes Gewebe, wie auch auf diesen Bildern zu erkennen.

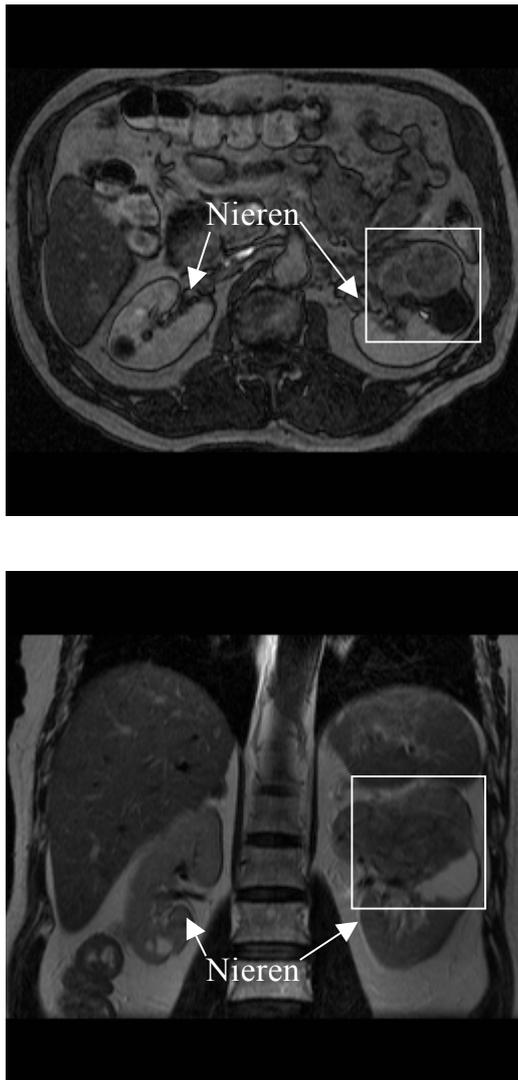


Abbildung 30 Darstellung eines Nierenzellkarzinoms mit Hilfe der Kernspintomographie. Die weißen Rechtecke markieren den Tumor.

Die Bilder wurden atemgetriggert aufgenommen. Das bedeutet, daß die Pulssequenz abgestimmt auf den Atemrhythmus des Patienten/Probanden gestartet wird (z. B. immer während des Ausatmens). Dazu erhält der Patient/Proband einen sogenannten Atemgurt. Der Vorteil dieses Verfahrens liegt darin, daß sich die Niere, die sich während der Atmung bewegt, immer in der gleichen Position befindet, so daß keine Bewegungsartefakte entstehen. Es wäre wünschenswert, auch die Spektroskopie atemgetriggert durchführen zu können, allerdings gibt für das hier verwendete Gerät hierzu noch keine entsprechenden Programme. Um die Veränderung der Lage der Niere während des Atmens zu ermitteln wurden bei mehreren Probanden Bilder aufgenommen, wobei der Proband einmal einatmen und die Luft anhalten und ausatmen und die Luft anhalten mußte. Die Lage der Niere veränderte sich um ca. 2 cm. Die Bilder wurden mit

Bildern verglichen die, nicht atemgetriggert, während normaler Atmung aufgenommen wurden. Dabei zeigte sich, daß die Lage der Niere beim Ausatmen etwa der Mittellage entspricht und bei einem entsprechenden Volumen (s. u.) kein Artefakte durch Beteiligung umliegender Gewebe oder gesundem statt Tumorgewebe entstehen sollten, wenn der Patient/Proband nicht zu heftig einatmete. Die Aufnahme der Bilder erfolgte unter Verwendung der Spule, die auch für die anschließende ^1H -Spektroskopie benutzt wurde. Es handelt sich dabei um eine Ringspule mit einem Durchmesser von 18 cm. Der Patient/Proband lag mit dem Rücken auf der Spule, da der Abstand zu den Nieren so am kleinsten ist. Das Zentrum der Spule wurde in den Bereich des Tumors, bzw. eines ausgewählten Bereiches bei gesunden Probanden gelegt. Die Lage der Spule konnte anhand der Bilder kontrolliert werden. Lag die Spule nicht im richtigen Bereich, so wurde die betreffende Niere nicht vollständig abgebildet, bzw. einige Bereiche zeigten nicht den nötigen Kontrast im Bild. Der Abstand von Spulenzentrum zum Tumor, bzw. ausgewählten Bereich betrug zwischen 5,6 und 8,1 cm. Zur weiteren Vorbereitung auf die ^1H -spektroskopischen Messungen wurde ein Volumen (VOI, Volume of interest) ausgewählt (Größe 30x30x30 mm), welches im Bereich des Tumors, bzw. des ausgewählten gesunden Bereiches lag. Bei der Auswahl des Volumens ist sehr darauf zu achten, daß bei Patienten nicht gesundes Nierengewebe oder bei Patienten und Probanden gar das die Niere umgebende Fettgewebe angeschnitten wird, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen würde. Der Tumor mußte also die Größe des Volumens plus eines Sicherheitsabstandes aufgrund der Nierenbewegung während der Atmung besitzen. Die Größe des VOI wurde als Kompromiß zwischen der durchschnittlichen Größe der Nierenzellkarzinome der hier untersuchten Patienten und des mit zunehmender Größe besseren Signal/Rausch-Verhältnisses gewählt. Zur Vorbereitung auf die Messung wurde anschließend (nach dem shimmern*) der Pulswinkel für die Wasserunterdrückung (selektive Anregung, s. o.) bestimmt. Durchgeführt wurden die Messungen in einem 1,5 T Ganzkörpermographen (Gyroscan ACS, Phillips, Best, Niederlande).

Die Aquisitionsparameter wurden, soweit nicht anders angegeben wie folgt gewählt: Aufgenommen wurden die Spektren in einem Gyroscan ACS der Firma Phillips bei einer Meßfrequenz von 63,89 MHz. Die Spektrenweite beträgt 2000 Hz, die TD 1024, die Repetitionszeit 2 sec. Die Echozeit TE beträgt 25 msec. Die Meßfrequenz wird auf das

* Erzeugung eines möglichst homogenen Magnetfeldes in der Probe unter Verwendung schwacher zusätzlicher Magnetfelder.

Wassersignal gesetzt. Für ein Spektrum werden 256 FIDs summiert. Vor jeder Aufnahme wird neu geschimmt und der Pulswinkel für die Wasserunterdrückung neu bestimmt. Die Aufnahmezeit für ein Spektrum beträgt 9 min. Prozessiert werden die Spektren an einem PC zunächst unter Verwendung des Programmes NMR 99. Dieses Programm ist nötig, um die Spektren in ein Format zu bringen mit dem sie anschließend in dem Programm WIN-NMR 5.1 der Firma Bruker Analytische Meßtechnik GmbH weiterbearbeitet werden können. Allerdings läßt es sich nicht für PERCH verwenden. Daher wurden die Flächen der Signale hier mit Hilfe von iterativer Dekonvolution unter Verwendung von WIN-NMR 5.1 bestimmt (siehe auch Experimenteller Teil). Die chemischen Verschiebungen werden auf eine chemische Verschiebung von 4,75 ppm für das Wassersignal kalibriert.

Spektroskopie, Zuordnung und Ergebnisse der Untersuchungen

Es wurden Spektren von 8 Patienten mit Nierenzellkarzinom (7m, 1w) aufgenommen und mit denen 9 gesunder Probanden (7m, 2w) verglichen. Für einen Vergleich der Nierenzellkarzinome mit anderen Veränderungen in der Niere wurden zusätzlich Spektren von drei weiteren Patienten aufgenommen, von denen einer einen Niereninfarkt erlitten hatte, einer an einer Nierentuberkulose litt und einer eine noch ungeklärte Nierenveränderung zeigte.

Die folgende Abbildung zeigt zwei in-vivo ^1H -Spektren, wobei das obere mit einer Echozeit von 25 msec., das untere mit einer Echozeit von 250 msec. aufgenommen wurde. Die Zuordnung der Signale erfolgte nach Literaturdaten^{116,121,122}.

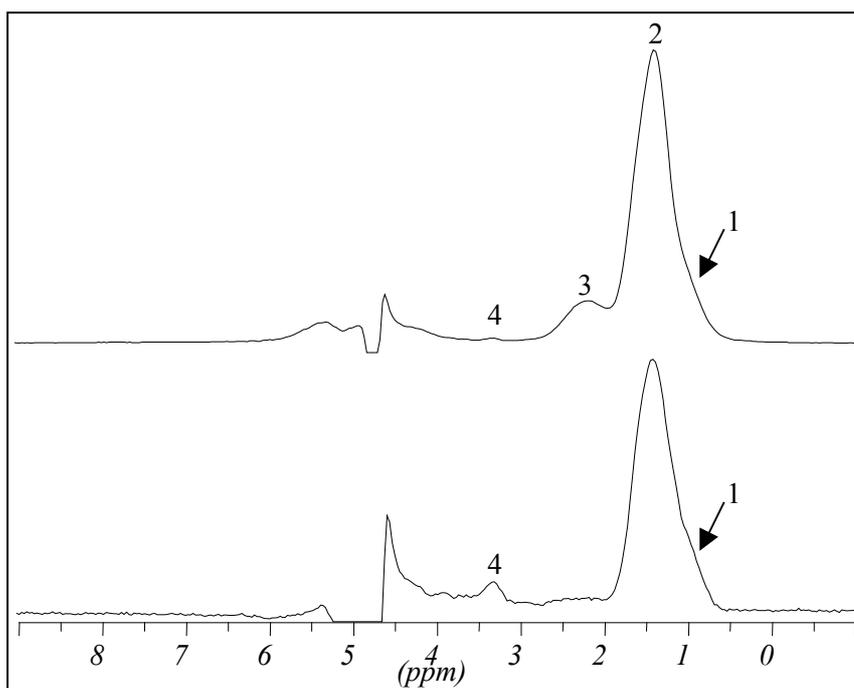


Abbildung 31 In-vivo ^1H -NMR-Spektrum des gleichen Bereiches einer Niere unter Verwendung einer Echozeit von 25 msec. (oben) und einer Echozeit von 250 msec. (unten). Die Spektren wurden beide auf gleiche Signalfläche für Peak 2 normiert. Zuordnungen der Signale, siehe folgende Tabelle.

Es lassen sich folgende Signale zuordnen:

Tabelle 24 Chemische Verschiebung (in ppm) und Zuordnung der in Abbildung 31 aufgeführten Signale. Die Zuordnung erfolgt von hohem zu tiefem Feld.

Peak	chemische Verschiebung (ppm)	Zuordnung
1	0,95	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ terminale CH_3 -Gruppen von Fettsäuren aus Lipiden
2	1,40	$(\text{CH}_2)_n$ CH_2 -Gruppen von Fettsäuren aus Lipiden
3	2,10	$-\text{CH}_2\text{HC}=\text{CH}-$ CH_2 -Gruppen von ungesättigten Fettsäuren aus Lipiden
4	3,30	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Gruppe verschiedener, cholinhaltiger Verbindungen

Peak 1 ist in einigen Spektren getrennt, meist aber nur als Schulter des größeren Signals bei 1,40 ppm zu erkennen. Außer den in der obigen Tabelle aufgeführten kann bei einigen Spektren noch ein Peak bei 2,88 ppm zugeordnet werden, der ebenfalls zu ungesättigten

Fettsäureresten aus Lipiden gehört. Da dieser Peak aber nicht in allen Spektren zu detektieren ist, wurde er hier nicht mit ausgewertet. Die Signallagen können um bis zu $\pm 0,4$ ppm abweichen. Es kann nicht zwischen Nierenrinde und Nierenmark unterschieden werden.

Bei dem Vergleich der Spektren, die mit einer Echozeit von 25 msec. und einer Echozeit von 250 msec. aufgenommen wurden (siehe obige Abbildung, normiert auf die Fläche von Peak 2) kann man erkennen, daß die Lipidsignale, die eine kurze T_2 -Zeit besitzen, in Spektren mit einer langen Echozeit unterdrückt werden, wodurch Signale mit einer längeren T_2 -Zeit, wie z. B. Cholin, stärker betont werden. Da die Fragestellung in dieser Untersuchung aber die Lipide betrifft, wurden im folgenden Spektren mit einer kurzen Echozeit von 25 msec. zur Auswertung ausgewählt. Die Echozeit wurde als Kompromiß zwischen der bei längerer Echozeit besseren Wasserunterdrückung und der möglichst geringen Verfälschung der Signalintensitäten der Lipidsignale gewählt. Eine kürzere Echozeit zeigte keine weitere Signalerhöhung, längere Echozeiten bis 50 msec. zeigten ebenfalls keine Veränderung der Signalintensitäten. Spektren, die bei einer Echozeit von 25 msec. aufgenommen wurden, zeigten maximale Intensitäten für die Lipidsignale bei guter Wasserunterdrückung.

In der folgenden Abbildung sind das Spektrum des Tumorgewebes in der Niere eines Patienten mit Nierenzellkarzinom (oben) und des Nierengewebes eines gesunden Probanden (unten), beide aufgenommen mit einer Echozeit von 25 msec in einem Volumen von 30x30x30 mm, dargestellt.

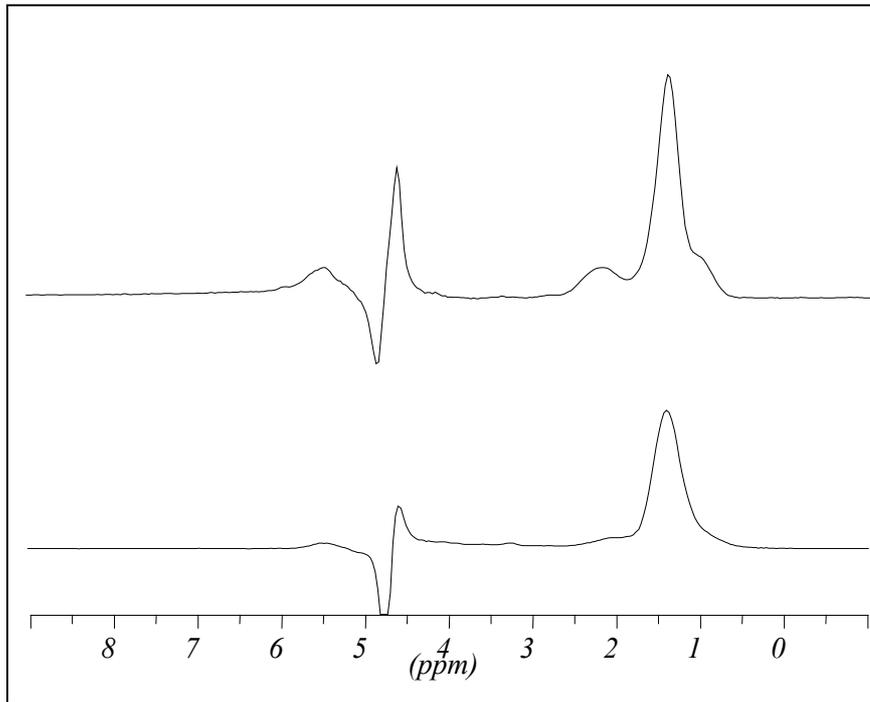


Abbildung 32 Spektrum eines Patienten mit Nierenzellkarzinom (oben) und eines gesunden Probanden (unten), aufgenommen mit einer Echozeit von 25 msec. in einem Volumen von 30x30x30 mm. Die Signale entsprechen denen, die in Abbildung 31 zugeordnet wurden.

Da bei der hier benutzten Technik der in-vivo Spektroskopie kein Standard zugesetzt werden kann und damit keine quantitativen Konzentrationsangaben gemacht werden können, werden für einen Vergleich von Patienten und Probanden die aus den Spektren ermittelten Signalflächen im Verhältnis zur Fläche des größten Signals (Peak 2) miteinander verglichen. Die Verhältnisse der Signalflächen werden in der folgenden Tabelle angegeben. Neben den Werten für Patienten mit Nierenzellkarzinom und gesunden Probanden werden noch die Werte für die Patienten mit anderen Nierenerkrankungen, wie Niereninfarkt, Nierentuberkulose und der unklaren Nierenveränderung angegeben.

Tabelle 25 Aufgeführt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der Verhältnisses der Signalfächen, ermittelt aus den Spektren für Patienten mit Nierenzellkarzinom und gesunden Probanden, im Verhältnis zum größten Signal (Peak 2). Außerdem werden die Werte für Patienten mit anderen Nierenerkrankungen aufgeführt.

Kollektiv	Peak 1 zu 2	Peak 3 zu 2	Peak 4 zu 2
Patienten mit Nierenzellkarzinom	0,203 ±0,068	0,136 ±0,040	0,0083 ±0,0008
gesunde Probanden	0,144 ±0,081	0,095 ±0,036	0,0530 ±0,0046
Patient mit Niereninfarkt	0,121	0,143	0,0140
Patient mit Nierentuberkulose	0,184	0,133	0,0062
Patient mit unklarer Nierenveränderung	0,158	0,129	0,0045

Es läßt sich aus Spektren von Tumorgewebe von Patienten mit Nierenzellkarzinom ein höherer Wert für das Verhältnis der terminalen CH₃-Gruppen (Peak 1) von Fettsäuren zu CH₂-Gruppen von Fettsäuren (Peak 2) im Vergleich mit gesundem Nierengewebe gesunder Probanden ermitteln. Für das Verhältnis von CH₂-Gruppen aus ungesättigten Fettsäuren (Peak 3) zu CH₂-Gruppen allgemein zeigen die Patienten im Tumorgewebe ebenfalls höhere Werte. Der Wert für das Verhältnis der cholinhaltigen Verbindungen (Peak 4) zu CH₂-Gruppen von Fettsäuren (Peak 2) ist bei den Patienten dagegen kleiner als bei den gesunden Probanden. Die könnte allerdings auch an dem höheren Lipidgehalt des Tumorgewebes liegen. Eine Unterscheidung zwischen Männern und Frauen ist aufgrund der geringen Anzahl an Patientinnen und Probandinnen nicht möglich.

Bei einem Vergleich von gesundem und kranken Gewebe innerhalb eines Patienten lassen sich die oben beschriebenen Ergebnisse ebenfalls finden, wie auch die folgende Abbildung zeigt. Aus Spektren von gesundem Nierengewebe werden niedrigere Werte für die Quotienten der Peaks, die zu Lipiden gehören (Peak 1/Peak 2 Krank: 0,273, Gesund: 0,221 und Peak 3/Peak 2 Krank: 0,126, Gesund: 0,122) ermittelt als aus Spektren von Tumorgewebe. Der Wert des Quotienten für das Verhältnis der cholinhaltigen Substanzen (Peak 4) zu CH₂-Gruppen von Fettsäuren (Peak 2) ist bei dem gesunden Nierengewebe höher (Krank: 0,0008, Gesund: 0,0275).

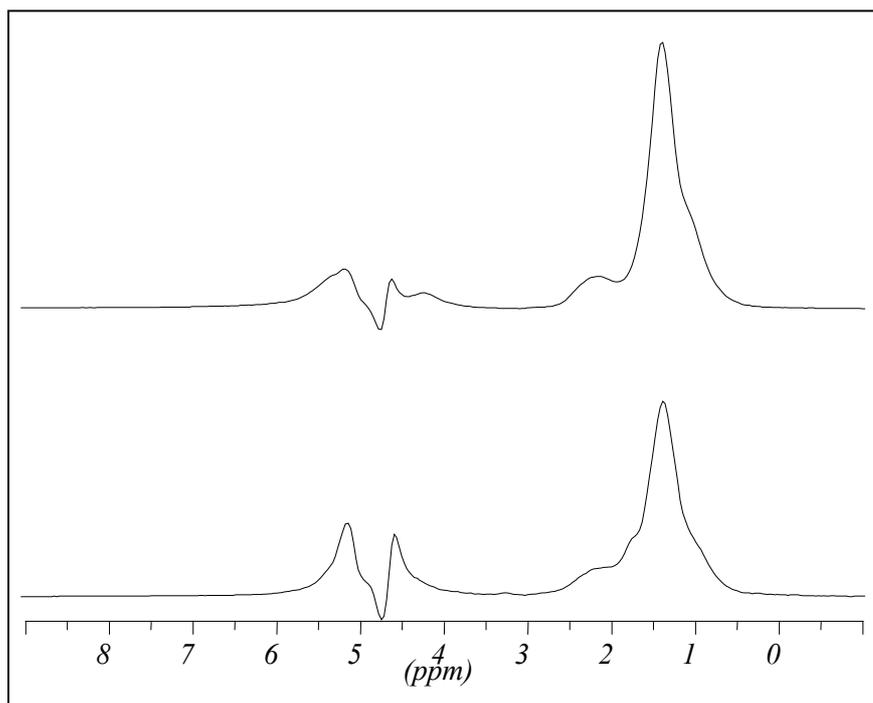


Abbildung 33 Spektren eines Patienten mit Nierenzellkarzinom. Das obere Spektrum wurde vom Tumorgewebe, das untere Spektrum von gesundem Gewebe der betroffenen Niere (durch Bilder eindeutig zuzuordnen) bei einer Echozeit von 25 msec. in einem Volumen von 30x30x30 mm aufgenommen. Die Signale entsprechen denen, die in Abbildung 31 zugeordnet wurden.

