

### **3. Ergebnisse**

#### 3.1. Präzision des automatisierten PINP-Assays

##### 3.1.1. Intra-Assay-Ergebnisse

##### 3.1.1.a. Intra-Assay-Ergebnisse in Berlin

Für die erste Kontrollprobe (PCB1) fand sich ein Medianwert von 60,4 ng/ml bei einem Wiedererfindungswert von 58,5 ng/ml nach den 21 Messungen. Die Standardabweichung (STD) lag bei 0,8 ng/ml und der Variationskoeffizient bei 1,3%. Für die zweite Kontrollprobe (PCB2) lagen der Medianwert bei 570,6 ng/ml bei einem Wiederfindungswert von 572 ng/ml, die Standardabweichung bei 6,9 ng/ml und der Variationskoeffizient bei 1,2%. Für die dritte Kontrollprobe (PCB3) lagen der Medianwert bei 1288 ng/ml bei einem Wiederfindungswert von 1164 ng/ml, die Standardabweichung bei 25,9 ng/ml und der Variationskoeffizient bei 2%. Die Variationskoeffizienten befanden sich alle im vom Protokoll vorgegebenen Rahmen (Tabelle 2).

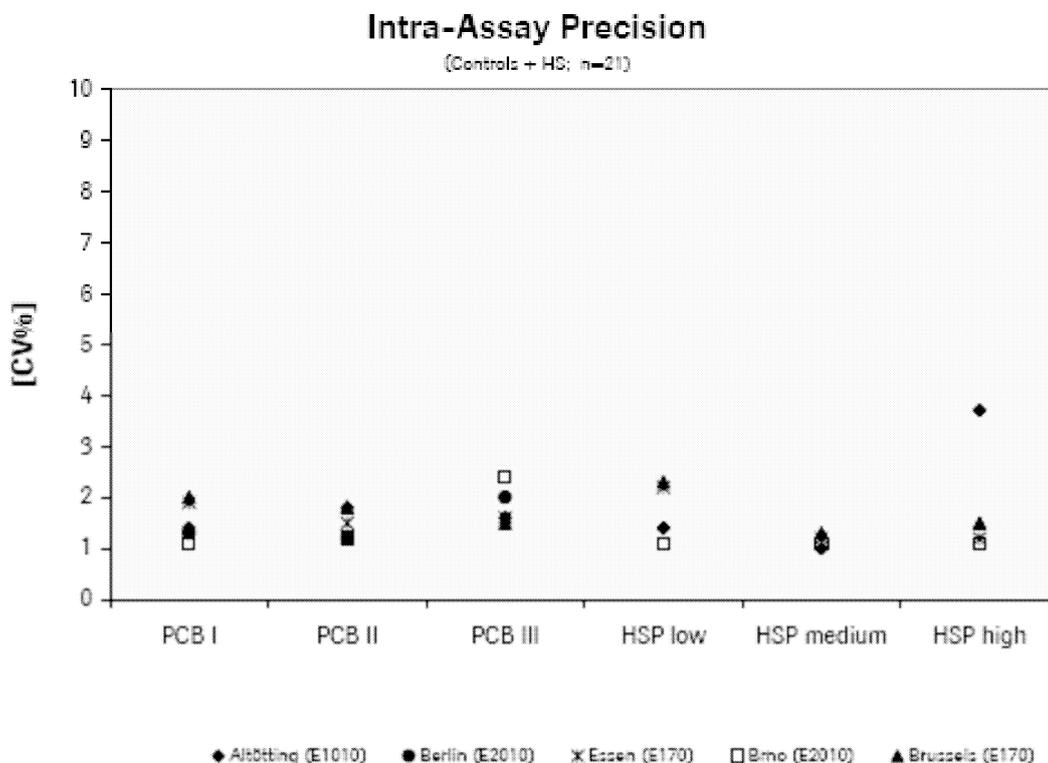
**Tabelle 2:** Ergebnisse des Intra-Assay in Berlin (Elecsys 2010®)

	Kontrolle 1 PCB1	Kontrolle 2 PCB2	Kontrolle 3 PCB3
Durchschnitt	60,4	569	1284
Median	60,4	570,6	1288
Min	58,8	554,9	1228
Max	61,6	579,6	1327
STD	0,8	6,9	25,9
CV (%)	1,3	1,2	2
Wiederfindungswert	58,5	572	1164
Bereich	46 – 71	452 – 692	918 – 1407
soll-CV (%)	≤ 4%	≤ 4%	≤ 4%