Vergleicht man die Spektren des Nierengewebes eines Patienten mit einem Niereninfarkt, eines Patienten mit einer Nierentuberkulose, eines Patienten mit einer unklaren Nierenveränderung mit Spektren von Tumorgewebe von Patienten mit Nierenzellkarzinomen, so läßt sich aus dem Spektrum des Patienten mit dem Niereninfarkt einen höherer Wert für das Verhältnis von CH_2 -Gruppen von ungesättigten Fettsäuren (Peak 3) zu CH_2 -Gruppen von Fettsäuren allgemein (Peak 2) ermitteln, während für das Verhältnis von CH_3 -Gruppen von Fettsäuren (Peak 1) zu CH_2 -Gruppen von Fettsäuren (Peak 2) ein kleinerer Quotient im Vergleich zu dem aus den Spektren von Patienten mit Nierenzellkarzinom ermittelten gefunden wird. Der Quotient der cholinhaltigen Verbindungen (Peak 4) zu CH_2 -Gruppen von Fettsäuren (Peak 2) ist für den Patienten mit Niereninfarkt höher. Aus dem Nierengewebsspektrum des Patienten mit Nierentuberkulose läßt sich im Vergleich zu Tumorspektren von Patienten mit Nierenzellkarzinom ein Quotient für das Verhältnis der CH_2 -Gruppen ungesättigter Fettsäuren zu CH_2 -Gruppen allgemein ermitteln, der nur wenig niedriger als der aus den Tumorspektren ermittelte ist. Der Wert für das Verhältnis der CH_3 -Gruppen zu CH_2 -Gruppen von Fettsäuren ist bei dem Patienten mit der Nierentuberkulose niedriger als bei

Patienten mit Nierenzellkarzinom. Der Wert für den Quotienten cholinhaltiger Verbindungen zu CH_2 -Gruppen von Fettsäuren ist kleiner als bei Patienten mit Nierenzellkarzinom. Aus dem Spektrum des Nierengewebes des Patienten mit der unklaren Nierenveränderung lassen sich niedrigere Werte für alle hier untersuchten Quotienten ermitteln, wenn man die Werte mit denen vergleicht, die aus Spektren von Patienten mit Nierenzellkarzinom erhalten werden können.

2.6 Diskussion

Der besondere Vorteil der quantitativen Bestimmung von Phospholipid- und Lipidkonzentrationen liegt in der Möglichkeit, beobachtete Veränderungen in Zusammenhang mit biochemischen Stoffwechselprozessen stellen zu können. Änderungen des Phospholipid- und Lipidgehalts im Blutplasma können unterschiedliche Ursachen haben. Bei Gesunden, ebenso wie bei Patienten mit Krebserkrankungen, spielen neben dem Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme auch Faktoren wie Alter und Geschlecht eine Rolle. Um sicherzustellen, daß ermittelte Unterschiede im Lipid- bzw. Phospholipidgehalt des Blutplasmas zwischen Kranken und Gesunden nicht durch andere Faktoren als die Erkrankung beeinflußt wurden, wurde eine genaue Vorauswahl der Patienten und Probanden (s. Kap. 2.2.5) getroffen und zunächst das Kollektiv der Gesunden NMR-spektroskopisch untersucht. Zuerst werden hier die, mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie erhaltenen Ergebnisse diskutiert, anschließend die mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie erhaltenen.

Gesunde

Aus der Untersuchung eines Kollektivs gesunder Probanden unterschiedlichen Alters wurde die Notwendigkeit deutlich, einem Patientenkollektiv ein Probandenkollektiv mit ähnlichem Durchschnittsalter gegenüber zu stellen. Literaturbekannt^{13,123,124} ist die Abhängigkeit der Konzentrationen von Phospholipiden im Blutplasma vom Alter und bei jüngeren Probanden auch vom Geschlecht. Die Einnahme von Ovulationshemmern (Pille) hat keinen signifikanten Einfluß auf die Phospholipidkonzentrationen. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Mit den in der Literatur benutzten Methoden der Elektrophorese und Immundiffusion wurde allerdings nicht zwischen einzelnen Phospholipidklassen unterschieden, sondern nur der Gesamtgehalt an Phospholipiden betrachtet. Dies zeigt die Verlässlichkeit der hier verwendeten Methode

der NMR-Spektroskopie, die gegenüber den in der Literatur verwendeten Methoden den Vorteil bietet, daß die Vorbereitung der Proben für die Messung sehr viel weniger aufwendig ist und in einem einzigen Spektrum qualitative und quantitative Informationen über alle hier untersuchten Phosphorverbindungen enthalten sind.

Mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie wurden ebenfalls gesunde Probanden untersucht. Hier wurden nur die Konzentrationen der Lipidbestandteile im Blutplasma eines älteren Probandenkollektiv bezüglich geschlechtsspezifischer Unterschiede untersucht. Dabei zeigte sich, daß der Gesamtanteil an Fettsäuren in VLDL und LDL im Blutplasma der Männern niedriger war als bei den Frauen, ebenso wie der Gehalt an Cholesterin in HDL. Auch für Ausgangs- und Abbauprodukte von Lipiden zeigten die Männer niedrigere Konzentrationen gegenüber den Frauen. Dies paßt aber eher zu dem, was in der Literatur für jüngere Probanden beschrieben wurde, bei älteren Probanden zeigen Männer und Frauen laut Literaturangaben keine wesentlichen Unterschiede mehr¹²³. Für eine abschließende Beurteilung dieser Differenz zu den Literaturdaten sollte hier noch ein größeres Probandenkollektiv untersucht werden.

Patienten

Aus Gründen der Übersichtlichkeit der Darstellungen sollen im folgenden die Ergebnisse der ^{31}P - und ^1H -NMR-spektroskopischen Bestimmung der Phospholipidkonzentrationen bzw. Konzentrationen der Lipidbestandteile im Blutplasma unterteilt nach Karzinomarten diskutiert werden. Anschließend folgt eine Diskussion der Ergebnisse der in-vivo ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen an Patienten mit Nierenzellkarzinomen im Vergleich mit gesunden Probanden. Die dabei zum Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse herangezogenen Studien basieren, soweit nicht anders angegeben, nicht auf NMR-spektroskopischen Untersuchungen.

Patienten mit Nierenzellkarzinom

Bei Patienten mit Nierenzellkarzinom konnten signifikant niedrigere Phospholipidkonzentrationen der Phospholipidklassen LPC1 und LPC2, sowie PC (bei Frauen) im Blutplasma von Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden. Diese Veränderungen konnten ebenso bei einer Patientin mit einem Urothelkarzinom im Nierenbecken und einer Patientin mit Metastasen in der Niere, die von einem Bronchialkarzinom stammten, gefunden werden. Das Ausmaß der Erniedrigung an

LPC1+2 korrelierte sowohl mit dem Tumorstadium als auch dem Vorhandensein von Metastasen. Dieser extreme Abfall der Konzentration an LPC im Blutplasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom kann verschiedene Ursachen haben. Eine Möglichkeit ist die Veränderung von Enzymaktivitäten im Blutplasma. Zwei Enzyme im Blutplasma sind in der Lage aus Phosphatidylcholin Lysophosphatidylcholin zu machen und eine Hemmung dieser Enzyme würde zu einer niedrigeren Konzentration an Lysophosphatidylcholin und eventuell einer höheren Konzentration an Phosphatidylcholin führen. Das eine Enzym ist das sogenannte LCAT (Lecithin:Cholesterin Acyltransferase), welches die Übertragung einer Acylgruppe des Phosphatidylcholins (auch Lecithin genannt) auf Cholesterin unter der Bildung eines Cholesterinesters und Lysophosphatidylcholin katalysiert. Das zweite Enzym ist die Phospholipase A₂ (s. auch Anhang S.169), welches die Abspaltung der Acylgruppen von Phospholipiden katalysiert, wodurch neben Fettsäuren die entsprechenden Lysophospholipide entstehen.

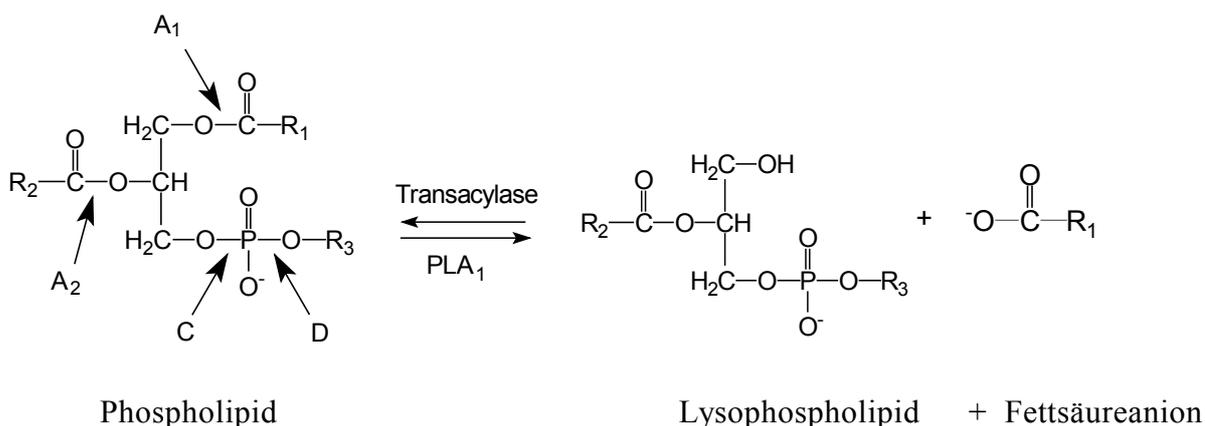


Abbildung 34 Abbau von Phospholipiden durch Phospholipasen.

Die Nummer A₂ der Phospholipase A₂ gibt an, daß sie die Abspaltung in Position zwei katalysiert, wodurch aus PC LPC1 entsteht. Die Phospholipase A₂ katalysiert nur die Entstehung von LPC1, LPC2 entsteht durch die Katalyse der Phospholipase A₁. Es konnten keine Literaturdaten zu einer verminderten Aktivität der Phospholipase A₁ bei Krebspatienten gefunden werden. Über die Konzentrationen der Phospholipase A₂ im Blutplasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom ist bisher nur eine Untersuchung bekannt. Leider können die Autoren dieser Studie nichts über die Aktivität der Phospholipase A₂ bei unbehandelten Patienten aussagen, da die Patienten vor ihrer Behandlung mit Interleukin-2 schon mit Interferon- γ behandelt wurden und vor ihrer Behandlung mit Interleukin-2 schon eine höhere Phospholipase A₂-Aktivität gegenüber

gesunden Probanden aufwiesen, die auf die Vorbehandlung zurückgeführt wurde¹²⁵. Eine Studie, die sich mit der Aktivität von LCAT im Blutplasma von Patienten mit Nierenzellkarzinomen beschäftigt konnte nicht gefunden werden. Zur Differenzierung der beobachteten Veränderungen von denen die bei einer Nierenfunktionsstörung auftreten, ist auch der Vergleich zu entsprechenden Literaturdaten angebracht. Zu Patienten mit Nierenfunktionsstörungen wurden mehrere Studien durchgeführt. So wurde bei Patienten mit Urämie* zwar eine Verminderung der Aktivität von LCAT (LPC↓)¹²⁶, aber gleichzeitig eine Erhöhung der Phospholipase A₂-Aktivität (LPC↑)¹²⁷ nachgewiesen. Widersprüchliche Ergebnisse zeigen auch Studien, die sich mit Veränderungen der Phospholipidkonzentration im Blutplasma von Patienten mit Nierenversagen (noch nicht im finalen Stadium), chronischem Nierenversagen und Urämie (im Vergleich mit gesunden Probanden) beschäftigen. Bleiber et al.¹²⁸ konnten einen Anstieg aller Phospholipide, außer Phosphatidylserin nachweisen, Gillet et al.¹²⁶ fanden eine Erniedrigung der Konzentration an PC, Vecino et al.¹²⁷ ermittelten für Patienten und Probanden ähnliche Konzentrationen an LPC aber einen Anstieg für PC, wohingegen Kalofoutis et al.¹²⁹ einen Anstieg an SM, PE und CL, aber einen niedrigeren Wert für PI ausmachte. Bei Patienten mit sogenannten nephrotischem Syndrom† sind ebenfalls Veränderungen in der Plasmaaktivität von LCAT zu finden. Subbaiah et al.¹³⁰ fanden einen Anstieg der LCAT-Aktivität im Plasma von Patienten mit nephrotischem Syndrom, ebenso wie Breier et al.¹³¹, die zusätzlich noch eine Erhöhung des Gesamtgehaltes an Phospholipiden nachweisen konnten. Eine Untersuchung der Enzymaktivitäten im Blutplasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom wäre also eine sinnvolle Ergänzung zu den hier vorgestellten Untersuchungen. Aus den oben aufgeführten Untersuchungen läßt sich aber schlußfolgern, daß die Veränderungen in der Phospholipidkonzentration bei Patienten mit Nierenzellkarzinom nicht einfach mit einer Nierenschädigung zu erklären sind.

Bei Frauen mit Nierenzellkarzinom konnten zusätzlich zu dem veränderten Gehalt an LPC1 und LPC2 im Blutplasma noch eine signifikante Abnahme der Konzentration an Phosphatidylcholin nachgewiesen werden. Dabei ist der Unterschied zu den männlichen Kollektiven so groß, daß die höhere Konzentration an PC bei gesunden Frauen gegenüber

* terminale Niereninsuffizienz, d. h. die Niere stellt endgültig ihre Leistung ein.

† Sammelbegriff für eine Vielzahl von Nierenkrankheiten, die aber alle die gleichen Symptome zeigen (z. B. Ausscheidung großer Mengen Proteine mit dem Urin).

gesunden Männern in eine niedrigere Konzentration an PC bei kranken Frauen gegenüber kranken Männern verkehrt wird. Phosphatdiylcholin ist eine der Hauptkomponenten in Zellmembranen. Eine erhöhte Wachstumsrate von Zellen, wie sie Tumorzellen aufweisen, könnte aufgrund eines vermehrten Bedarfs an Phosphatidylcholin zu einer Erniedrigung der Konzentration dieses Phospholipids im Blutplasma führen.

Die Konzentration an Phospholipiden insgesamt war für die Patienten signifikant niedriger als für die gesunden Probanden. Dies ist eine Beobachtung, wie sie allgemein bei Patienten mit Krebserkrankungen gemacht werden kann^{13,43}, da, wie erwähnt, eine erhöhte Wachstumsrate der Krebszellen einen erhöhten Bedarf an Phospholipiden hervorruft.

Neben der oben beschriebenen Abgrenzung gegenüber Nierenfunktionsstörungen, zeigen auch die in dieser Arbeit vorgestellten ersten Vergleiche mit gutartigen Tumoren der Niere, daß die Veränderungen der Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma bei Patienten mit Nierenzellkarzinom für das Auftreten von Krebs in der Niere charakteristisch sind. Eine Patientin mit einem gutartigen Nierentumor zeigte höhere Konzentrationen in allen Phospholipidklassen im Vergleich mit gesunden Probanden. Der Wiederanstieg der Konzentrationen an LPC1+2 (und PC bei Frauen) bei einer Remission der Krankheit zeigt, daß die hier beobachteten systemischen Veränderungen im Phospholipidstoffwechsel, verursacht durch den Tumor, reversibel sind, wenn kein Tumor mehr nachweisbar ist.

Für den Vergleich der Konzentration an Lipidbestandteilen im Blutplasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom im Vergleich mit gesunden Probanden, welche mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt wurden, zeigten die Patienten signifikant niedrigere Konzentrationen für Bestandteile von Fettsäuren, die sich CH₂-Gruppen von -CH₂CH₂COOR und -CH₂CH₂HC=CH- zuordnen ließen. Außerdem wiesen die Patienten gegenüber den Probanden signifikant höhere Werte für Laktat auf. Der Gesamtgehalt an Fettsäuren aus VLDL und LDL war bei den Patienten nicht signifikant verändert, ebenso wie die Konzentration an Cholesterin in HDL, lag bei ihnen aber im Mittel unter den Werten der gesunden Probanden. Die Konzentration an Cholin dagegen war für die Patienten höher als für die Probanden, wenn auch nicht signifikant höher. Zu Patienten mit Nierenzellkarzinom gibt es bisher keine Untersuchung, was den Fettsäuregehalt und den Gehalt an Lipoproteinen im Blutplasma betrifft. Patienten mit nephrotischem

Syndrom* zeigen eine Erhöhung an Cholesterin, VLDL, LDL und Triacylglycerinen, also Fettsäuren enthaltenden Molekülen im Blutplasma¹³¹. Daher läßt sich auch hier schlußfolgern, daß die Veränderungen in den Konzentrationen an Lipidbestandteilen im Blutplasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom nicht einfach mit einer Nierenschädigung zu erklären sind. Für das Tumorgewebe der Nierenzellkarzinome selbst lassen sich, NMR-spektroskopisch, gegenüber gesundem Nierengewebe ein erhöhter Cholesterin- und Cholesterinestergehalt, Fettsäuregehalt⁶⁹ und Triacylglyceringehalt^{8,68} ausmachen. Diese Akkumulierung im Tumor könnte, aufgrund des höheren Bedarfes an Lipiden dieses Tumors, zu einer generellen Erniedrigung der Lipidbestandteile im Blutplasma führen.

Der erhöhte Laktatwert bei Patienten mit Nierenzellkarzinom könnte ein Anzeichen für eine Nierenfunktionsstörung sein. Allerdings darf der Aussagewert des Laktates nicht überbewertet werden, da der Laktatgehalt im Blut stark vom Zeitpunkt der Probenentnahme abhängt. Nach sportlichen Aktivitäten, z. B. finden sich erhöhte Laktatwerte im Blut.

Der höhere Wert an Cholin bei Patienten mit Nierenzellkarzinom gegenüber gesunden Probanden könnte auf einen höheren Anteil an Ausgangsstoffen und Abbauprodukten (Phosphorylcholin, Glycerophosphorylcholin) des Phospholipidstoffwechsels, bedingt durch einen erhöhten Stoffwechsel des Tumors, zurückzuführen sein. Das bei Patienten mit Nierenzellkarzinom die Konzentrationen an LPC1 und LPC2 im Blutplasma erniedrigt sind, muß nicht zwangsläufig auch zu niedrigeren Cholinwerten führen, da auch andere Verbindungen Cholin (s. o.) enthalten können.

Patienten mit Dickdarmkarzinom

Für Patienten mit Dickdarmkarzinom konnten signifikant niedrigere Werte für Phosphatidylcholin und die Gesamtsumme an Phospholipiden im Vergleich mit gesunden Probanden ermittelt werden. Für LPC1 und LPC1+2 zeigten die Patienten höhere Mittelwerte als die gesunden Probanden. Diese Veränderung war allerdings nicht signifikant. Eine Unterteilung nach Geschlecht, Tumorstadium und Vorhandensein von Metastasen war aufgrund der geringen Patientenzahl nicht möglich.

* siehe vorhergehende Fußnote

Einen Hinweis darauf, warum Patienten mit Dickdarmkarzinom niedrigere Konzentrationen an PC und etwas erhöhte Werte für LPC aufweisen, könnte eine Untersuchung geben, in der Tumorgewebe von Patienten mit Dickdarmkarzinom untersucht und die Ergebnisse mit Untersuchungen von gesundem Darmgewebe verglichen wurden¹³². Im Tumorgewebe ließ sich eine höhere Aktivität der Phospholipase A₂ (katalysiert die Abspaltung des Fettsäurerestes in Position zwei, wodurch aus PC LPC1 entsteht, siehe Abbildung 34, S. 132) nachweisen, was eventuell zu einer Verringerung der Konzentration an PC und einer Erhöhung der Konzentration an LPC1 führen würde. Diese Änderung könnte sich dann auch im Blutplasma widerspiegeln. Eine Untersuchung zur Enzymaktivität im Blutplasma selbst konnte nicht gefunden werden. In einer Studie, durchgeführt mit Hilfe NMR-spektroskopischer Methoden, konnten niedrigere Werte an Phosphorylcholin im Tumorgewebe (im Vergleich mit gesundem Gewebe) und eine Erhöhung an Glycerophosphorylcholin gefunden werden¹³³. Phosphorylcholin ist eine Auf- und Abbauprodukt von LPC und PC, Glycerophosphorylcholin ein Abbauprodukt von LPC und PC. Beides, die Verminderung der Ausgangssubstanz Phosphorylcholin und die Erhöhung des Abbauproduktes Glycerophosphorylcholin könnten also zu einer Verringerung, sowohl für LPC wie auch für PC im Tumorgewebe führen, es sei denn, PC würde dann noch, mit Hilfe der Phospholipase A₂ in LPC1 umgewandelt. Eine weitere NMR-spektroskopische Untersuchung zeigt allerdings eine Erhöhung von Phosphorylcholin im Tumorgewebe von Patienten mit Dickdarmkarzinom, was auf eine erhöhte Syntheserate oder einen vermehrten Abbau zurückzuführen sein kann, da Phosphorylcholin ja wie erwähnt bei beidem eine Rolle spielt¹³⁴. Eine dritte, NMR-spektroskopisch durchgeführte, Untersuchung zeigte höhere Werte für LPC und niedrigere Werte für SM im Tumorgewebe der Patienten mit Dickdarmkarzinom¹³⁵. Die im Blutplasma gefundenen Veränderungen spiegeln also eventuell die veränderten Verhältnisse im Tumor selbst wieder.

Es gibt bisher erst eine Studie, die sich mit dem Phospholipidgehalt im Blutplasma von Patienten mit Dickdarmkarzinom beschäftigt. Die Forscher dieser Studie kamen zu dem Ergebnis, daß im Blutplasma für Patienten mit Dickdarmkarzinom, ebenso wie bei Patienten mit Nierenzellkarzinom, niedrigere Werte für LPC (keine Konzentrationsangaben) beobachtet werden können und ansonsten keine Veränderungen zu finden sind¹⁸. Die Zahl der Patienten war allerdings kleiner als in dieser Arbeit. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß beide Tumorarten unterschiedliche

Veränderungen in der Konzentration der Phospholipide hervorrufen, bei Dickdarmkarzinompatienten fanden wir sogar einen, allerdings nicht signifikanten, Anstieg der Konzentration an Lysophosphatidylcholin im Blutplasma, neben niedrigeren Konzentrationen an PC und der Gesamtsumme an Phospholipiden. Daß die Konzentration an Phospholipiden insgesamt für die Patienten mit Dickdarmkarzinom signifikant niedriger als für die gesunden Probanden ist ist eine Beobachtung, die schon bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen gemacht wurde und, wie schon erwähnt, auch allgemein bei Patienten mit Krebserkrankungen gemacht werden kann^{13,43}. Eine erhöhte Wachstumsrate der Krebszellen könnte dabei, wie ebenfalls schon erwähnt, einen erhöhten Bedarf an Phospholipiden hervorrufen.

Patientinnen mit Ovarialkarzinom

Bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom fanden sich im Blutplasma, im Vergleich mit gesunden Probanden, signifikant niedrigere Phospholipidkonzentrationen für alle Phospholipidklassen. In der Literatur finden sich verschiedenen Untersuchungen zum Phospholipidgehalt im Blutplasma von Patientinnen mit Ovarialkarzinom. Okita et al. fanden in Plasmaextrakten von Patientinnen mit Ovarialkarzinom eine Erhöhung der Werte für LPC gegenüber gesunden Probanden, während die Konzentration an PC gleich blieb⁹⁸. Die Studie umfaßt 17 Frauen, von denen allerdings neun zum Zeitpunkt der Untersuchung eine Chemotherapie erhielten, was Einfluß auf die Ergebnisse haben mußte. Kriat et al. untersuchten NMR-spektroskopisch Extrakte von Blutplasma von Patientinnen mit Ovarialkarzinom und konnten ebenfalls eine allgemeine Erniedrigung der Konzentration an Phospholipiden nachweisen⁴³. Die von ihnen in den Plasmaextrakten gefunden Phospholipidklassen waren PC, LPC (keine weitere Unterteilung) und SM. Kopsynski et al. untersuchten die Erythrozytenmembran* von Patientinnen mit Ovarialkarzinom und fanden eine veränderte Zusammensetzung derselben¹⁰¹. Die Membran zeigte einen geringeren Anteil an PS, SM, LPC und Phosphatidsäure im Vergleich mit den roten Blutkörperchen gesunder Probanden, während der Anteil von Phosphatidylinositol-4-phosphat und Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat signifikant erhöht war. Sie fanden außerdem, daß die Aktivität der Phospholipase C (spaltet Bindung am Phosphor der Phospholipide) zu 80 % gehemmt war. Eine Verminderung der Aktivität der Phospholipase C im Blutplasma von

* Erythrozyten = rote Blutkörperchen

Patientinnen mit Ovarialkarzinom und der damit verminderte Abbau von Phospholipiden, zusammen mit den niedrigen Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma, könnten darauf hindeuten, daß bei diesem Tumor ein besonders hoher Bedarf an Phospholipiden vorhanden ist, ein schnelles Wachstum könnte dafür die Ursache sein. Daß dieser Tumor große Auswirkungen auch außerhalb seines direkten Umfeldes hat, zeigt die Veränderung der roten Blutkörperchen ebenso wie der von uns gefundene starke Abfall der Phospholipidkonzentrationen.

Für alle Konzentrationen der Bestandteile von Lipiden, die mit Hilfe der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie ermittelt wurden, zeigten die Patientinnen mit Ovarialkarzinom signifikant geringere Konzentrationen im Vergleich mit gesunden Probanden. Zu den Werten für Lipide im Blutplasma von Patientinnen mit Ovarialkarzinom gibt es verschiedene Untersuchungen. Die von uns ermittelte Erniedrigung der Konzentration von Cholesterin in HDL (im Vergleich mit gesunden Probanden) konnte von Gadomska et al.⁹⁹ und Ostroumova et al.¹⁰⁰ ebenfalls nachgewiesen werden. Novikov et al.²⁵ berichten über erniedrigte Werte für das gesamte Cholesterin im Serum von Patienten mit Ovarialkarzinom, allerdings zusammen mit erhöhten Triacylglycerin- und Phospholipidwerten. Bei einem Vergleich von Patientinnen mit gutartigen Ovarialtumoren und gesunden Probanden konnte von diesem Forscherteam dagegen keine signifikante Veränderung in der Lipid- und Phospholipid-Verteilung festgestellt werden. Nach der Operation zeigten die Patientinnen mit Ovarialkarzinom eine weitere Steigerung der Triacylglycerinwerte, während der Phospholipidgehalt sank. Während der Chemotherapie kehrten sich die Verhältnisse um ($\text{TG}\downarrow$, $\text{PL}\uparrow$).

Patientinnen mit Mammakarzinom

Bei Patientinnen mit Mammakarzinom konnte eine signifikante Abnahme der Konzentration an PI, PC und der Gesamtsumme der Phospholipide im Blutplasma gefunden werden. Die Konzentration an PE+SM war gegenüber gesunden Probanden erhöht, allerdings nicht signifikant. Patientinnen mit einem kleineren Tumor (niedrigeres Tumorstadium) zeigten höhere Phospholipidwerte als Patientinnen mit einem größeren Tumor. Über den Einfluß von Metastasen konnten bei diesem Kollektiv keine Aussagen gemacht werden, da nur eine Patientin Metastasen zum Zeitpunkt der Operation aufwies. Bei einer Einteilung der Patientinnen nach dem Alter und Vergleich mit Probanden gleichen Alters, ließen sich die gleichen Ergebnisse herausarbeiten wie für das

Gesamtkollektiv der Patientinnen. Auch zum Mammakarzinom lassen sich in der Literatur Studien finden. Kriat et al.⁴³ untersuchten nicht nur, NMR-spektroskopisch, Patientinnen mit Ovarialkarzinom (bzw. Extrakte ihres Blutplasmas), sondern auch Patientinnen mit Mammakarzinom. Sie fanden dort die gleichen Veränderungen wie beim Ovarialkarzinom auch, nämlich die generelle Erniedrigung der Werte für alle von ihnen untersuchten Phospholipidklassen (SM, LPC, PC). Eine allgemeine Abnahme der Konzentration an Phospholipiden im Serum von Patientinnen mit Mammakarzinom, welche mit dem Auftreten von Metastasen oder einem Wiederauftreten der Krankheit korreliert, fanden auch Kiricuta et al.¹³⁶. Basu¹³⁷ und Bain¹³⁸ fanden dagegen im Plasma von Patientinnen mit Mammakarzinom im Vergleich mit gesunden Probanden einen höhere Konzentration an Phospholipiden. Barzilai et al.¹³⁹ untersuchten, mit Hilfe der ³¹P-NMR-Spektroskopie, Extrakte von bösartigen Brusttumoren im Vergleich mit gutartigen Tumoren und fanden für die malignen Tumore eine Erniedrigung des Verhältnisses an PE/PC. Die Autoren geben allerdings nicht an, ob dies am PE- oder PC-Gehalt der Tumore liegt, weshalb ein Bezug zu den in dieser Arbeit ermittelten Konzentrationsänderungen im Blutplasma nicht so ohne weiteres hergestellt werden kann. Subbaiah et al.¹⁴⁰ fanden im Plasma der Brustkrebspatienten niedrigere Konzentrationen an PC, während die anderen Phospholipide unverändert blieben. Es zeigte sich eine verminderte LCAT-Aktivität (PC→LPC) im Blutplasma der Patientinnen, womit auch die von uns gefundene Verminderung an PC erklärt werden kann.

Außer beim Ovarialkarzinom, wo die Veränderungen eher unspezifisch sind, zeigen alle hier untersuchten Karzinomarten individuelle Veränderungen in der Konzentration der Phospholipide. Andere Krebserkrankungen, wie Schilddrüsenkarzinome oder Leukämie (Blutkrebs) zeigen dagegen andere Konzentrationsänderungen (siehe Kap. 2.1.2). Patienten in Remission mit einem Mangel an Schilddrüsenhormonen wiesen im Vergleich mit gesunden Probanden höhere Werte für PE+SM, PC und PI auf, während Patienten in Remission mit einem Mangel an Schilddrüsenhormonen gegenüber Patienten in Remission aber mit normalen Werten für die Schilddrüsenhormone höhere Werte für PE+SM und PC zeigten³⁴. Bei Patienten mit Leukämie dagegen wurden signifikant niedrigere Werte für PE, SM und PC ermittelt¹⁸. Allerdings können Veränderungen in den Konzentrationen der Phospholipide auch für eine Reihe anderer Krankheiten beobachtet werden. Bei Patienten mit einer chronischen Lebererkrankung z. B. sind die Phospholipide im Plasma ebenfalls reduziert, besonders SM¹⁴¹. Eine erhöhte

Konzentration an PC, verbunden mit einer niedrigeren Konzentration an LPC konnte für Patienten mit chronischer Hepatitis („Entzündung der Leber“) nachgewiesen werden. Der Gesamtgehalt an Phospholipiden war bei den Patienten mit Hepatitis erniedrigt¹⁴². Ein Vergleich der von uns durchgeführten ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen im Blutplasma mit den Untersuchungen anderer Forschergruppen ist schwierig, da dort NMR-spektroskopisch keine Bestandteile von Lipiden untersucht werden. Meist werden, allerdings nicht auf NMR-spektroskopischem Wege, Lipoproteine oder Fettsäuren als Ganzes untersucht.

Patienten mit Nierenzellkarzinom, in-vivo NMR-spektroskopische Untersuchungen

Neben den Untersuchungen am Blutplasma wurden, mit Hilfe der in-vivo ¹H-NMR-Spektroskopie, Untersuchungen von Tumorgewebe in der Niere von Patienten mit Nierenzellkarzinom (im Vergleich mit gesundem Nierengewebe) durchgeführt. Bestimmen ließen sich die Signalflächen von terminalen CH₃-Gruppen von Fettsäuren, von CH₂-Gruppen von Fettsäuren (größtes Signal), von CH₂-Gruppen aus ungesättigten Fettsäuren und der N⁺(CH₃)₃-Gruppe verschiedener, cholinhaltiger Verbindungen. Dabei ließ sich aus Spektren von Tumorgewebe von Patienten mit Nierenzellkarzinom ein höherer Wert für das Verhältnis der terminalen CH₃-Gruppen von Fettsäuren zu CH₂-Gruppen von Fettsäuren im Vergleich mit gesundem Nierengewebe gesunder Probanden ermitteln. Für das Verhältnis von CH₂-Gruppen aus ungesättigten Fettsäuren zu CH₂-Gruppen allgemein zeigten die Patienten im Tumorgewebe ebenfalls höhere Werte. Der Wert für das Verhältnis der cholinhaltigen Verbindungen zu CH₂-Gruppen von Fettsäuren war bei den Patienten dagegen kleiner als bei den gesunden Probanden. Bei einem Vergleich von gesundem und kranken Gewebe innerhalb eines Patienten ließen sich die oben beschriebenen Ergebnisse ebenfalls finden. Bei einem Patienten mit einem Niereninfarkt, einem Patienten mit einer Nierentuberkulose und einem Patienten mit einer unklaren Nierenveränderung zeigten sich andere Werte für die hier ermittelten Quotienten der Signalflächen, d. h. die Veränderungen scheinen charakteristisch für den Tumor zu sein. Die in dieser Arbeit ermittelte Erniedrigung bestimmter Bestandteile von Fettsäuren im Blutplasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom könnte durch den erhöhten Verbrauch durch den Tumor, nachgewiesen mittels in-vivo Spektroskopie hervorgerufen werden. Die für die in-vivo ¹H-NMR-Spektren getroffene Signalzuordnung deckt sich nicht mit der in einer ähnlichen Arbeit getroffenen¹⁴³, sie deckt sich aber mit der anderer Forschergruppen, zugeordnet für gesundes Nierengewebe bzw. Blutplasma^{116,121,122}. In

der oben erwähnten Studie ließen sich außerdem keine Aussagen zu Veränderungen der Lipidsignale bei Tumorgewebe im Vergleich mit gesundem Gewebe finden. Das für das Tumorgewebe höhere Werte für die Lipide, im Vergleich mit gesundem Gewebe ermittelt wurden, stimmt mit dem überein, was in der Literatur für Nierenzellkarzinom beschrieben wird, elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen Lipidtröpfchen für Zellen des Nierenzellkarzinoms¹⁴⁴, andere Untersuchungen zeigen eine Akkumulierung von Triacylglycerinen und Cholesterinestern im klarzelligen Nierenzellkarzinom¹⁴⁵, der Tumorart, die auch von uns untersucht wurde (s. Kap. 2.1.3).

3 Experimenteller Teil

3.1 Geräte

NMR-Spektrometer

AMX 300 der Firma Bruker Analytische Meßtechnik GmbH, Karlsruhe

Meßfrequenz: ^1H : 300,13 MHz
 ^{31}P : 121,5 MHz

DRX 500 der Firma Bruker Analytische Meßtechnik GmbH, Karlsruhe

Meßfrequenz: ^1H : 500,13 MHz

Gyroscan ACS, der Firma Phillips, Best, Niederlande

Meßfrequenz: ^1H : 63,89 MHz

3.2 Dekonvolution von NMR-Signalen

Speziell für die Integration der ^1H -NMR-Spektren von Blutplasma (in-vitro) und Gewebe (in-vivo) ist die Anwendung von Dekonvolutionsmethoden unabdingbar, da hier eine Überlappung der NMR-Signale auftritt. Die beiden in dieser Arbeit benutzten Programme sind im folgenden kurz dargestellt.

Dekonvolution mit dem Programm PERCH

Das Programm PERCH¹¹² bietet die Möglichkeit einer weitgehend automatisierten Dekonvolution von NMR-Spektren an. Hierbei wird das Spektrum zunächst halbautomatisch auf Signalform und Rauschpegel untersucht. Die Festlegung des Rauschpegels ermöglicht eine automatische Signalauswahl. Diese Signale werden von Perch simuliert. Dabei wird die Signalform iterativ an die der experimentellen Signale angepaßt. Zur Anpassung werden die Parameter Höhe, Breite und Frequenz sowie (falls erforderlich) die Basislinie optimiert, um ein minimales Restintegral des Differenzspektrums zu erhalten. Aufgrund des hohen Automatisierungsgrades bietet sich diese Methode beim Auftreten einer großen Anzahl einzelner Signale an. Die Dekonvolution von großen, sehr breiten neben kleineren, sehr scharfen Signalen gelingt mit dieser Methode nur bedingt. Wird ein solches breites NMR-Signal durch nur ein breites Modell-Signal dargestellt, weist das durch Linienformfehler resultierende

Restsignal nach Subtraktion häufig noch eine größere Fläche auf, als die eventuell im Spektrum vorhandenen kleinen scharfen Signale, wodurch der Fehler für die Integration der kleinen Signale so groß wird, dass die erhaltenen Werte nicht mehr verwendbar sind. Dies ist ein generelles Problem von computergestützten Iterationen.

Im vorliegenden Fall der ^1H -NMR-Spektren von Blutplasma, in dem der zuvor beschriebene Fall grundsätzlich auftritt, kann das beschriebene Iterationsproblem umgangen werden. Wird das Spektrum in Teilbereichen bearbeitet, die kleiner sind als das unterliegende breite NMR-Signal, so kann das breite NMR-Signal ohne einen nennenswerten Fehler betrachtet werden wie eine Deformation der Basislinie eines Spektrums. Wie zuvor gesagt, bietet das Programm PERCH genau diese Option der zusätzlichen, automatischen Basislinienkorrektur.

Zur besseren Verständlichkeit des bisher beschriebenen allgemeinen Aufbaus von PERCH wird das praktische Vorgehen bzw. die Programmbedienung im Weiteren erläutert. Die folgenden Abbildungen zeigen Schritt für Schritt die Anpassung dreier Signale eines ^1H -NMR-Spektrums von Blutplasma mit Hilfe des Programms PERCH. Das große Signal wird dabei hauptsächlich durch CH_2 -Gruppen aus Fettsäuren, die LDL und VLDL zuzuordnen sind, gebildet, enthält aber auch CH_2 -Gruppen von Fettsäuren, die HDL zuzuordnen sind und von freien Fettsäuren. Die beiden kleinen Signale sind Laktat zuzuordnen. Eine Übersicht über alle Signale, die mit Hilfe des Programms PERCH integriert wurden, ist in der unteren Tabelle aufgeführt (Tabelle 26). Alle in der Tabelle aufgeführten Signale wurden so angepaßt, wie für die folgenden drei Signale beispielhaft erläutert werden soll.

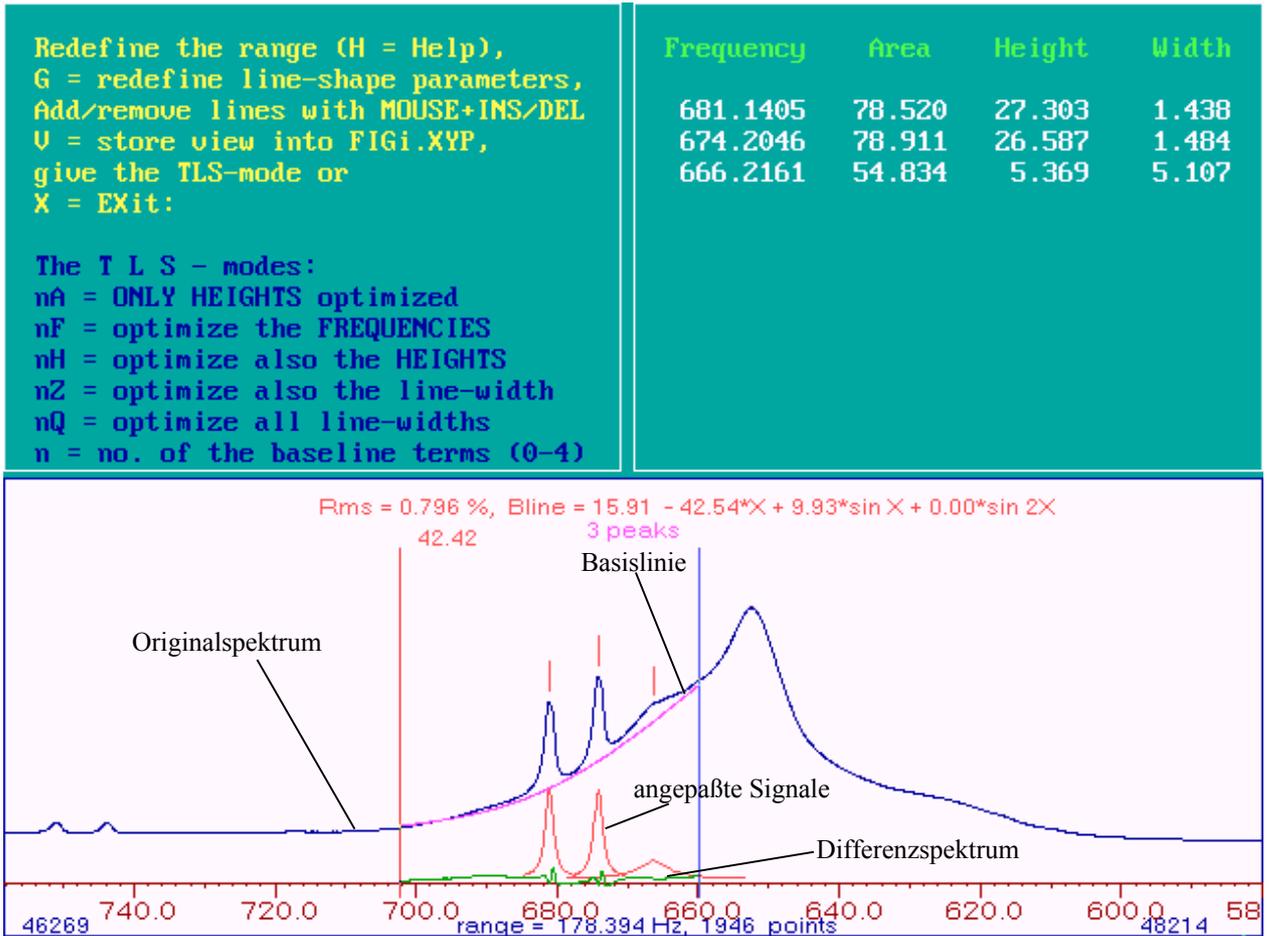


Abbildung 35 ^1H -NMR-Spektrum von Blutplasma (Ausschnitt Signal für CH_2 -Gruppen der Lipide (großes Signal) und Laktat (kleine Signale)).
 Linienformanpassung 1. Schritt, Anpassung für die Laktatsignale.

Bevor die Signale angepaßt werden, wird zunächst der Standard bearbeitet. Die Startwerte für die Anpassung des Standards und der anderen Signale des Spektrums werden im Programmabschnitt „PIC“ erzeugt. Der Standard wird genau so angepaßt, wie für das große Signal im Folgenden beschrieben wird. Bei den hier ausgewerteten Spektren genügte ein Modell-Signal für eine erfolgreiche Anpassung des Standards, bei Bedarf müssen aber noch mehr Linien zur Anpassung verwendet werden.

Für die Anpassung der kleinen Signale werden zunächst mit Hilfe des Cursors die Linienlagen der Modell-Signale festgelegt (d. h. hier zwei Linien in das Originalspektrum eingefügt, s. Abbildung oben). Die Linienlagen sind der Tabelle 26 zu entnehmen. Um gute Startwerte für die Anpassung der Signale zu gewährleisten, wird zunächst innerhalb der vorgegebenen Integrationsbereiche mit den Befehlen 1Q bzw. 2Q eine

Basislinienkorrektur durchgeführt. Anschließend werden mit den in der oberen linken Hälfte der Abbildung aufgeführten Funktionen (A, F, H, Z, Q) gleichzeitig zunächst die Höhe, dann die Frequenz und die Linienbreite des zu bearbeitenden Signals optimiert. Danach wird mit Hilfe der Funktion G die Linienbreite und der Gaußanteil des jeweiligen Signales bestimmt (bis auf das Standardsignal) (siehe unten aufgeführte Tabelle). Abschließend wird mit der Funktion Q (wirkt nur auf die Linienbreite des Signals) das Signal nochmals angepaßt. Mit dem Befehl 1Q, bzw. 2Q (evtl. auch 3Q) wird dann nochmals, innerhalb der Integrationsgrenzen (s. Tabelle 26), eine Basislinienkorrektur durchgeführt. Die schwarze Linie in der oberen Abbildung kennzeichnet das Originalspektrum, bei welchem die Vorbehandlung nur in einer Phasenkorrektur 0. Ordnung (kein korrigierbarer Phasenfehler 1. Ordnung) und einer Basislinienkorrektur 1. Ordnung über den Bereich von -3 bis 10 ppm bestand. Die dünne graue Linie darunter entspricht den nach der obigen Anleitung angepaßten Signalen. Weiterhin ist in der Abbildung die optimierte Basislinie zu erkennen und das Restintegral des Differenzspektrums, welches sich aus der Differenz zwischen Original- und angepaßtem Spektrum ergibt. In dieser ersten Runde der Anpassung werden alle kleinen Signale alleine (siehe Tabelle 26) und der Standard integriert. Die Werte werden in einer sogenannten „.top“ Datei gespeichert.

In der zweiten Runde werden nun die großen Signale und das Signal für den Standard integriert, die kleinen Signale werden dabei nicht herausgenommen, sondern mitangepaßt. Wie in dem Beispiel in der oberen Abbildung zu erkennen, ist zusätzlich zu den kleinen Signalen für das Laktat auch ein großes Signal vorhanden, welches hauptsächlich durch CH_2 -Gruppen aus Fettsäuren, die LDL und VLDL zuzuordnen sind, gebildet wird, daneben aber auch von CH_2 -Gruppen von Fettsäuren, die HDL zuzuordnen sind und von freien Fettsäuren gebildet wird. Das Vorgehen ist nun ähnlich wie bei den Laktatsignalen. Zuerst werden die Modell-Signale in das Signal gelegt, deren Zuordnung bekannt ist (s. Tabelle 26 und ¹¹⁶). In diesem Beispiel sind das drei Modell-Signale: eines für CH_2 -Gruppen von Fettsäuren aus LDL mit einer chemischen Verschiebung von 625 Hz, eines für CH_2 -Gruppen von Fettsäuren aus VLDL mit einer chemischen Verschiebung von 645 Hz und eines, welches CH_2 -Gruppen von anderen Fettsäuren, z. B. aus HDL zuzuordnen ist, mit einer chemischen Verschiebung von 660 Hz. Diese Werte sind Startwerte für die Anpassung, die Frequenzen werden bei der Anpassung allerdings freigegeben und nicht festgehalten. Danach ist das Vorgehen das gleiche wie bei den

Laktatsignalen, die hierbei mitangepaßt werden. Zunächst erfolgt mit 1Q bzw. 2Q innerhalb der Integrationsgrenzen eine Basislinienkorrektur. Mit A, F, H, Z werden anschließend gleichzeitig Höhe, Frequenz und Linienbreite der Peaks optimiert. Mit G wird dann wieder Linienbreite und Gaußanteil der anzupassenden Modell-Signale bestimmt und mit Q die Linienbreite optimiert. Mit Hilfe der Funktionen 1Q und 2Q findet dann nochmals eine Basislinienkorrektur innerhalb der vorgegebenen Integrationsgrenzen statt. Das Ergebnis dieser Vorgehensweise ist in der unteren Abbildung zu erkennen. Dargestellt sind neben dem Originalspektrum die angepaßten Signale, die Basislinie und das Differenzspektrum für den in diesem Beispiel gewählten Ausschnitt des Spektrums.

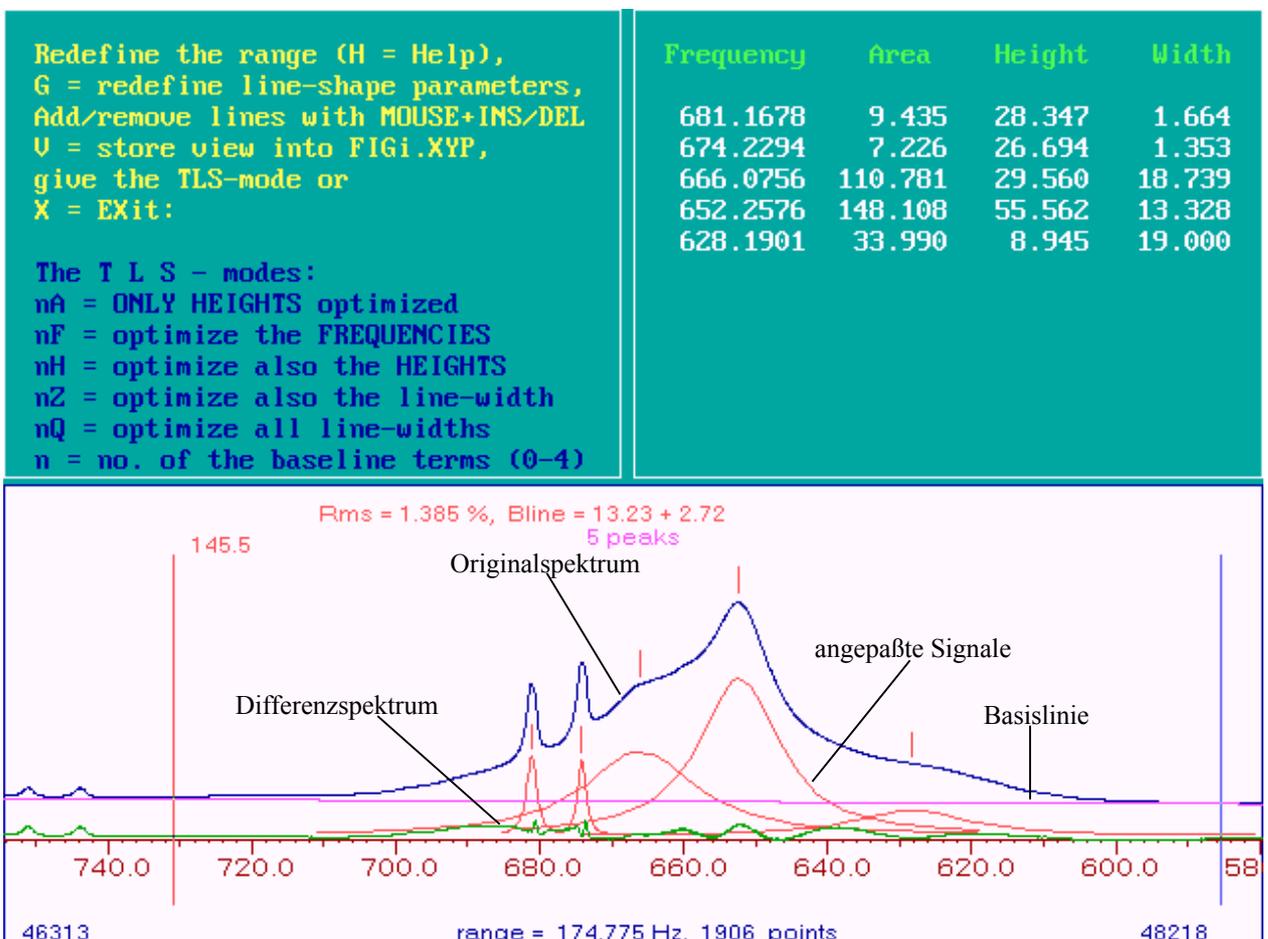


Abbildung 36 ^1H -NMR-Spektrum von Blutplasma. Linienformanpassung 2. Schritt, Anpassung des großen Signals.

Wenn das Differenzspektrum nun eine nahezu gerade Linie darstellt ist die Integration hiermit abgeschlossen und die Werte werden wiederum in einer sogenannten „top“ Datei

abgespeichert. Die Werte für die Integration der kleinen Signale werden dabei der ersten „.top“ Datei entnommen (siehe erster Schritt der Anpassung). Dies geschieht da, wie einleitend schon erwähnt wurde (in diesem Beispiel aber nicht unbedingt erforderlich wäre), bei der Anpassung von großen neben kleinen Signalen computergestützte Iterationen an ihre Grenzen stoßen können und die Modell-Signale der kleinen Signale verfälscht werden.

Sind in dem Differenzspektrum nun noch positive Abweichungen zu einer geraden Linie zu erkennen, wie auch in dem hier gezeigten Beispiel (siehe Abbildung oben), so wird wie folgt weiter verfahren. In die Bereiche der positiven Abweichungen von der Gerade werden weitere Modell-Signale gelegt. In dem hier gezeigten Beispiel sind das vier weitere Signale. Mit G wird für alle Signale die Linienbreite und der Gaußanteil der Signale neu bestimmt (siehe Tabelle 26). Mit Q erfolgt eine neue Optimierung der Linienbreite und mit 1Q und 2 Q findet eine Basislinienkorrektur innerhalb der vorgegebenen Integrationsgrenzen statt. Es werden solange weitere Modell-Signale nach dem hier beschriebenen Schema eingefügt, bis die Differenz zwischen den echten Signalen und angepaßten Signalen möglichst Null ist, das Differenzspektrum also möglichst eine gerade Linie bildet. Das Ergebnis ist in der unteren Abbildung zu erkennen. Die Addition aller Modell-Signale (hier sieben) ergibt den Wert für das große Signal, welches hier angepaßt werden sollte.

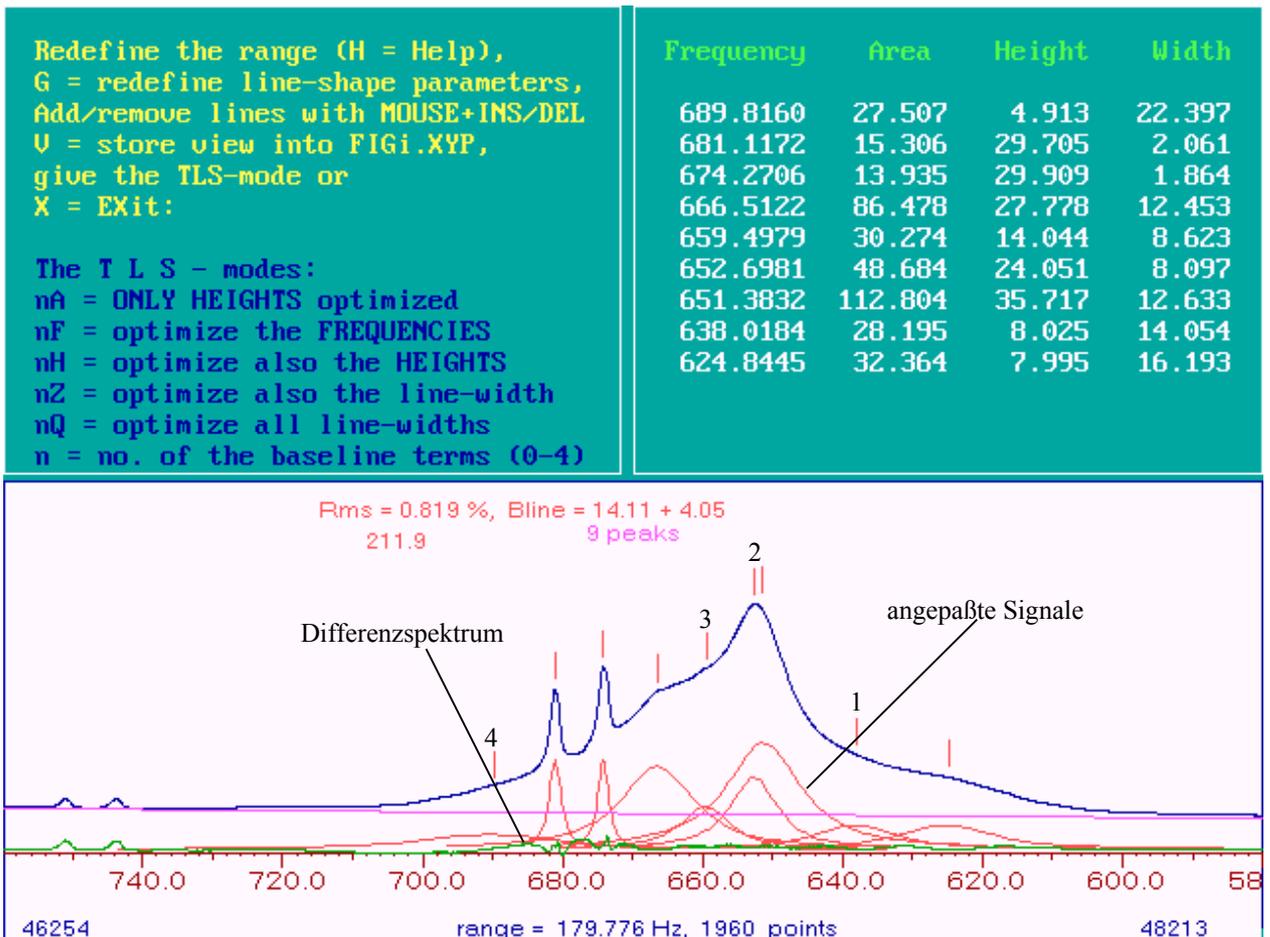


Abbildung 37 ^1H -NMR-Spektrum von Blutplasma. Linienformanpassung, Gesamtdarstellung. Die zusätzlich eingefügten Modell-Signale sind wurden durch Zahlen gekennzeichnet.

Tabelle 26 Werte für G (Linienbreite in Hz und Gaußanteil in Prozent des jeweiligen Signales)

Peak	Zuordnung	Integrationsbereiche und chem. Verschiebung in Hz		Werte für G	
				Linienbreite in Hz	Gaußanteil in %
1	Standardsubstanz	-100 - 150	0	8**	10**
2	<u>CH</u> ₃ - von Cholesterin in HDL (C18)	300 – 380	345	7	5
3	LDL1 → <u>CH</u> ₃ (CH ₂) _n VLDL1 → <u>CH</u> ₃ CH ₂ CH ₂ HC= terminale CH ₃ -Gruppen von FS	380 – 560	420 435	5 weitere Peaks 4	5 4
4*	Valin – <u>CH</u> ₃	490 – 560	500 530	0,5	5
5	LDL2 → (<u>CH</u> ₂) _n VLDL2 → <u>CH</u> ₂ CH ₂ COOR CH ₂ -Gr.von FS aus HDL u.freien FS	580 – 760	625 645 660	5 weitere Peaks 4	5 4
6*	Laktat – <u>CH</u> ₃	660 – 690	675	0,5	5
7*	Alanin – <u>CH</u> ₃	720 – 760	745	0,5	5
8	– <u>CH</u> ₂ CH ₂ COOR	760 – 840	770	5	5
9	– <u>CH</u> ₂ CH ₂ HC=CH–	840 – 900	870	5 weitere Peaks 2	5 2
10	– <u>CH</u> ₂ HC=CH–	950 – 1080	1015	5	10
11*	–NHCO <u>CH</u> ₃ – gehören beide zu Acetyl- signalen von α ₁ -aciden Glykoprot.	1020 - 1080	1030	2	10
12*			1050	1,5	10
13	– <u>CH</u> ₂ COOR	1080 – 1180	1125	5 weitere Peaks 3	5 3
14	–HC=CH <u>CH</u> ₂ HC=CH–	1340 – 1435	1380	7 weitere Peaks 3	7 3
15	ε- <u>CH</u> ₂ –, Albumin und Lysin	1435 – 1540	1445 1490 1520	2	5
16	–N ⁺ (CH ₃) ₃ -Gruppen verschiedener, cholinhaltiger Moleküle in Lipoproteinen	1605 – 1675	1625	5 weitere Peaks 5	10 5
17*	H ₂ , β-Glukose	1625 – 1675	1635	1	5
18*	– <u>CH</u> ₂ , freies Glycerin	1825 – 1860	1835	0,5	5
19	= <u>CH</u> COOR, Glycerylgruppen von Lipiden	2570 – 2625	2601	2	5
20*	anomeres H1, α-Glukose	2625 – 2640	2631	0,5	5
21	CH-Gruppen ungesättigter Fettsäuren in Lipiden – <u>CH</u> = <u>CH</u> CH ₂ <u>CH</u> =CH– und = <u>CH</u> CH ₂ CH ₂ –	2625 - 2780	2656	10 weitere Peaks 5	10 10

* Die mit diesem Symbol gekennzeichneten Signale wurden im ersten Durchgang, also unabhängig von den anderen Signalen, integriert, da ihre Intensität zu gering war, um sie neben den Lipidsignalen integrieren zu können.

** Die Werte für das Standardsignal variieren von Probe zu Probe.

Dekonvolution mit dem Programm WIN-NMR 5.1

Das Programm WIN-NMR 5.1 bietet die Möglichkeit einer halbautomatischen Dekonvolution. Hierzu werden interaktiv Signale mit einer Signalform mit vordefinierbarem Gauss/Lorenz Verhältnis an die Form des Spektrums angepaßt. Die Parameter Höhe, Breite und Frequenz können dabei kontinuierlich unter optischer Kontrolle von Linienformanpassung und Differenzspektrum verändert werden. Diese Anpassung kann abschließend dann per Computeriteration optimiert werden. Ihre Vorteile hat diese Methode bei der Anwendung auf wenige überlappende Signale mit unterschiedlicher Linienbreite. Es sollten nicht zu viele Signale sein, da sonst die interaktive Anpassung zu zeitaufwendig wird, das Auftreten stark unterschiedlicher Linienbreiten ist dagegen kein Problem, da mit der „intelligenzgestützten“ Anpassung das Problem der „lokalen Minima“ der computergestützten Iterationen umgangen wird.

Eine typische Linienformanpassung ist in der folgenden Abbildung zu sehen.

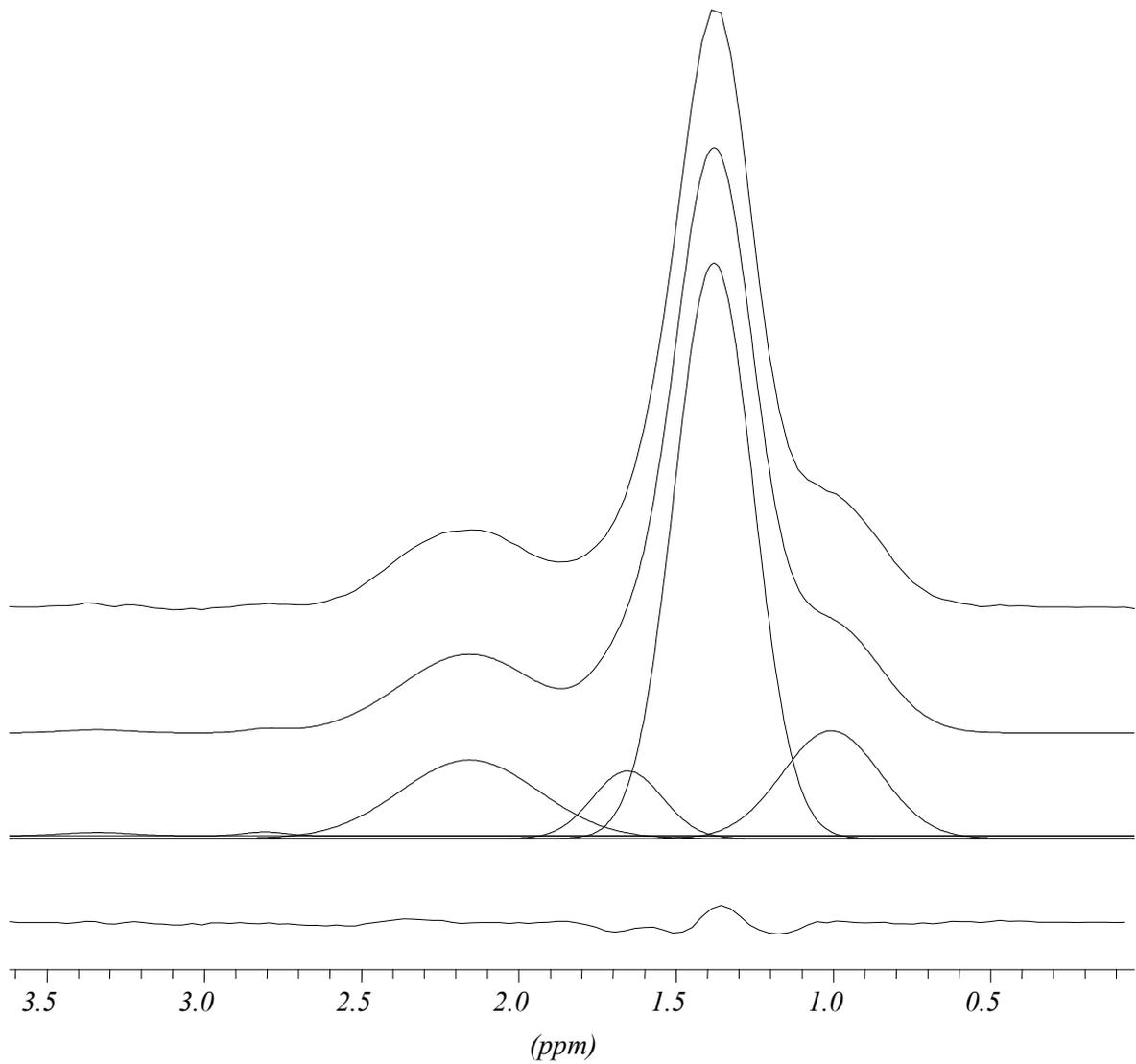


Abbildung 38 In-vivo ^1H -NMR-Spektrum eines Patienten mit Nierenzellkarzinom. Von oben nach unten: gemessenes Spektrum, Summe der angepaßten Signale, Einzelsignale, Differenzspektrum.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Durchführung ^{31}P -NMR-spektroskopischer und ^1H -NMR-spektroskopischer Untersuchungen an Blutplasma.

Sowohl für die ^{31}P -NMR-spektroskopischen, wie auch die ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen konnte eine reproduzierbare und einfach anwendbare Methode entwickelt werden, die eine quantitative Bestimmung der Phospholipide, bzw. Lipidbestandteile im Plasma ermöglichte. Bisher sind keine quantitative Bestimmungen an unbehandeltem Blutplasma vorgenommen wurden. Nur an, aufwendig herzustellenden, Extrakten von Blutplasma konnten diese bisher durchgeführt werden.

Für die ^{31}P -NMR-Spektroskopie wurde dazu dem Blutplasma eine Standardlösung zugesetzt, welche eine Standardsubstanz für eine interne Referenzierung und ein Detergens enthielt. Durch den Zusatz des Detergens konnten Signale erhalten werden, die eine genügend geringe Linienbreite aufwiesen, um getrennt integrierbar zu sein. Trotz Zugabe von Detergens zur Standardlösung konnte die Standardlösung so gewählt werden, daß die Proben (nach Zugabe der Lösung) einen pH-Wert von acht aufwiesen. Dieser pH-Wert kommt dem physiologischen pH-Wert von 7,4 sehr nahe und gewährleistete damit eine möglichst gute Haltbarkeit der Proben. Die gute Haltbarkeit der Proben und der Standardlösung, sowohl bei der Lagerung bei -10°C im Kühlschrank bis zur Messung (bei 37°C über 5 Stunden), wie auch über den Zeitraum der NMR-spektroskopischen Messung selbst konnten durch ^{31}P -NMR-spektroskopische Untersuchungen nachgewiesen werden. Die Meßtemperatur wurde mit 37°C möglichst hoch gewählt, um das Signal/Rausch-Verhältnis, gerade der kleinen Signale, zu verbessern, gleichzeitig aber Bedingungen zu schaffen, die den physiologischen Bedingungen im Körper entsprechen. Eine Minimierung der Meßzeit wurde durch die, mit Hilfe von Sättigungsmessungen durchgeführte, Bestimmung der für eine quantitative Messung minimalen Repetitionszeit erreicht.

Mit Hilfe der so entwickelten Methodik konnten folgende Phospholipidklassen im Blutplasma zugeordnet und quantifiziert werden: Phosphatidylethanolamin (PE) und Sphingomyelin (SM), 1- und 2-Acyl-Lysophosphatidylcholin (LPC2 und LPC1), Phosphatidylinositol (PI), und Phosphatidylcholin (PC). Es konnten außerdem noch

Phosphatidylserin (PS) und Cardiolipin (CL) zugeordnet werden, da diese Phospholipide aber nicht bei allen Plasmaproben nachzuweisen waren, wurden sie nicht mit ausgewertet.

Diese NMR-Methode ist also geeignet, eine alternative Analysemethode im Vergleich zur Quantifizierung mittels enzymatischer Methoden oder der HPLC zu bilden, wobei die ^{31}P -NMR-Spektroskopie in einem einzigen Spektrum qualitative und quantitative Informationen über alle hier untersuchten Phosphorverbindungen zu liefern vermag.

Auch für die Bestandteile von Lipiden im Blutplasma konnten mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie erstmals quantitativ Konzentrationen bestimmt werden, ohne daß eine spezielle Vorbehandlung des Blutplasmas erforderlich war. Dazu waren auch hier die Auswahl einer geeigneten Substanz für eine interne Referenzierung und geeigneter Meßparameter (u. a. geeignetes Programm für die Wasserunterdrückung, Auswahl der Meßtemperatur zu 37°C) erforderlich. Die zugeordneten und quantifizierten Lipidbestandteile setzten sich dabei aus Anteilen von Cholesterin in HDL („high density lipoproteine“), Bestandteilen von Fettsäuren in VLDL („very low density lipoproteine“) und LDL („low density lipoproteine“), Bestandteilen gesättigter und ungesättigter Fettsäuren allgemein, sowie in Cholin und Glycerin zusammen.

Durch die Entwicklung der Methodik für die ^{31}P -NMR-spektroskopischen und ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen konnten auch Veränderungen der Konzentrationen an Phospholipiden, bzw. Lipiden allgemein im Blutplasma im Hinblick auf tumorspezifische Veränderungen untersucht werden. Die so gefundenen Veränderungen in Phospholipid- bzw. Lipidkonzentrationen im nicht vorbehandelten Blutplasma konnten, ebenfalls erstmalig, mit Tumorstadium und Vorhandensein von Metastasen korreliert werden. Es wurde ^{31}P -NMR-spektroskopisch Blutplasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom, Patienten mit Dickdarmkarzinom, Patientinnen mit Ovarialkarzinom und Patientinnen mit Mammakarzinom, sowie ^1H -NMR-spektroskopisch Plasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom und Patientinnen mit Ovarialkarzinom untersucht und die Ergebnisse mit denen eines gesunden, im Alter dem Alter der Patienten angepaßten, Probandenkollektivs verglichen. Die Notwendigkeit dieser Anpassung wurde dabei durch den Vergleich von Probandenkollektiven verschiedener Altersgruppen nachgewiesen.

Die Unterschiede im Phospholipid- bzw. im Lipidgehalt im Blutplasma der an Krebs erkrankten Patienten, die hier ermittelt werden konnten, werden hier noch einmal zusammengefaßt: Patienten mit Nierenzellkarzinom zeigten im Vergleich mit gesunden

Probanden signifikant niedrigere Konzentrationen in den Phospholipidklassen, die den Lysophosphatidylcholinen und dem Phosphatidylcholin (bei Frauen) zuzuordnen waren. Die Gesamtkonzentration an Phospholipiden im Blutplasma war bei den Patienten ebenfalls signifikant niedriger als bei den Gesunden. Diese Veränderungen in den Phospholipidkonzentrationen korrelierten mit der Tumorgröße, dem Tumorgrad (Erklärung s. Kap. 2.3.1) und dem Vorhandensein von Metastasen. Eine Patientin mit einem Urothelkarzinom im Nierenbecken und eine Patientin mit einem in die Niere metastasierenden Bronchialkarzinom zeigten die gleichen Veränderungen in der Konzentration der Phospholipide wie Patienten mit Nierenzellkarzinom, während eine Patientin mit einem gutartigen Nierentumor höhere Phospholipidkonzentrationen in allen Phospholipidklassen im Vergleich mit gesunden Probanden zeigte.

Die Veränderungen der Phospholipidkonzentrationen bei Patienten mit Nierenzellkarzinom bildeten sich zurück, wenn sich die Patienten in Remission befanden, d. h. kein Tumor mehr nachweisbar war. Aus den ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen ergaben sich für Patienten mit Nierenzellkarzinom im Vergleich mit gesunden Probanden signifikant niedrigere Konzentrationen für zwei Bestandteile von Lipiden, wobei einer CH_2 -Gruppen von ungesättigten und der andere CH_2 -Gruppen aus gesättigten Fettsäuren zuzuordnen war. Der Gesamtgehalt an Fettsäuren in VLDL und LDL war bei den Patienten nicht signifikant verändert, lag aber im Mittel unter den Werten der gesunden Probanden, ebenso wie die Konzentration an Cholesterin aus HDL. Für eine Veränderung der Konzentrationen der Lipidbestandteile in Abhängigkeit vom Tumorstadium und der Präsenz von Metastasen ergaben sich für Patienten mit Nierenzellkarzinom folgende Zusammenhänge: Die Konzentrationen aller Bestandteile von Lipiden lagen für einen Patienten mit einem Tumor eines höheren Tumorstadiums (größerer Tumor) höher als für einen Patienten mit einem Tumor eines niedrigeren Tumorstadiums (kleinerer Tumor). Bei zwei Patienten mit Tumoren des gleichen Tumorstadiums zeigte derjenige, der zusätzlich noch Metastasen aufwies niedrigere Konzentrationen für alle Lipidbestandteile als der ohne Metastasen.

Patienten mit Dickdarmkarzinom wiesen andere Veränderungen der Konzentration an Phospholipiden im Blutplasma auf als Patienten mit Nierenzellkarzinom. Bei ihnen zeigten sich signifikant niedrigere Konzentrationen an Phosphatidylcholin und der Gesamtsumme an Phospholipiden im Vergleich mit gesunden Probanden. Die Konzentration an LPC1+2 lag bei den Patienten mit Dickdarmkarzinom im Mittel über

der der gesunden Probanden, eine Veränderung, die allerdings nicht signifikant war. Bei einem Vergleich der Patienten mit Nierenzellkarzinom mit Patienten mit Dickdarmkarzinom zeigten sich für die Patienten mit Nierenzellkarzinom signifikant niedrigere Konzentrationen in der Klasse der Lysosphosphatidylcholine (LPC1+2). Durch den Vergleich der Änderungen der Phospholipidkonzentrationen bei Patienten mit Nierenzellkarzinom und Patienten mit Dickdarmkarzinom konnte die in einer früheren Studie getroffene Behauptung, beide Krebsarten würden gleiche, systemische, Veränderungen im Phospholipidmuster des Blutplasmas zeigen¹⁸, widerlegt werden.

Bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom fanden sich im Vergleich mit gesunden Probanden signifikant niedrigere Phospholipidkonzentrationen für alle Phospholipidklassen. Das Ausmaß dieser Veränderungen im Phospholipidgehalt korreliert mit dem Tumorstadium (bis auf LPC1), ebenso wie mit dem Vorhandensein von Metastasen (wenn die Patientinnen einen Tumor des Tumorstadiums T3 aufwiesen). Aus den ¹H-NMR-spektroskopischen Untersuchungen ergab sich eine Veränderung der Konzentration der Lipidbestandteile im Blutplasma, die sich mit den bei Phospholipiden ermittelten Veränderungen deckt. Für alle Bestandteile von Lipiden, die in dieser Arbeit ausgewertet wurden, zeigten die Patientinnen mit Ovarialkarzinom signifikant niedrigere Konzentrationen im Vergleich mit gesunden Probanden. Die Abnahme der Konzentrationen der Lipidbestandteile korrelierte mit dem Vorhandensein von Metastasen.

Bei Patientinnen mit Mammakarzinom konnten im Vergleich mit gesunden Probanden signifikant niedrigere Phospholipidkonzentrationen für Phosphatidylinositol, Phosphatidylcholin und die Gesamtsumme der Phospholipide nachgewiesen werden. Bei einer Einteilung der Patientinnen nach dem Alter und Vergleich mit Probanden gleichen Alters, ließen sich die gleichen Ergebnisse herausarbeiten, wie für das Gesamtkollektiv der Patientinnen. Bei einer Korrelation der Ergebnisse mit der Tumorgröße ergaben sich für Patientinnen mit einem größeren Tumor (höheres Tumorstadium) generell niedrigere Konzentrationen der Phospholipide im Vergleich mit Patientinnen mit einem kleineren Tumor. Bei einem Vergleich der mit Hilfe der ³¹P-NMR-Spektroskopie ermittelten Phospholipidkonzentrationen im Blutplasma von Patientinnen mit Ovarialkarzinom mit denen von Patientinnen mit Mammakarzinom zeigten die Patientinnen mit Ovarialkarzinom generell niedrigere Konzentrationen an Phospholipiden. Signifikant waren die Unterschiede bei allen Phospholipidklassen, außer LPC1 und PI. Zu

berücksichtigen ist bei diesem Vergleich allerdings, daß die Patientinnen mit Ovarialkarzinom, die in dieser Arbeit untersucht wurden, im Durchschnitt Tumore mit einem höheren Tumorstadium aufwiesen als die Patientinnen mit Mammakarzinom und mehr Patientinnen mit Ovarialkarzinom Metastasen zum Zeitpunkt der Untersuchung zeigten als Patientinnen mit Mammakarzinom.

Der letzte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Entwicklung einer Methode für die in-vivo ^1H -NMR-spektroskopischen Untersuchungen von Tumorgewebe in der Niere von Patienten mit Nierenzellkarzinom im Vergleich mit gesundem Nierengewebe. Dadurch sollte eine Vergleich der im Blutplasma gefundenen, systemischen, Veränderungen, verursacht durch diese Krankheit, mit den Veränderungen im Tumorgewebe selbst ermöglicht werden.

Da bei der hier benutzten Technik der in-vivo Spektroskopie kein Standard zugesetzt werden kann und damit keine quantitativen Konzentrationsangaben gemacht werden können, wurden für einen Vergleich von Patienten und Probanden die aus den Tumorspektren von Patienten mit Nierenzellkarzinom und den Gewebespektren gesunder Probanden ermittelten Signalflächen im Verhältnis zum größten Signal angegeben. Bestimmen ließen sich die Signalflächen von terminalen CH_3 -Gruppen von Fettsäuren, von CH_2 -Gruppen von Fettsäuren (größtes Signal), von CH_2 -Gruppen aus ungesättigten Fettsäuren und der $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ -Gruppe verschiedener, cholinhaltiger Verbindungen. Dabei ließ sich aus Spektren von Tumorgewebe von Patienten mit Nierenzellkarzinom ein höherer Wert für das Verhältnis der terminalen CH_3 -Gruppen von Fettsäuren zu CH_2 -Gruppen von Fettsäuren im Vergleich mit gesundem Nierengewebe gesunder Probanden ermitteln. Für das Verhältnis von CH_2 -Gruppen aus ungesättigten Fettsäuren zu CH_2 -Gruppen allgemein zeigten die Patienten im Tumorgewebe ebenfalls höhere Werte. Der Wert für das Verhältnis der cholinhaltigen Verbindungen zu CH_2 -Gruppen von Fettsäuren war bei den Patienten dagegen kleiner als bei den gesunden Probanden. Bei einem Vergleich von gesundem und kranken Gewebe innerhalb eines Patienten ließen sich die oben beschriebenen Ergebnisse ebenfalls finden. Bei einem Patienten mit einem Niereninfarkt und einem Patienten mit einer Nierentuberkulose zeigten sich andere Werte für die hier ermittelten Quotienten der Signalflächen.

Die in dieser Arbeit für die in-vivo ^1H -NMR-Spektren getroffene Signalzuordnung deckt sich nicht mit der in einer anderen in-vivo ^1H -NMR-spektroskopischen Arbeit

getroffenen¹⁴⁶, sie deckt sich aber mit der anderer Forschergruppen, zugeordnet für gesundes Nierengewebe bzw. Blutplasma^{116,121,122}. In der oben erwähnten Studie ließen sich außerdem keine Aussagen zu Veränderungen der Lipidsignale bei Tumorgewebe im Vergleich mit gesundem Gewebe finden.

Die in dieser Arbeit ermittelte Erniedrigung bestimmter Bestandteile von Fettsäuren im Blutplasma von Patienten mit Nierenzellkarzinom könnte durch den erhöhten Verbrauch durch den Tumor, nachgewiesen mittels in-vivo Spektroskopie hervorgerufen werden. Die Aussagen, die mit Hilfe der in-vivo ¹H-Spektren getroffen werden konnten, sind aber nicht spezifisch genug, um sicher einen bösartigen von einem gutartigen Tumor unterscheiden zu können. Für exaktere Aussagen könnte eventuell die in-vivo ³¹P-NMR-Spektroskopie hilfreich sein. Dies ist Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Die hier untersuchten Krebsarten zeigen sehr verschiedene Änderungen im Phospholipid- und Lipidgehalt im Blutplasma, d. h. sie zeigen verschiedene systemische Auswirkungen, je nach Art der Krebserkrankung. Eine Abgrenzung zwischen verschiedenen Tumorerkrankungen mit Hilfe der hier verwendeten NMR-spektroskopischen Methoden ist also denkbar. Um diese Ergebnisse für diagnostische Zwecke einsetzen, oder die speziellen Mechanismen, die zu diesen Veränderungen im Phospholipid- und Lipidgehalt geführt haben aufklären zu können, sind in Zukunft sicher noch weitere Untersuchungen erforderlich. Die hier präsentierten Ergebnisse liefern aber einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. Eventuell ist diese Untersuchungsmethode für eine Kontrolle des Verlaufes der Krankheiten geeignet, die mit Hilfe der ³¹P-NMR-Spektroskopie erhaltenen Ergebnisse bei Patienten mit Nierenzellkarzinom deuten darauf hin.

5 Anhang

5.1 Zum Lipidstoffwechsel

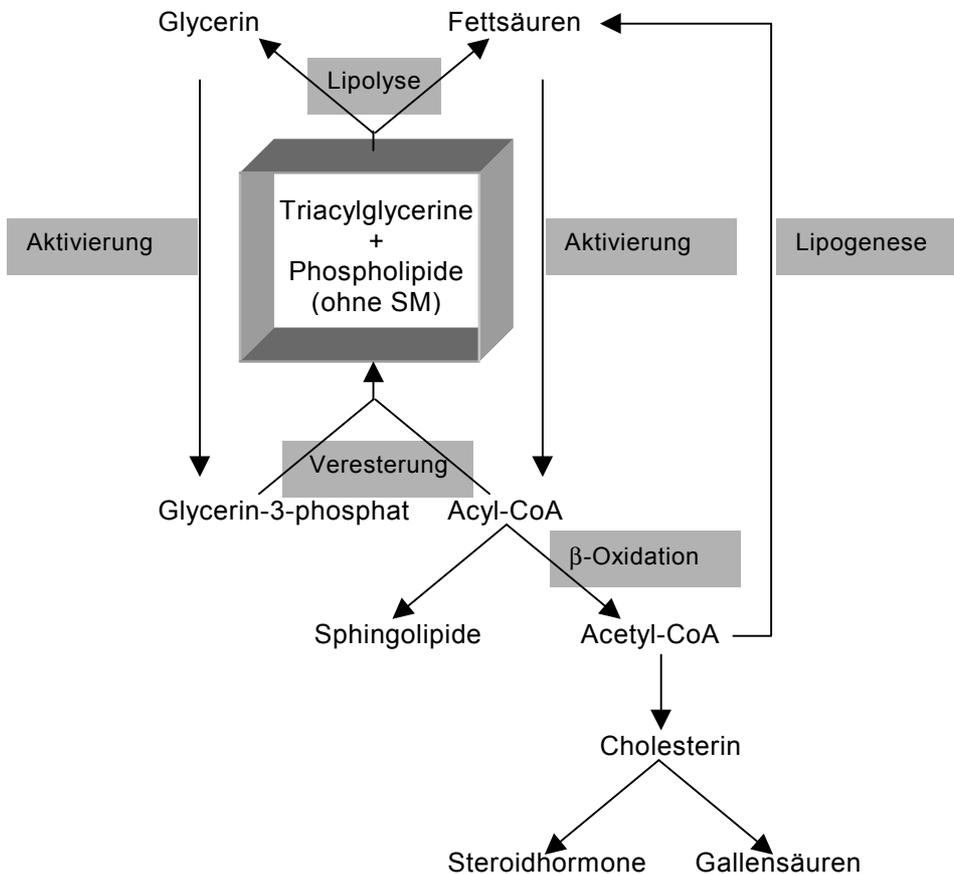


Abbildung 39 Übersicht über die wichtigsten Wege des Lipidstoffwechsels
Fettsäuren^{19,22}

Bevor Fettsäuren abgebaut werden können, müssen sie in einer ATP-abhängigen Reaktion im Cytosol der Zellen aktiviert werden, wobei Acyl-CoA entsteht. Katalysiert wird dieser Vorgang durch Enzyme aus der Familie der Acyl-CoA-Synthetasen (Thiokinasen), welche spezifisch für verschiedene Kettenlängen sind. Die Fettsäuren werden anschließend in den Mitochondrien durch sogenannte β -Oxidation von Acyl-CoA zum Acetyl-CoA und ein um zwei C-Atome verkürztes Acyl-CoA abgebaut. Das verkürzte Acyl-CoA geht erneut in den oxidativen Abbau ein. Auf diese Weise können langkettige Fettsäuren vollständig zu aus zwei C-Atomen bestehenden Acetylresten abgebaut werden. Das entstehende Acetyl-CoA kann im Citratzyklus zu CO_2 und Wasser abgebaut werden, womit die vollständige β -Oxidation erreicht wird. Fettsäuren mit einer ungeraden Zahl von C-Atomen werden ebenfalls durch β -Oxidation abgebaut. Der Abbau erfolgt so lange, bis

ein aus drei C-Atomen bestehender Propionyl-CoA Rest übrigbleibt. Diese Verbindung wird in das Citratzykluszwischenprodukt Succinyl-CoA umgewandelt. Aus dem Cytosol (Aktivierung) in die Mitochondrien (Abbau) können die Fettsäuren aber nur als Carnitinester gelangen, sie werden in den Mitochondrien anschließend wieder in Acyl-CoA zurückverwandelt. Die Zelle hält so die CoA-Moleküle im Cytosol und in den Mitochondrien getrennt voneinander. Die CoA-Moleküle im Cytosol stehen dann für die Fettsäurebiosynthese zur Verfügung.

Die Biosynthese von Fettsäuren erfolgt in der Umkehrung der β -Oxidation durch Kondensation von C 2-Einheiten im Cytosol der Zelle. Trotzdem unterscheidet sie sich in mehreren Aspekten von der Fettsäureoxidation. Während die Oxidation in den Mitochondrien abläuft und Acyl-CoA als Substrat benutzt, findet die Fettsäurebiosynthese im Cytosol statt und die wachsende Fettsäurekette ist mit einem Acyl-Carrier-Protein (ACP) verestert. Sowohl die beteiligten Redox-Coenzyme (FAD und NAD⁺ für die Oxidation, NADPH für die Biosynthese) als auch die Stereochemie der Stoffwechselintermediate sind unterschiedlich. Bei der Oxidation entsteht Acetyl-CoA, Malonyl-CoA ist die unmittelbare Vorstufe für die Biosynthese, wird aber mit Hilfe der Acetyl-CoA-Carboxylase aus Acetyl-CoA gewonnen. Acetyl-CoA gelangt über das Tricarboxylat-Transportsystem vom Mitochondrium ins Cytosol. Die schon erwähnte Spaltung im Citratzyklus erzeugt gleichzeitig einen Teil des für die Biosynthese benötigten NADPH. Bei Tieren ist Palmitinsäure das Primärprodukt der Fettsäuresynthese. Längerkettige Fettsäuren sowie ungesättigte Fettsäuren werden durch Elongation und Desaturierung (mit Hilfe von Elongasen und Desaturasen als Enzymen) aus Palmitinsäure hergestellt.

Die Regulation des Fettsäurestoffwechsels erfolgt durch allosterische Kontrolle der hormonsensitiven Triacylglycerin-Lipase und der Acetyl-CoA-Carboxylase (s. o.), durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung und/oder Änderungen der Geschwindigkeit von Enzymsynthese bzw. -abbau. An der Regulation sind die Hormone Glucagon, Adrenalin und Noradrenalin beteiligt, die den Abbau von Fettsäuren stimulieren, sowie Insulin, das die Biosynthese aktiviert. Diese Hormone wechselwirken miteinander, da sie alle die intrazelluläre cAMP-Konzentration beeinflussen, welche wiederum die Geschwindigkeit von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen bestimmt.

Triacylglycerine^{19,22}

Triacylglycerine machen nicht nur ca. 90 % der mit der Nahrung aufgenommenen Fette aus, sondern auch ca. 90 % des Energiereservoirs des Menschen. Sie bestehen aus Fettsäure-Glycerin-Triestern, wobei typische Fettsäuren Palmitin- und Ölsäure sind.

Da Triacylglycerine im Gegensatz zu Verdauungsenzymen wasserunlöslich sind, müssen sie an Fett-Wasser-Grenzflächen (im Darm) abgebaut werden. Die Geschwindigkeit ihrer Verdauung hängt von der Größe der Oberfläche dieser Schicht ab, sie wird durch die peristaltischen Bewegungen des Darms und die emulgierende Wirkung von Gallensäuren erheblich vergrößert. Gallensäuren wirken als starke Detergentien, die in der Leber hergestellt und über die Gallenblase in den Dünndarm abgegeben werden, wo die Verdauung und Absorption von Lipiden hauptsächlich stattfindet. Pankreas-Lipase katalysiert die Hydrolyse von Triacylglycerinen an den Positionen 1 und 3, so daß nacheinander 1,2-Diacylglycerine und 2-Acyglycerine sowie die Natrium- und Kaliumsalze der freigesetzten Fettsäuren entstehen.

Im Zuge der Lipidverdauung entsteht also eine Mischung aus Fettsäuren, Mono- und Diacylglycerinen, die von den Zellen, die den Dünndarm auskleiden, aufgenommen wird. Die Gallensäuren erleichtern die Aufnahme durch die Bildung von Mizellen, in die die Lipidabbauprodukte integriert werden, so daß diese über die wässrige Grenzschicht der Darmwand transportiert werden können. Gallensäuren helfen also offenbar bei der Absorption von Fettabbauprodukten aus dem Darm.

Die Produkte der Fettverdauung werden absorbiert, in den Zellen die den Darm auskleiden in Triacylglycerine zurückverwandelt und dann in Lipoproteinpartikel, den sogenannten Chylomikronen (s. S. 8), verpackt. Diese wiederum werden über das Lymphsystem in den Blutkreislauf abgegeben, wo sie den übrigen Geweben zugänglich sind. In ähnlicher Weise werden die in der Leber synthetisierten Triacylglycerine in Lipoproteine sehr geringer Dichte (VLDL, s. S. 8) verpackt, die jedoch direkt ins Blut freigesetzt werden. Die Triacylglycerine der Chylomikronen und VLDL werden in den Kapillaren von Fettgewebe und Skelettmuskulatur durch die Lipoprotein-Lipase in freie Fettsäuren und Glycerin hydrolysiert. Die freigesetzten Fettsäuren werden daraufhin ins Fettgewebe, bzw. in den Muskel aufgenommen, während das Glycerin zur Leber oder zu den Nieren transportiert wird, wo es zu Dihydroxyacetonphosphat, einem Zwischenprodukt der Glykolyse umgewandelt wird. An der Mobilisierung der im

Fettgewebe gespeicherten Lipide ist die (schon erwähnte) hormonsensitive Triacylglycerin-Lipase beteiligt; sie katalysiert die Hydrolyse von Triacylglycerinen zu Fettsäuren und Glycerin. Die freien Fettsäuren werden in den Blutkreislauf abgegeben und binden an Albumin.

Im ersten Schritt der Biosynthese von Triacylglycerinen katalysiert das Enzym Acyl-CoA-Glycerin-3-phosphat-Acyltransferase die Verknüpfung von zwei Molekülen Acyl-CoA mit Glycerin-3-phosphat zum 1,2-Diacylglycerin-3-phosphat, der sogenannten Phosphatidsäure (s. auch Kap. Biosynthese von Triacylglycerinen und Phospholipiden). Die Acyltransferase zeigt dabei nur eine geringe Kettenlängenspezifität. Aus der Phosphatidsäure wird durch eine Phosphatase 1,2-Diacylglycerin gebildet. Die Diacylglycerinacyltransferase als Enzym ermöglicht nun die Veresterung mit der dritten Fettsäure und damit die Bildung von Triacylglycerinen. In den Zellen, die den Dünndarm auskleiden, besteht zusätzlich zu diesem Biosyntheseweg die Möglichkeit, Diacylglycerin durch Reaktion von Monoacylglycerin mit Acyl-CoA zu bilden.

Cholesterin^{19,22}

Cholesterin ist, wie schon erwähnt, ein wichtiger Bestandteil von Zellmembranen und Ausgangsverbindung für die Synthese von Gallensäuren. Biosynthese, Transport und Nutzung dieser Verbindung stehen unter strenger Kontrolle. Cholesterin wird in der Leber aus Acetat hergestellt, wobei aus drei Molekülen Acetat zunächst HMG-CoA gebildet wird, welches durch Reduktion, Phosphorylierung, Decarboxylierung und Dehydratisierung in die vom Isopren ausgehenden Moleküle Isopentenylpyrophosphat und Dimethylallylpyrophosphat umgewandelt wird. In einer Kondensationsreaktion bilden diese Isoprenderivate Squalen, welches zu Lanosterin, einer Cholesterinvorstufe, cyclisiert wird.

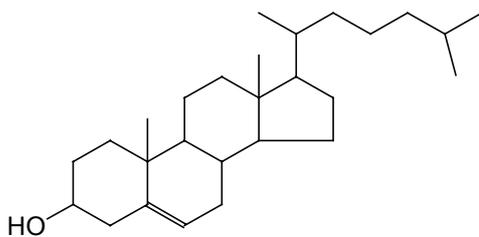


Abbildung 40 Cholesterin

Die Hauptkontrollstelle der Cholesterinsynthese ist die HMG-CoA-Reduktase-Reaktion. Dieses Enzym wird kurzfristig durch kompetitive und allosterische Mechanismen und durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung, sowie langfristig durch Kontrolle der Geschwindigkeit von Enzymsynthese und -abbau reguliert. Die Leber gibt Cholesterin in Form seiner Ester als Bestandteil von VLDL in den Blutkreislauf ab. VLDL werden schrittweise in IDL („intermediate density lipoproteine“) und dann LDL umgewandelt. Zellen nehmen LDL durch rezeptorvermittelte Endocytose auf. Der größte Teil des Cholesterins, das für die Verwendung in peripheren Gewebe bestimmt ist, wird in LDL transportiert. Überschüssiges Cholesterin gelangt in HDL-Komplexen aus der Peripherie zurück in die Leber. In den Zellen werden die Cholesterinester von einer Lipase hydrolysiert. Das freigesetzte Cholesterin wird entweder in die Zellmembran eingebaut, für die Herstellung von Gallensäuren verwendet, durch ACAT (Acyl-CoA:Cholesterin-Acyl-Transferase) erneut verestert, um in Form von Cholesterinestern in der Zelle gespeichert zu werden oder, wie erwähnt, in VLDL verpackt ins Blut abgegeben zu werden. Cholesterin, Cholesterinester und Triacylglycerine, die mit der Nahrung aufgenommen werden, werden dagegen, wie bei den Triacylglycerinen erwähnt, in den Chylomikronen transportiert. Nachdem ihr Triacylglycerinanteil in den peripheren Geweben entfernt worden ist, binden die übriggebliebenen Chylomikronenreste an spezifische Leberrezeptoren und werden, ähnlich wie LDL, durch rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen. Dort wird das Nahrungscholesterin wie das endogene weiterverarbeitet. Es gibt also zwei Wege, wie Leber und peripheres Gewebe mit Cholesterin versorgt werden können: Zellen können entweder Cholesterin de novo synthetisieren oder es durch rezeptorvermittelte Endocytose aus dem Blut aufnehmen. Drei Mechanismen kontrollieren die Versorgung der Zellen mit Cholesterin: 1. Lang- und Kurzzeitregulation der HMG-CoA-Reduktase, 2. Kontrolle der LDL-Rezeptor-Synthese durch die Cholesterinkonzentration und 3. Lang- und Kurzzeitregulation der ACAT (s.o.). Cholesterin ist die Vorstufe der Steroidhormone, die Progesterone, Glucocorticoide, Mineralocorticoide, Androgene und Östrogene umfassen, welche eine Vielzahl physiologischer Funktionen regulieren, wie z. B. Sexualentwicklung oder Kohlenhydrat-Stoffwechsel. Der quantitativ bedeutsamste Weg für die Ausscheidung von Cholesterin ist die Bildung von Gallensäuren in den Leberzellen. Der Mechanismus dieses Abbaus von Cholesterin ist relativ kompliziert. Der erste Schritt besteht in einer Hydroxylierung des Cholesterins am C 7, welches wahrscheinlich auch der geschwindigkeitsbestimmende

Schritt bei der Gallensäurebiosynthese ist. Die Hydroxylierung wird durch ein Enzym katalysiert, welches Sauerstoff und NADPH benötigt und teilweise durch CO gehemmt wird. Anschließend erfolgt die Oxidation zur sogenannten Cholsäure oder ihrer Derivate. Der größte Teil der Gallensäuren wird nach Aktivierung der Cholsäure zum CoA-Ester mit Glycin oder Taurin konjugiert und als Konjugat in die Gallengänge ausgeschieden.

Phospholipide

Zur besseren Übersicht und aufgrund der großen Bedeutung der Phospholipide in dieser Arbeit, wird dieser Abschnitt weiter unterteilt.

Allgemeines

Die Phospholipide gehören zur Gruppe der komplexen Lipide (= Lipide mit mehr als zwei Hydrolyseprodukten). Sie sind chemisch Diester der Phosphorsäure; diese ist einerseits mit einem Sphingosin- oder Glycerin-Derivat (meist Diacylglycerin, beide verestert mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren), andererseits mit Cholin, Ethanolamin, Serin, Inositol oder Glycerin verestert. Durch diesen lipophilen und hydrophilen Anteil weisen die Phospholipide amphiphile Eigenschaften auf, die für ihr physikalisch-chemisches Verhalten von großer Bedeutung sind. Nachfolgend sind im Blutplasma auftretenden und in dieser Arbeit untersuchten Phospholipide aufgeführt.

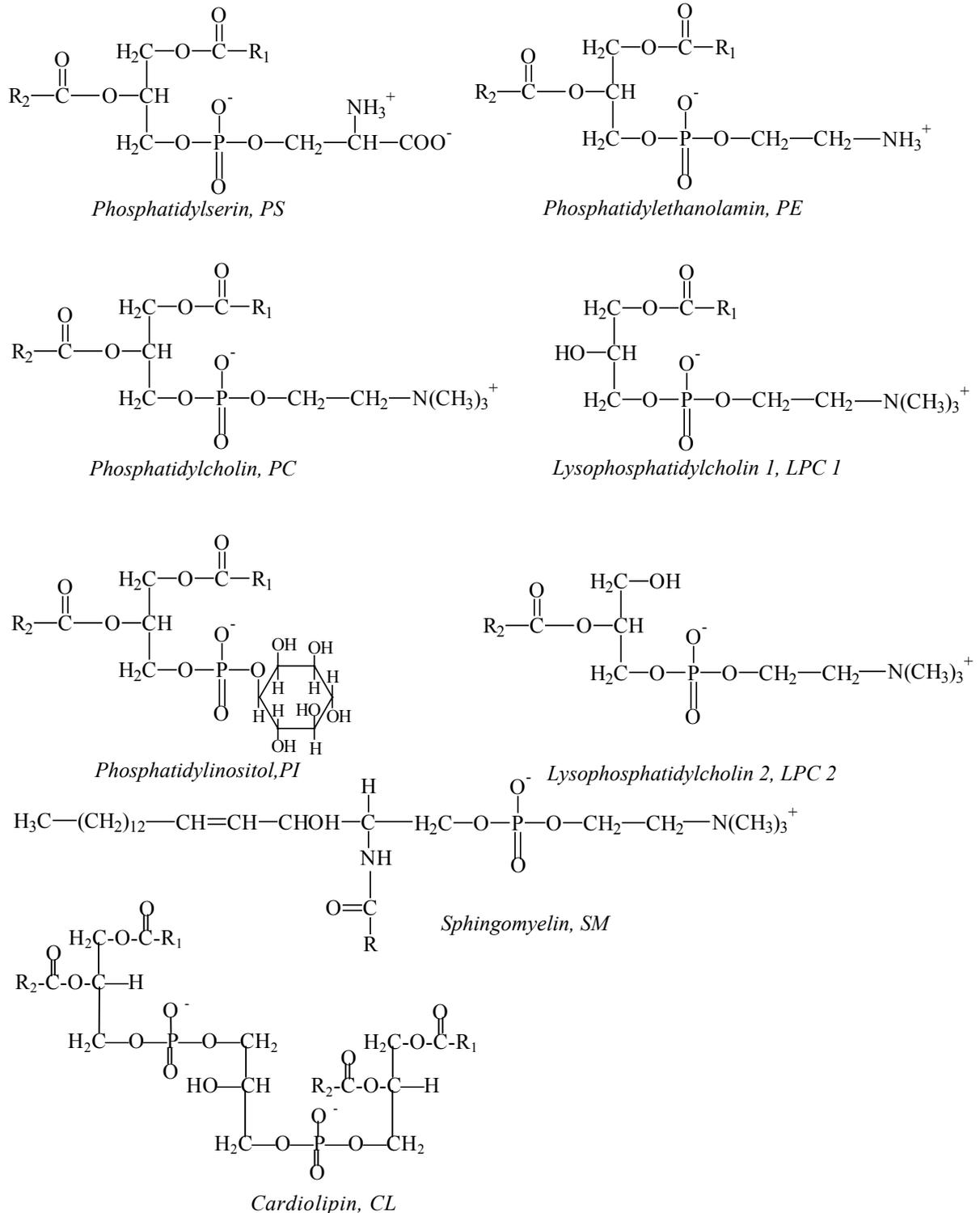


Abbildung 41 Verschiedene, in dieser Arbeit untersuchte, Phospholipidklassen

Bis auf Sphingomyelin enthalten sie das in L-Konfiguration vorliegende Glycerin-3-phosphat.

Bei den in den Phospholipiden enthaltenen Fettsäuren können, wie bei den Triacylglycerinen auch, Kettenlänge und Zahl der Doppelbindungen variieren. Innerhalb einer Klasse der Phospholipide, z. B. der Phosphatidylcholine, gibt es also verschiedene (mit unterschiedlichen Fettsäuren) veresterte Phospholipide. Dabei gilt fast allgemein, daß die an C1-gebundene Fettsäure gesättigt ist, während in 2-Stellung meist eine ungesättigte Säure eintritt.

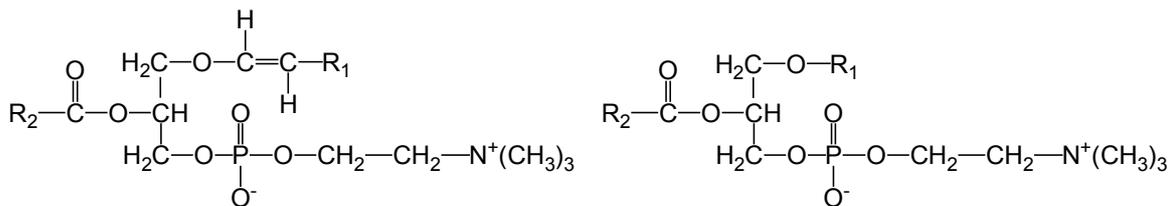
Die Phospholipide sind, wie erwähnt, Hauptbestandteile der Zellmembrane und werden meist auf der cytosolischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums, d. h. also in den Zellen selbst, synthetisiert, wobei die Zusammensetzung und die Eigenschaften der Zellmembrane für den Gewebetyp spezifisch sind. Eine Ausnahme bilden die Erythrozyten. Sie verlieren im Laufe ihres Heranreifens im roten Knochenmark die Fähigkeit zur Phospholipidsynthese¹⁴⁷. Dafür existiert hier ein schneller Austauschmechanismus zwischen den Zellwänden und den an Lipoproteine (s. S. 8) gebundenen Phospholipiden im Blutplasma¹⁴⁸, an dem allerdings nur ein Teil der Membranphospholipide teilnimmt^{149,150}. In der Leber synthetisierte Phospholipide (vor allem Phosphatidylcholin, daneben Phosphatidylethanolamin) werden dort in Lipoproteine eingebaut und in dieser Form an das Blut abgegeben. Im Fettgewebe können Phospholipide „abgefangen“ und in die Speicherform Triacylglycerin umgewandelt werden. In den Zellen dienen die Phospholipide, zusätzlich zu ihrer Funktion als Strukturkomponenten in Membranen, als Quellen für Mediatoren und Modulatoren für transmembranale Signalübertragungswege und beeinflussen so Zellproliferation und -differentiation¹⁵¹.

Zu den einzelnen Phospholipiden:

Phosphatidylserin ist ein Phospholipid, welches sich hauptsächlich in dem zum Zellinneren gerichteten Teil der Phospholipiddoppelschicht von Membranen befindet¹⁵². Phosphatidylethanolamin ist, neben Phosphatidylcholin, Hauptbestandteil der Plasmamembran von Zellen¹⁷. Phosphatidylcholin (Lecithin) findet sich in allen Zellen des Organismus, es hat Einfluß auf die Membranfluidität und dient als Aktivator bestimmter Rezeptoren. Dipalmityllecithin hat eine ausgeprägte Oberflächenwirkung und verhindert dank seiner Oberflächenspannung das Verkleben von Lungenbläschen. Phosphatidylcholin bildet außerdem den Hauptanteil der im Blutplasma vorhandenen Phospholipide¹⁵³. Lysophosphatidylcholin kommt nur zu einem geringen Teil in den

Zellmembranen vor, da die Ansammlung von Lysophosphatidylcholin morphologische Änderungen der Zellen hervorruft. Lysophosphatidylcholin wirkt stark hämolytisch; auf der Freisetzung von Lysophosphatidylcholin im Blut beruht ein Teil der Wirkung von Schlangen- und Bienengift^{20,21}. Phosphatidylinositol ist in der Zellmembran vieler Gewebe anzutreffen. Besonders wichtig ist es als Bestandteil eines Systems, durch das von außen kommende Signale in das Zellinnere übertragen werden, denn seine Spaltprodukte zählen zu den sogenannten second messengern. Sphingomyelin kommt in großen Mengen im Gehirn- und Nervengewebe vor. Cardiolipin (wurde erstmals aus Herzgewebe isoliert, daher der Name) ist ein in den Mitochondrien vorkommendes Phospholipid. Im Gegensatz zu den anderen Phospholipiden kommt es daher im Blutplasma selbst nicht vor¹⁵⁴.

Neben den bisher beschriebenen existieren noch zwei weitere Klassen von Phospholipiden, die Plasmalogene und die O-Alkyl-Phospholipide (Etherphospholipide)



Phosphatidylcholin Plasmalogen, PC-plas γ-O-Alkylphosphatidylcholin, PC-O-Alk

Abbildung 42 Strukturformel der Plasmalogene und O-Alkyl-Phospholipide

Ein Plasmalogen ist ein Phospholipid, das in 1-Stellung des Glycerins eine Enolethergruppe trägt. Es enthält nur ungesättigte Fettsäuren und als basische Gruppen Ethanolamin und Cholin. Die Plasmalogene spielen eine Rolle in der Funktion von Ionenkanälen in Zellen^{21,154}. Der größte Teil der mitochondrialen Phospholipide besteht aus Plasmalogenen. Plasmalogene können, aufgrund ihrer geringen Konzentration im Blutplasma, nicht detektiert werden¹⁵⁵. Von den Etherlipiden sei das 1-Octadecyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholin erwähnt, das als Signalstoff die Aggregation von Thrombozyten auslöst. Es entsteht als Zwischenprodukt bei der Plasmalogensynthese.

Biosynthese der Phospholipide^{21,23,154}

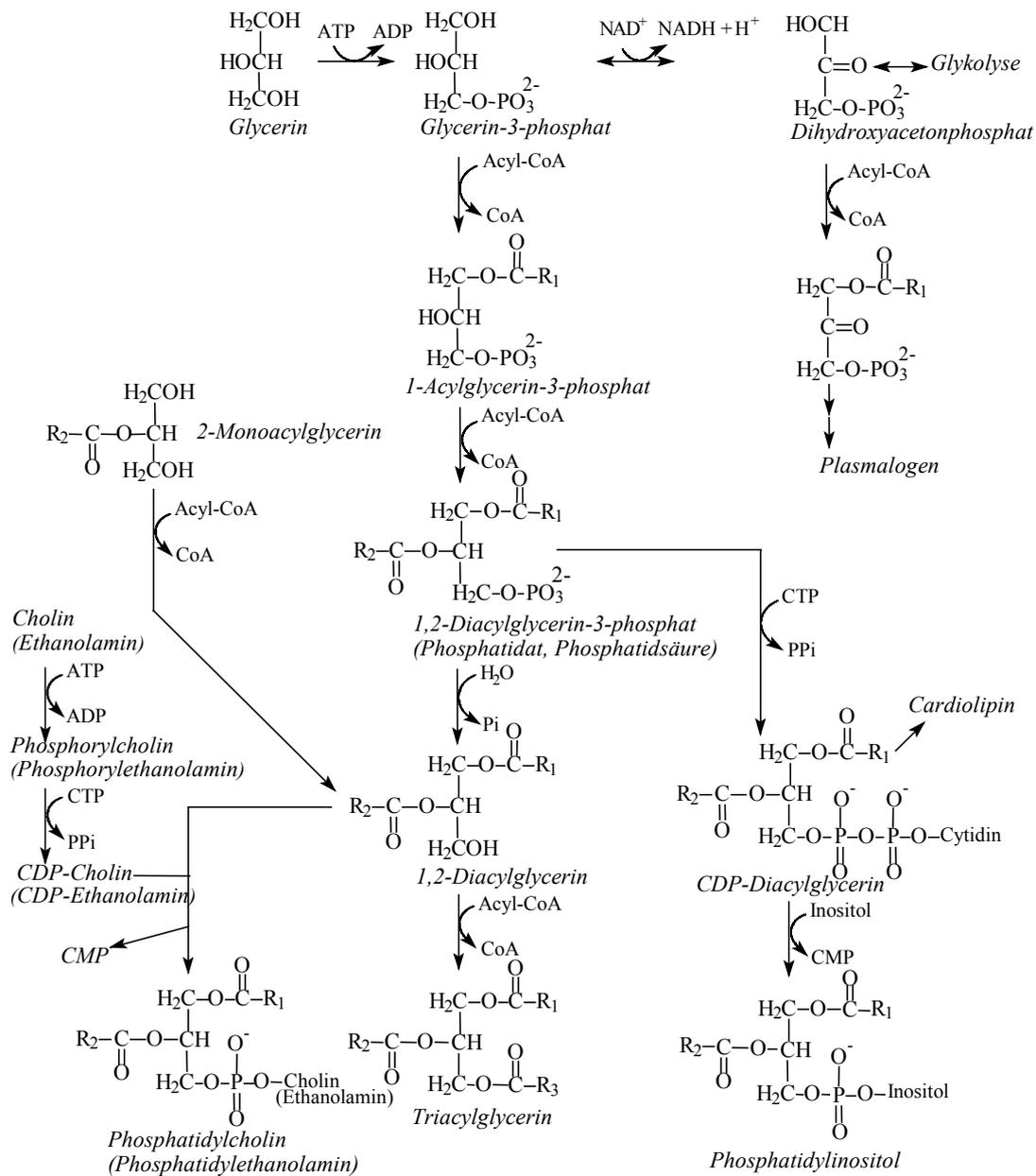


Abbildung 43 Biosynthese von Triacylglycerinen und Phospholipiden (ausgenommen Sphingomyelin)

Die Reaktionen verlaufen alle enzymkatalysiert.

Die Biosynthese der in dieser Arbeit behandelten Phospholipide, mit Ausnahme des Sphingomyelins, geht entweder von Phosphatidat (z. B. Phosphatidylinositol) oder aber von 1,2-Diacylglycerin (z. B. Phosphatidylcholin oder Phosphatidylethanolamin) aus. Phosphatidat wird, ausgehend von Glycerin-3-phosphat (dem schon erwähnten Stoffwechselprodukt der Glykolyse) durch zweifache Acylierung gebildet. Durch

enzymatische Hydrolyse entsteht das 1,2-Diacylglycerin, welches durch Acylübertragung zu einem Triacylglycerin reagiert.

Bei der Phosphatidylinositolbiosynthese reagiert Cytidintriphosphat mit Phosphatidat, wobei Cytidindiphosphat-Diacylglycerin (CDP-Diacylglycerin) entsteht. Dieses reagiert unter der Bildung von Phosphatidylinositol mit Inositol. Das hierfür verantwortliche Enzym ist die CDP-Diacylglycerin-Inositoltransferase.

Im Verlauf der Biosynthese von Phosphatidylcholin bzw. Phosphatidylethanolamin müssen Cholin bzw. Ethanolamin zunächst aktiviert werden. Diese Aktivierung erfolgt in einem zweistufigen Prozeß. Zunächst entsteht durch ATP-abhängige Phosphorylierung das entsprechende Monophosphat. In einer zweiten Reaktion reagiert dieses mit Cytidintriphosphat, wobei entweder Cytidindiphosphocholin (CDP-Cholin) oder Cytidindiphosphoethanolamin (CDP-Ethanolamin) entstehen. In dieser Form kann Cholin bzw. Ethanolamin mit 1,2-Diacylglycerin reagieren, wobei die phosphorylierte Base (entweder Phosphocholin oder Phosphoethanolamin) auf das Diacylglycerin übertragen wird, so daß entweder Phosphatidylcholin oder Phosphatidylethanolamin entstehen. Das für die Bildung von Phosphatidylethanolamin verantwortliche Enzym ist die Phosphoethanolamin-Acylglycerintransferase.

Cardiolipin (Diphosphatidylglycerin) entsteht aus Phosphatidylglycerin und CDP-Diacylglycerin. Phosphatidylglycerin wiederum wird aus CDP-Diacylglycerin und Glycerin-3-phosphat gebildet.

Die Phospholipide lassen sich außerdem teilweise ineinander überführen. Phosphatidylserin entsteht in tierischen Geweben durch Austausch des Ethanolaminrestes im Phosphatidylethanolamin gegen Serin. Durch Decarboxylierung von Phosphatidylserin kann aus diesem wieder Phosphatidylethanolamin gebildet werden. Durch schrittweise Methylierung des Ethanolaminrestes mit S-Adenosylmethionin als Methylendonator in der Leber kann aus Phosphatidylethanolamin das Phosphatidylcholin entstehen.

Auf die Synthese von Plasmalogenen und O-Alkyl-Phospholipiden wird hier nicht genauer eingegangen, da Plasmalogene, wie bereits erwähnt, aufgrund ihrer geringen Konzentration im Blutplasma nicht detektiert werden können und der Peak für die O-Alkyl-Phospholipide nicht oft auftritt und daher diese beiden Phospholipidgruppen in den späteren Auswertungen nicht berücksichtigt werden.

Biosynthese von Sphingomyelin: Durch enzymatische, Pyridoxalphosphat-katalysierte Kopplung von Serin mit Palmitoyl-Coenzym A entsteht unter Decarboxylierung das Dihydrosphinganin das, ebenfalls enzymatisch katalysiert, durch NADPH zu Sphinganin (Dihydrosphingosin) reduziert wird. Durch ein Flavoprotein, eine Desaturase, kann schließlich noch eine Doppelbindung eingeführt werden. Durch Addition einer Fettsäurekette entsteht ein Ceramid, aus welchem, durch enzymatische Übertragung der Cholineinheit, Sphingomyelin entsteht. Das hierbei gebildete Diacylglycerin kann wiederum weiterreagieren z. B. zu Triglyceriden.

Sphingosin enthält eine trans-Doppelbindung. Der sterischen Anordnung nach ist es eine D-erythro-Form. Das Sphingosin ist die Muttersubstanz des Sphingomyelins und vieler Glykolipide. Die natürlich vorkommenden Sphingolipide tragen an der Amino-Gruppe stets einen Fettsäurerest. Man nennt diese Säureamide, die in geringer Menge frei vorkommen (und Vorstufen der Cerebroside sind), Ceramide.

Die Lysophosphatidylcholine werden, da sich hauptsächlich durch den Abbau aus Phosphatidylcholin entstehen, im nächsten Abschnitt besprochen.

Abbau von Phospholipiden^{21,23,154}

Der Abbau der Phospholipide mit Glyceringerüst erfolgt mit Hilfe der sogenannten Phospholipasen, einer Gruppe von Enzymen, durch die Fettsäureester- oder Phosphorsäureestergruppen hydrolytisch gespalten werden. Es gibt vier dieser Enzyme, die, je nach Bindung die gespalten wird, in die Klassen A₁, A₂, C und D eingeteilt werden. Man spricht dabei von der Phospholipase A₁ (PLA₁), Phospholipase A₂ (PLA₂) usw. In der folgenden Abbildung sind die Angriffspunkte der Phospholipasen dargestellt:

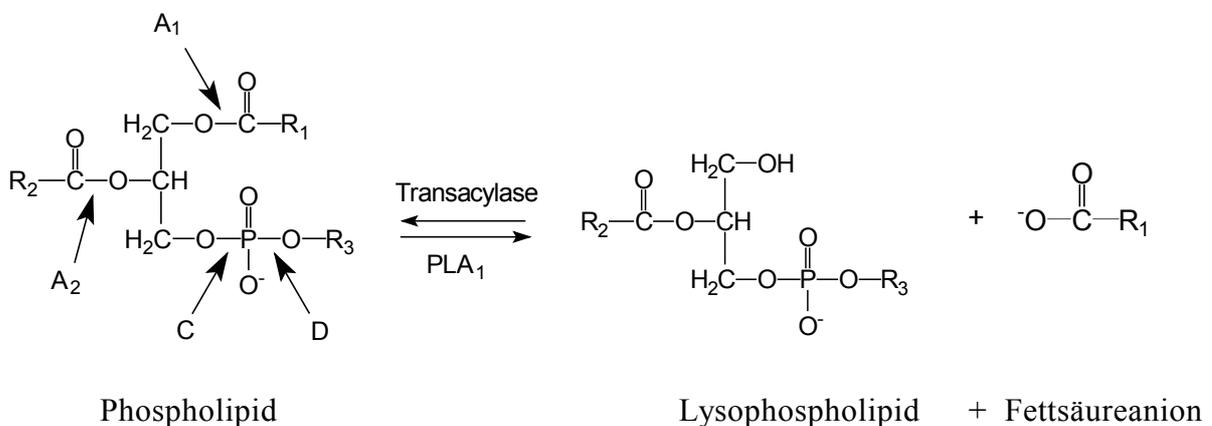


Abbildung 44 Abbau von Phospholipiden mit Glyceringerüst durch Phospholipasen

Die Phospholipase A₁ katalysiert den Angriff der Esterbindung in Position 1, während die Phospholipase A₂ die Hydrolyse der Esterbindung in Position 2 katalysiert, wobei jeweils eine freie Fettsäure und das entsprechende Lysophospholipid entstehen. Dieses kann mit Hilfe von Acyl-CoA in Anwesenheit einer entsprechenden Transacylase reacyliert werden oder durch eine Lysolipase, die die noch vorhandene Acylgruppe entfernt, weiter abgebaut werden.

Es gibt drei Hauptformen der Phospholipase A₂: die cytosolische PLA₂, (cPLA₂) im Inneren der Zellen, die sekretorische, nicht-pankreatische Phospholipase A₂ (sPLA₂) vom Typ II, welche im Blutplasma vorkommt und die sekretorische, pankreatische Phospholipase A₂, die sich im Darm befindet. Die beiden letztgenannten Phospholipasen werden durch Leberzellen freigesetzt¹⁵⁶. Wie bereits erwähnt, können Erythrozyten keine Phospholipide synthetisieren, sie enthalten aber die Phospholipasen A₂ und A₁ und eine Transacylase, über die die Relation zwischen Phosphatidylcholin und Lysophosphatidylcholin an der Innenseite der Membran eingestellt wird¹⁵⁰. Die Phospholipase C katalysiert die Hydrolyse der Esterbindung in Position 3. Hierbei entstehen 1,2-Diacylglycerin und ein Phosphomonoester. Bei dieser Phospholipase handelt es sich um ein membranständiges Enzym, welches auch als Effektor bei G-Protein-vermittelten physiologischen Prozessen aktiv sein kann. Die Phospholipase D ist ein hauptsächlich in Pflanzen vorkommendes Enzym, das die Abspaltung stickstoffhaltiger Basen aus Phospholipiden mit Glyceringerüst katalysiert.

Zu den Lysophosphatidylcholinen, die mit Hilfe von PLA₁ (LPC 2) bzw. PLA₂ (LPC 1) aus Phosphatidylcholin entstehen, läßt sich sagen, daß es für sie noch einen weiteren Syntheseweg gibt: Das hierfür benötigte Enzym ist die Lecithin:Cholesterin-Acyltransferase (LCAT). Sie findet sich im menschlichen Blutplasma und katalysiert den Transfer eines Fettsäurerestes aus der Position 2 von Phosphatidylcholin (Lecithin) auf Cholesterin, so daß der entsprechende Cholesterinester und Lysophosphatidylcholin 1 entstehen. Allen Phospholipasen ist eine hohe Spezifität bezüglich der Katalyse des Angriffs bestimmter Bindungen gemeinsam. für jeden der verschiedenen Substituenten des Glycerinskelettes existiert eine eigene Phospholipase. Die bei vollständigem Abbau der Phospholipide entstehenden Produkte können wieder der Resynthese der Phospholipide zugeführt werden. Phospholipasen üben in der Natur verschiedene Funktionen aus. Viele sind Verdauungsenzyme, die in hoher Konzentration im Darmsaft, in bakteriellen Sekreten und in Giften vorkommen. Sie sind außerdem an Enzymkaskaden

beteiligt, die aktive Lipide erzeugen oder Signale übertragen. So ist z. B. die Phospholipase C am Phosphatidylinositol-Metabolismus beteiligt oder die Phospholipase A₂ bei der Produktion von Arachidonsäure und ihrer Derivate.

Abbau des Sphingomyelins: Beim Abbau des Sphingomyelins spielt eine spezifische Sphingomyelinase eine bedeutende Rolle, welche den Phosphorylcholinrest abspaltet und auf diese Weise Sphingomyelin in Phosphorylcholin und Ceramid (welches dann weiter abgebaut werden kann) zerlegt.

6 Literaturverzeichnis

- ¹ F. Bloch, W. W. Hansen, M. Packard, *Phys. Rev.* **1946**, *70*, 474-485.
- ² E. M. Purcell, H. C. Torrey, R. V. Pound, *Phys. Rev.* **1946**, *69*, 37-38.
- ³ J. J. H. Ackermann, T. H. Grove, G. G. Wang, D. G. Gadian, G. K. Radda, *Nature* **1980**, *283*, 167-170.
- ⁴ R. E. Gordon, P. E. Henley, D. Shaw, D. G. Gadian, P. Styles, P. J. Bore, L. Chan, *Nature* **1980**, *287*, 736-738.
- ⁵ J. R. Griffiths, E. Cady, R. H. Edwards, V. R. Mc Cready, D. R. Wilkie, E. Wilshaw, *Lancet* **1983**, *1*, 1435-1436.
- ⁶ L. L. Cheng, C. L. Lean, A. Bogdanova, S. C. Wright, J. L. Ackermann, T. J. Brady, L. Garrido, *Magn. Reson. Med.* **1996**, *36*, 653-658.
- ⁷ L. L. Cheng, M. J. MA, L. Becerro, T. Ptak, I. Tracy, A. Lackner, R. G. Gozalez, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6408-6413.
- ⁸ D. Moka, R. Vorreuther, H. Schicha, M. Spraul, E. Humpfer, M. Lipinski, P. J. D. Foxall, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *Anal. Comm.* **1997**, *34*, 107-109.
- ⁹ G. Hagberg, *NMR Biomed.* **1998**, *11*, 148-156.
- ¹⁰ P. J. G. Lisboa, S. P. J. Kirby, A. Vellido, Y. Y. B. Lee, W. El-Dereby, *NMR Biomed.* **1998**, *11*, 225-234.
- ¹¹ E. Holmes, A. W. Nicholls, J. C. Lindon, S. Ramos, M. Spraul, P. Neidig, S. C. Connor, J. Connelly, S. J. P. Damment, J. Haselden, J. K. Nicholson, *NMR Biomed.* **1998**, *11*, 235-244.
- ¹² T. F. Bathen, J. Krane, T. Engan, K. S. Bjerve, D. Axelson, *NMR Biomed.* **2000**, *13*, 271-288.
- ¹³ U. E. Nydegger, R. E. Butler, *Cancer Res.* **1972**, *32*, 1756-1760.
- ¹⁴ J. M. Argiles, J. Azcon-Bieto, *Mol. Cell. Biochem.* **1988**, *81*, 3-17.
- ¹⁵ L. Levin, W. Gevers, *SA Med. J.* **1981**, *4*, 518-521.
- ¹⁶ M. Kriat, J. Vion-Dury, R. Favre, D. Maraninchi, J. R. Harlé, S. Confort-Gouny, M. Sciaky, E. Fontanarava, P. Viout, P. J. Cozzone, *Biochimie* **1992**, *74*, 913-918.
- ¹⁷ F. Podo, J. D. de Certaines, *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 1305-1316.
- ¹⁸ M. Kuliszkiwicz-Janus, W. Janus, *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 1587-1594.
- ¹⁹ D. Voet, J. G. Voet, *Biochemie*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim **1992**.

- ²⁰ Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, Verlag Walter de Gruyter, Berlin **1990**.
- ²¹ P. Karlson, D. Doenecken, *Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1994**.
- ²² G. Löffler, P. E. Petrides, *Physiologische Chemie*, Springer-Verlag, Berlin **1990**.
- ²³ L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum-Verlag, Heidelberg **1994**.
- ²⁴ A. Cantafora, I. Blotta, *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 1441-1449.
- ²⁵ A. M. Novikov, N. V. Merabishvili, L. S. Bassalyk, *Vopr. Onkol.* **1982**, *28*, 67-73.
- ²⁶ J. D. de Certaines, L. Nadal, G. Leray, H. Serrai, C. J. Lewa, *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 1451-1460.
- ²⁷ M. Barclay, V. P. Skipski, O. Terebus-Kekish, E. M. Greene, R. J. Kaufman, C. Chester Stock, *Cancer Res.* **1970**, *30*, 2420-2430.
- ²⁸ T. E. Merchant, P. W. de Graaf, B. D. Minsky, H. Obertop, T. Glonek, *NMR Biomed.* **1993**, *6*, 187-193.
- ²⁹ K. Onodera, A. Okulo, K. Yasumato, T. Susuki, K. Nomoto, *Jpn. J. Cancer Res.* **1986**, *77*, 1201-1206.
- ³⁰ T. E. Merchant, J. N. Kasinos, P. W. de Graaf, B. D. Minsky, L. W. Gierke, T. Glonek, *Int. J. Colorectal Dis.* **1991**, *6*, 121-126.
- ³¹ I. J. Cox, J. D. Bell, C. J. Peden, R. A. Iles, C. S. Foster, P. Watanapa, R. C. Williamson, *NMR Biomed.* **1992**, *5*, 114-120.
- ³² A. Barzilai, A. Horowitz, A. Geier, H. Degani, *Cancer* **1991**, *67*, 2919-2925.
- ³³ M. Kuliszkiwicz-Janus, W. Janus, *NMR Biomed.* **1995**, *8*, 127-132.
- ³⁴ K. Raffelt, D. Moka, F. Süllentrop, M. Dietlein, J. Hahn, H. Schicha, *NMR Biomed.* **2000**, *13*, 8-13.
- ³⁵ W. G. Negendank, R. Sauter, T. R. Brown, J. L. Evelhoch, A. Falini, E. D. Gotsis, A. Heerschap, K. Kamada, B. C. Lee, M. M. Mengeot, E. Moser, K. A. Padavic-Shaller, J. A. Sanders, T. A. Spraggins, A. E. Stillman, B. Terwey, T. J. Vogl, K. Wicklow, R. A. Zimmerman, *J. Neurosurg.* **1996**, *84*, 449-458.
- ³⁶ S. Saikawa, Y. Suzuki, M. Tomoi, M. Yoshida, Y. Ishii, K. Okada, *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi.* **1995**, *86*, 1673-1680.
- ³⁷ J. M. Star-Lack, E. Adalsteinsson, M. F. Adam, D. J. Terris, H. A. Pinto, J. M. Brown, D. M. Spielman, *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **2000**, *21*, 183-193.

- ³⁸ I. S. Gribbestad, B. Sitter, S. Lundgren, J. Krane, D. Axelson, *Anticancer Res.* **1999**, *19*, 1737-1746.
- ³⁹ C. E. Mountford, C. L. Lean, R. Hancock, S. Dowd, W. B. Mackinnon, M. H. Tattersall, P. Russell, *Invasion Metastasis* **1993**, *13*, 57-71.
- ⁴⁰ H. Hanaoka, Y. Yoshioka, I. Ito, K. Niitu, N. Yasuda, *Magn. Reson. Med.* **1993**, *29*, 436-440.
- ⁴¹ C. L. Lean, R. C. Newland, D. A. Ende, E. L. Bokey, I. C. Smith, C. E. Mountford, *Magn. Reson. Med.* **1993**, *30*, 525-533.
- ⁴² J. Peeling, G. Sutherland, K. Marat, E. Tomchuk, E. Block, *J. Neurosurg.* **1988**, *68*, 931-937.
- ⁴³ M. Kriat, J. Vion-Dury, S. Gonfort-Gouny, R. Favre, P. Viout, M. Sciaky, H. Sari, P. J. Cozzone, *J. Lipid Res.* **1993**, *34*, 1009-1019.
- ⁴⁴ D. Moka, R. Vorreuther, H. Schicha, M. Spraul, E. Humpfer, M. Lipinski, P. J. D. Foxall, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *17*, 125-132.
- ⁴⁵ K. Millis, P. Weybright, N. Campbell, J. A. Fletcher, C. D. Fletcher, D. G. Cory, S. Singer, *Magn. Reson. Med.* **1999**, *41*, 257-267.
- ⁴⁶ W. G. Negendank, *NMR Biomed.* **1992**, *5*, 303-324.
- ⁴⁷ F. Podo, *NMR Biomed.* **1999**, *12*, 413-439.
- ⁴⁸ N. R. Aiken, R. J. Gillies, *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 1393-1398.
- ⁴⁹ J. D. de Certaines, V. A. Larsen, F. Podo, G. Carpinelli, O. Briot, O. Henriksen, *NMR Biomed.* **1993**, *6*, 345-365.
- ⁵⁰ M. O. Leach, M. Verrill, J. Glaholm, T. A. D. Smith, D. J. Collins, G. S. Payne, J. C. Sharp, S. M. Ronen, V. R. McCrady, T. J. Powles, I. E. Smith, *NMR Biomed.* **1998**, *11*, 314-340.
- ⁵¹ P. F. Agris, I. D. Campbell, *Science* **1982**, *216*, 1325-1327.
- ⁵² P. F. Daly, R. C. Lyon, P. J. Faustino, J. S. Cohen, *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 14875-14878.
- ⁵³ T. C. Grundfest, S. Vijayakumar, N. J. Baldwin, A. W. Majors, I. Koralis, *Magn. Res. Med.* **1989**, *10*, 125-134.
- ⁵⁴ H. Wagner, R. Oberneder, M. Busch, M. Weiss, N. Schmeller, P. E. Petrides, Deutsche Krebsgesellschaft e. V., Deutsche Krebshilfe e. V., Tumorzentrum München, *Nierenkarzinom*, www.krebsinfo.de.

- ⁵⁵ H. J. Senn, P. Drings, A. Glas, W. F. Jungi, *Checkliste Onkologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1992**.
- ⁵⁶ P. J. Gold, A. Fefer, J. A. Thompson, *Seminars in Urologic Oncology* **1996**, *14*, 216-222.
- ⁵⁷ H. P. Schmid, J. Szabo, *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.* **1997**, *86*, 837-843.
- ⁵⁸ D. G. Skinner, R. B. Colvin, C. D. Vermillion, *Cancer* **1971**, *28*, 1165-1177.
- ⁵⁹ K. A. Karlsson, B. E. Samuelsson, T. Scherstén, G. O. Steen, L. Wahlqvist, *Biochim. Biophys. Acta* **1974**, *337*, 349-355.
- ⁶⁰ R. L. Gebhard, R. V. Clayman, W. F. Prigge, R. Figenschau, N. A. Staley, C. Reese, B. Bear, *J. Lipid Res.* **1987**, *28*, 1177-1184.
- ⁶¹ R. V. Clayman, L. E. Bilhartz, D. K. Sprady, L. M. Buja, J. M. Dietschy, *FEBS Lett.* **1986**, *196*, 87-90.
- ⁶² M. Rudling, V. P. Collins, *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, *1299*, 75-79.
- ⁶³ N. Sakakibara, S. Gasa, K. Kamio, A. Makita, T. Koyanagi, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 335-339.
- ⁶⁴ T. Kobayashi, K. Honke, K. Kamio, N. Sakakibara, S. Gasa, N. Miyao, T. Tsukamoto, I. Ishizuka, T. Miyazaki, A. Makita, *Br. J. Cancer* **1993**, *67*, 76-80.
- ⁶⁵ S. Gasa, M. T. Casl, A. Makita, N. Sakakibara, T. Koyanagi, T. Atsuta, *Eur. J. Biochem.* **1990**, *189*, 301-306.
- ⁶⁶ D. J. Talley, J. A. Sadowski, S. A. Boler, J. J. Li, *Int. J. Cancer* **1983**, *32*, 617-621.
- ⁶⁷ L. Chan, G. Radda, B. D. Ross, *J. Mag. Res. Med.* **1984**, *2*, 130-132.
- B. D. Ross, V. M. Marshall, M. B. Smith, S. B. Bartlett, D. M. Freeman, *Lancet* **1984**, *1*, 641-646.
- P. J. Bore, L. Chan, M. E. French, D. G. Gadian, G. K. Radda, B. D. Ross, *Kidney Int.* **1981**, *20*, 686-687.
- aus: B. Ross, D. Freeman, L. Chan, *Kidney Int.* **1986**, *29*, 131-141.
- ⁶⁸ D. Moka, R. Vorreuther, H. Schicha, M. Spraul, E. Humpfer, M. Lipinski, P. J. D. Foxall, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1998**, *17*, 125-132.
- ⁶⁹ A. R. Tate, P. J. D. Foxall, E. Holmes, D. Moka, M. Spraul, J. K. Nicholson, J. C. Lindon, *NMR Biomed.* **2000**, *13*, 64-71.

- ⁷⁰ M. Kaufmann, G. v. Minckwitz, *Onkologie*, Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg **1996**.
- ⁷¹ M. W. Beckmann, D. Timmermann, *Der Gynäkologe* **1997**, 30, 85-91.
- ⁷² I. B. Runnebaum, A. Mollenkopf, R. Kreinberg, H. G. Meerpohl, *Der Onkologe* **1998**, 4, 1096-1100.
- ⁷³ H. Riess, W. Eiermann, *Internistische Onkologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1994**.
- ⁷⁴ J. Baltzer, H. Mickan, *Gynäkologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1994**.
- ⁷⁵ G. Bastert, S. D. Costa, *Therapiekonzepte Onkologie*, Springer-Verlag, Berlin **1995**.
- ⁷⁶ W. Weber, *Ambulante Onkologie*, Perimed Verlag, Erlangen **1995**.
- ⁷⁷ M. S. Piver, *Ovarian Malignancies, Diagnostic and Therapeutic Advances*, Churchill Livingstone, Edinburgh **1987**.
- ⁷⁸ H. Schmidt-Matthiesen, G. Bastert, *Gynäkologische Onkologie*, Schattauer-Verlag, Stuttgart **1995**.
- ⁷⁹ H. Meden, *Ovarialkarzinom*, Verlag Walter de Gruyter, Berlin **1996**.
- ⁸⁰ M. M. Schapira, D. B. Matchar, M. J. Young, *Ann. intern. Med.* **1993**, 118, 838-843.
- ⁸¹ R. C. Bast, F. J. Xu, Y. H. Yu, S. Barnhill, Z. Zhang, G. B. Mills, *Int. J. Biol. Markers* **1998**, 13, 179-187.
- ⁸² R. Molina, B. Ojeda, X. Filella, G. Borrás, J. Jo, E. Mas, J. J. Lopez, A. Ballesta, *Tumour Biol.* **1992**, 13, 278-286.
- ⁸³ E. Jellum, A. Andersen, P. Lund-Larsen, L. Theodorsen, H. Orjasaeter, *Environ. Health Perspect.* **1995**, 103 Suppl. 3, 85-88.
- ⁸⁴ R. C. Bast, C. M. Boyer, F. J. Xu, J. Wiener, R. Dabel, R. Woolas, I. Jacobs, A. Berchuck, *J. Cell. Biochem. Suppl.* **1995**, 23, 219-222.
- ⁸⁵ P. E. Schwartz, S. K. Chambers, J. T. Chambers, J. Gutmann, N. Katopodis, R. Foemmel, *Cancer* **1987**, 60, 353-361.
- ⁸⁶ P. Cane, C. Azen, E. Lopez, L. D. Platt, B. Y. Karlan, *Gynecol. Oncol.*, **1995**, 57, 240-245.
- ⁸⁷ O. R. Köchli, *Gynäkol. Geburtsh. Rundsch.* **1994**, 34, 123-129.
- ⁸⁸ G. Hausler, B. Schurz, *Wien. Med. Wochenschr.* **1996**, 146, 8-10.
- ⁸⁹ U. Dold, P. Hermanek, K. Höffken, H. Sack, *Praktische Tumorthherapie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1993**.

- ⁹⁰ M. Medl, C. Peters-Engl, M. Stiskal, K. J. Kulenkampff, S. Leodolter, H. Czembirek, *Gynäkol. Geburtsh. Rundsch.* **1994**, *34*, 130-132.
- ⁹¹ H. Salzer, E. Gitsch, C. Dittrich, P. Sevelde, K. Karer, M. Schemper, G. Stempel-Smekal, M. Langer, G. Wagner, H. Rainer, *Geburtshilfe Frauenheilkd.* **1985**, *45*, 761-768.
- ⁹² W. B. Mackinnon, P. Russell, G. L. May, C. E. Mountford, *Int. J. Gynecol. Cancer*, **1995**, *5*, 211-221.
- ⁹³ J. C. Wallace, G. P. Raaphorst, R. L. Somorjai, C. E. Ng, M. Fung Kee Fung, M. Senterman, I. C. Smith, *Magn. Reson. Med.*, **1997**, *38*, 569-576.
- ⁹⁴ C. E. Mountford, J. K. Saunders, G. L. May, K. T. Holmes, P. G. Williams, R. M. Fox, M. H. Tattersall, J. R. Barr, P. Russell, I. C. Smith, *Lancet* **1986**, *1*, 651-653.
- ⁹⁵ W. B. Mackinnon, G. L. May, C. E. Mountford, *Eur. J. Biochem.* **1992**, *205*, 827-839.
- ⁹⁶ L. F. Massuger, P. B. van Vierzen, U. Engelke, A. Heerschap, R. Wevers, *Cancer* **1998**, *82*, 1726-1730.
- ⁹⁷ E. A. Boss, S. H. Moolenaar, L. F. A. G. Massuger, H. Boonstra, U. F. H. Engelke, J. G. N. de Jong, R. A. Wevers, *NMR Biomed.* **2000**, *13*, 297-305.
- ⁹⁸ M. Okita, D. C. Gaudette, G. B. Mills, B. J. Holub, *Int. J. Cancer* **1997**, *71*, 31-34.
- ⁹⁹ H. Gadomska, J. Janecki, L. Marianowski, G. Nowicka, *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **1997**, *57*, 287-293.
- ¹⁰⁰ M. N. Ostroumova, I. G. Kovalenko, L. M. Bershtein, E. V. Tsyrlina, V. M. Dilman, *Vopr. Onkol.* **1986**, *32*, 34-43.
- ¹⁰¹ Z. Kopczyński, J. Kuzniak, A. Thielemann, J. Kaczmarek, M. Rybczyńska, *Br. J. Cancer* **1998**, *78*, 466-471.
- ¹⁰² C. Gercel-Taylor, D. L. Doering, F. B. Kraemer, D. D. Taylor, *Gynecol. Oncol.* **1996**, *60*, 35-41.
- ¹⁰³ E. S. Pizer, F. D. Wood, H. S. Heine, F. E. Romantsev, G. R. Pasternack, F. P. Kuhajda, *Cancer Res.* **1996**, *56*, 1189-1193.
- ¹⁰⁴ F. Sülentrop, *Diplomarbeit*, Köln **1997**.
- ¹⁰⁵ T. Engan, *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 1461-1472.
- ¹⁰⁶ E. London, G. W. Geigenson, *J. Lipid. Res.* **1979**, *20*, 408-412.
- ¹⁰⁷ S. Bradamante, E. Barchiesi, L. Barenghi, F. Zoppi, *Anal. Biochem.* **1990**, *185*, 299-303.

- ¹⁰⁸ J. M. Pearce, R. A. Komeroski, *Magn. Res. Med.* **1993**, *29*, 724-731.
- ¹⁰⁹ D. G. Gorenstein, *Phosphorus-31 NMR*, Academic Press, London **1987**.
- ¹¹⁰ K. Raffelt, *Diplomarbeit*, Köln **1996**.
- ¹¹¹ D. S. Marinier, R. Letoublon, J. Delman, *J. Lipid Res.* **1988**, *29*, 1237-1243.
- ¹¹² R. Laatikainen, M. Niemitz, W. J. Malaisse, M. Biesemans, R. Willem, *Magn. Res. Med.* **1996**, *36*, 359-365.
- ¹¹³ R. L. Vold, J. S. Wangle, M. P. Klein, D. E. Phelps, *J. Chem. Phys.* **1968**, *48*, 3831-3832.
- ¹¹⁴ S. Antonapoulou, C. A. Denopoulos, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1996**, *28*, 43-51.
- ¹¹⁵ H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart **1992**.
- ¹¹⁶ J. K. Nicholson, P. J. D. Foxall, M. Spraul, R. D. Farrant, J. C. Lindon, *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 793-811.
- ¹¹⁷ M. Horn, R. Bollandt, *Multiple Tests und Auswahlverfahren*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart **1995**.
- ¹¹⁸ M. Walter, *Ovarialkarzinom*, **1996**, nur zum internen Gebrauch.
- ¹¹⁹ O. Beahrs, D. Henson, R. Hutter, B. Kennedy, *Manual for the staging of cancer*, Lipincoff, Philadelphia, **1992** aus: T. H. Helbich, A. Stadler, G. Wolf, *Radiologe* **1999**, *39*, 546-554.
- ¹²⁰ W. Heindel, *Lokalisierte in-vivo NMR-Spektroskopie*, Georg Tieme Verlag, Stuttgart **1993**.
- ¹²¹ S. Garrod, E. Humpfer, M. Spraul, S. C. Connor, S. Polley, J. Connelly, J. C. Lindon, J. K. Nicholson, E. Holmes, *Magn. Res. Med.* **1999**, *41*, 1108-1118.
- ¹²² J. M. Star-Lack, E. Adalsteinsson, G. E. Gold, D. M. Ikeda, D. M. Spielman, *Magn. Reson. Med.* **2000**, *43*, 325-330.
- ¹²³ L. E. Böttiger, *Acta Med. Scand.* **1973**, *193*, 49-52.
- ¹²⁴ C. Harvengt, J. P. Desager, V. Gaspard, M. Lepot, *Contraception* **1988**, *37*, 565-575.
- ¹²⁵ G. J. Wolbink, C. Schalkwijk, J. W. Baars, J. Wagstaff, H. van den Bosch, C. E. Hack, *Cancer Immunol. Immunother.* **1995**, *41*, 287-292.
- ¹²⁶ M. P. Gillet, V. Teixeira, R. Dimenstein, *Nephrol. Dial. Transplant.* **1993**, *8*, 407-411.

- ¹²⁷ A. Vecino, J. L. Teruel, J. L. Navarro, J. M. Cesar, *Am. J. Nephrol.* **1996**, *16*, 409-411.
- ¹²⁸ R. Bleiber, W. Eggert, G. Reichmann, D. Kunze, *Acta Haematol.* **1980**, *63*, 117-123.
- ¹²⁹ A. Kalofoutis, P. Stergiopoulos, G. Jullien, *Clin. Chem.* **1976**, *22*, 1938-1939.
- ¹³⁰ P. V. Subbaiah, R. A. Rodby, *Metabolism* **1994**, *43*, 1126-1133.
- ¹³¹ C. Breier, H. J. Lisch, H. Drexel, H. Braunsteiner, *Schweiz. Med. Wochenschr.* **1983**, *113*, 909-913.
- ¹³² C. W. Hendrickse, S. Radley, I. A. Donovan, M. R. Keighley, J. P. Neoptolemos, *Br. J. Surg.* **1995**, *82*, 475-478.
- ¹³³ J. N. Kasimos, T. E. Merchant, L. W. Gierke, T. Glonek, *Cancer Res.* **1990**, *50*, 527-532.
- ¹³⁴ K. Nakagami, T. Uchida, S. Ohwada, Y. Koibuchi, Y. Suda, T. Sekine, Y. Morishita, *Jpn. J. Cancer Res.* **1999**, *90*, 419-424.
- ¹³⁵ T. E. Merchant, J. N. Kasimos, P. W. de Graaf, B. D. Minsky, L. W. Gierke, T. Glonek, *Int. J. Colorectal Dis.* **1991**, *6*, 121-126.
- ¹³⁶ I. Kiricuta, O. Bojan, R. Comes, R. Cristian, *Arch. Geschwulstforsch.* **1979**, *49*, 106-112.
- ¹³⁷ T. K. Basu, D. C. Williams, *Oncology* **1975**, *31*, 172-176.
- ¹³⁸ I. A. Bani, C. M. Williams, P. S. Boulter, J. W. Dickerson, *Br. J. Cancer* **1986**, *54*, 439-446.
- ¹³⁹ A. Barzilai, A. Horowitz, A. Geier, H. Degani, *Cancer* **1991**, *67*, 2919-2925.
- ¹⁴⁰ P. V. Subbaiah, M. Liu, T. R. Witt, *Lipids* **1997**, *32*, 157-162.
- ¹⁴¹ L. Cantoni, S. B. Curri, P. Andreuzzi, P. Rocchetti, *Clin. Chim. Acta* **1975**, *60*, 405-408.
- ¹⁴² Y. Gabr, M. Mahfouz, *Acta Biol. Med. Ger.* **1975**, *34*, 1827-1833.
- ¹⁴³ D. Y. Kim, K. B. Kim, O. D. Kim, J. K. Kim, *J. Korean. Med. Sci.* **1998**, *13*, 49-53.
- ¹⁴⁴ T. Kobayashi, K. Honke, K. Kamio, *Br. J. Cancer* **1993**, *67*, 76-80.
- ¹⁴⁵ V. V. Shliapnikov, *Arkh. Patol.* **1986**, *48*, 53-57.
- ¹⁴⁶ D. Y. Kim, K. B. Kim, O. D. Kim, J. K. Kim, *J. Korean. Med. Sci.* **1998**, *13*, 49-53.
- ¹⁴⁷ A. K. Percy, E. Schnell, *Biochemistry* **1973**, *12*, 2456.

-
- ¹⁴⁸ M. H. Nouri-Sorkhabi, D. R. Sullivan, *Eur. J. Biochem.* **1996**, *235*, 648-652.
- ¹⁴⁹ C. F. Reed, M. Murphy, *J. Clin. Invest.* **1968**, *47*, 749.
- ¹⁵⁰ W. Renooij, L. M. G. von Golde, *Eur. J. Biochem.* **1976**, *61*, 53-58.
- ¹⁵¹ R. Katz-Brull, H. Degani, *Anticancer Res.* **1996**, *16*, 1375-1380.
- ¹⁵² G. J. Wolbink, C. Schalkwijk, *Cancer Immunol. Immunother.* **1995**, *41*, 287-292.
- ¹⁵³ R. F. Schmidt, G. Thews, *Physiologie des Menschen*, Springer-Verlag, Berlin **1990**.
- ¹⁵⁴ M. Harper, R. Mayes, *Medizinische Biochemie*, Springer-Verlag, Berlin **1987**.
- ¹⁵⁵ H. K. Mangold, F. Paltauf, *Ether Lipids*, Academic Press, London **1983**.
- ¹⁵⁶ D. H. Goddard, J. S. Bomalaski, *Cancer Letters* **1996**, *102*, 1-6.

Kurzzusammenfassung

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur quantitativen ^{31}P -NMR- und ^1H -NMR-spektroskopischen Bestimmung des Gehalts an Phospholipiden, bzw. Lipiden, im menschlichen Blutplasma entwickelt und zur Untersuchung an Tumorpatienten eingesetzt. Untersucht wurden mit dieser Methode Patienten mit Nierenzellkarzinom, Dickdarmkarzinom, Ovarialkarzinom, Mammakarzinom und gesunde Probanden. Es ließen sich tumorspezifisch signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Probanden gleichen Alters feststellen. Die Patienten zeigten in Abhängigkeit von der Tumorart niedrigere Konzentrationen für bestimmte Phospholipidklassen und bestimmte Lipidbestandteile im Vergleich zu gesunden Probanden. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Konzentrationsveränderungen im Blutplasma der Patienten mit dem Tumorstadium und der Präsenz von Metastasen korrelierten. Sie normalisierten sich, wenn sich die Patienten in Remission befanden, d. h. kein Tumor mehr nachweisbar war. Weitere NMR-spektroskopische Untersuchungen wurden unter Verwendung der in-vivo ^1H -NMR-Spektroskopie durchgeführt. Die in-vivo Spektroskopie wurde für eine Charakterisierung der Lipide in Tumoren selbst genutzt. Untersucht wurde Tumorgewebe von Patienten mit Nierenzellkarzinomen und Nierengewebe gesunder Probanden. Für das Tumorgewebe fanden sich dabei höhere Lipidwerte als für gesundes Nierengewebe. Die hier untersuchten Krebsarten zeigen verschiedene Änderungen im Phospholipid- und Lipidgehalt im Blutplasma, d. h. sie zeigen verschiedene systemische Auswirkungen, je nach Art der Tumorerkrankung, so daß sogar eine diagnostische Abgrenzung zwischen verschiedenen Tumorerkrankungen, mit Hilfe NMR-spektroskopischer Untersuchungen, denkbar wäre. Speziell die hier entwickelte Methode für eine quantitative Bestimmung der Phospholipide im Blutplasma, unter Verwendung der ^{31}P -NMR-Spektroskopie, könnte sich für eine Verlaufskontrolle bei Patienten mit Krebserkrankungen eignen. Die für die Patienten mit Nierenzellkarzinom erhaltenen Daten liefern hierzu erste Ergebnisse.

Abstract

Using ^{31}P NMR and ^1H NMR spectroscopy a method was developed for the quantitative determination of phospholipid and lipid concentrations in human blood plasma in order to investigate effects in patients with cancerous diseases. The collectives in this investigation included patients with renal cell carcinoma, colon carcinoma, ovarian cancer, breast cancer and healthy volunteers. Tumorspecific deviations in the phospholipid and lipid concentrations of patients and volunteers being of the same age were observed. When compared to healthy volunteers the patients revealed a decrease in the concentrations of certain phospholipid and lipid classes in blood plasma with the classes being affected depending on the cancer type. Phospholipid and lipid concentrations were also found to depend on tumor stage and metastatic spread. The low phospholipid and lipid concentrations normalised for patients in remission.

Another NMR-spectroscopic method used was in vivo ^1H NMR spectroscopy allowing the investigation of lipids in tumor tissue itself. The examination of tumor tissue of patients with renal cell carcinoma and normal renal tissue of healthy volunteers revealed higher lipid content in tumor tissue than in normal renal tissue.

The types of cancer investigated showed different variations in the concentrations of phospholipids and lipids in blood plasma, that means they led to different systemic effects. Thus the development of methods for diagnostic purpose based on NMR spectroscopy seems to be possible. Furthermore it turned out that using ^{31}P NMR spectroscopy could be applicable to study the course of cancerous diseases. The investigation of patients with renal cell carcinoma showed preliminary results.

Mein Dank gilt all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders danken möchte ich:

Herrn Dr. D. Moka für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die Bereitstellung von Proben, sowie Meßzeit am Ganzkörpertomographen.

Herrn Dipl.-Chem. Raffelt für die Überlassung der Spektren der gesunden, jungen Probanden.

Herrn Dr. R. Klünsch für seine Hilfe zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Allen Patienten und Probanden, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinen Laborkollegen Ulrich Berg und Klaus Raffelt möchte ich besonders herzlich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und das gute Labor Klima danken. Ferner gilt mein Dank allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern des Arbeitskreises

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. J. Hahn betreut worden.

Teilpublikation:

F. Sülentrop, D. Moka, S. Neubauer, U. Engelmann, J. Hahn, H. Schicha: eingereicht beim Journal of Urology.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Frauke Süllentrop
geboren am	13.05.1969 in Köln
Eltern	Paul Süllentrop (Diplom-Ingenieur) Karin Süllentrop, geb. Schlobies
Familienstand	ledig

Schulbildung

1975-1979	Gemeinschaftsgrundschule Nußbaumerstraße, Köln-Ehrenfeld
1979-1988	Albertus-Magnus-Gymnasium, Köln-Ehrenfeld
5/1988	Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1988	Beginn des Chemiestudiums an der Universität zu Köln
7/1992	Diplom-Chemiker-Vorprüfung
10/1996	Diplom-Chemiker-Hauptprüfung
11/1996-8/1997	Diplomarbeit unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. J. Hahn
seit 9/1997	Dissertation unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. J. Hahn