### 3.1.1.b. Intra-Assay-Ergebnisse in den fünf Zentren

Wie in Abbildung 2 dargestellt, fanden sich in den fünf Zentren Variationskoeffizienten zwischen 1,1 und 2% für die Kontrollproben mit niedrigem PINP-Wert (PCB1), zwischen 1,2% - 1,8% für die Kontrollproben mit mittlerem PINP-Wert (PCB2) und zwischen 1,5% - 2,4% für die Kontrollproben mit hohem PINP-Wert (PCB3). Die Variationskoeffizienten in den vier Zentren lagen (Brno, Altötting, Essen und Brüssel), die an diesem Teil der Studie teilnahmen, lagen zwischen 1,1 - 2,3% für Serumproben mit niedrigem PINP-Wert (HSP low), zwischen 1 - 1,3% für Serumproben mit mittlerem PINP-Wert (HSP medium) und zwischen 1,1 - 3,7% für Serumproben mit hohem PINP-Wert (HSP high).

Alle Koeffizienten lagen unter dem im Protokoll definierten maximalen Variationskoeffizienten von  $\leq 4\%$ . Die Mediane der Variationskoeffizienten waren wie folgt: PCB1 = 1,4%; PCB2 = 1,5%; PCB3 = 1,6%; HSP low = 1,8%; HSP medium = 1,2% und HSP high = 1,4%.



**Abbildung 2:** Graphische Darstellung der Variationskoeffizienten der Intra-Assay-Präzision in den fünf Zentren

### 3.1.2. Ringversuch

#### 3.1.2.a. Ergebnisse des Ringversuchs in Berlin

Für die erste Serumprobe (QA 1) fand sich ein Medianwert von 61 ng/ml. Die Standardabweichung lag bei 1,9 ng/ml und der Variationskoeffizient bei 3,1%, die recovery bei 97,6%. Für die zweite Serumprobe (QA 2) lagen der Medianwert bei 545,9 ng/ml, die Standardabweichung bei 16,1 ng/ml und der Variationskoeffizient bei 2,9%, die recovery bei 93,6%. Für die dritte Serumprobe (QA 3) lagen der Medianwert bei 1434,6 ng/ml, die Standardabweichung bei 128 ng/ml, der Variationskoeffizient bei 8,8% und die recovery bei 99,7%. Für die erste Kontrollprobe (PCB1) fand sich ein Medianwert von 59,2 ng/ml bei einem Wiederfindungswert von 58,5 ng/ml. Die Standardabweichung lag bei 2 ng/ml, der Variationskoeffizient bei 3,4% und die recovery bei 101,2%. Für die zweite Kontrollprobe (PCB2) lag der Medianwert bei 572,2 ng/ml bei einem Wiederfindungswert von 572 ng/ml, die Standardabweichung bei 10,7 ng/ml und der Variationskoeffizient bei 1,9%, die recovery bei 100%. Für die dritte Kontrollprobe (PCB3) lag der Medianwert bei 1200 ng/ml bei einem Wiederfindungswert von 1164 ng/ml, die Standardabweichung bei 31,9 ng/ml, der Variationskoeffizient bei 2,7% und die recovery bei 103,1%. Die Variationskoeffizienten lagen alle im vom Protokoll vorgegebenen Rahmen (Tabelle 3).

**Tabelle 3:** Ergebnisse des Ringversuchs in Berlin (Elecsys 2010®)

	QA 1 (Serum)	QA 2 (Serum)	QA 3 (Serum)	Kontrolle 1 (PCB1)	Kontrolle 2 (PCB2)	Kontrolle 3 (PCB3)
Durchschnitt	61,6	549,2	1459,7	59	573,6	1200,3
Median	61	545,9	1434,6	59,2	572,2	1200
Min	58,9	526,1	1319	55	557,4	1146
Max	64,7	576,8	1775,4	61,9	592	1260
STD	1,9	16,1	128	2	10,7	31,9
CV (%)	3,1	2,9	8,8	3,4	1,9	2,7
Recovery (%)	97,6	93,6	99,7	101,2	100	103,1
Wiederfindungswert	-	-	-	58,5	572	1164
Bereich	-	-	-	46 - 71	452 - 692	918 - 1407
Soll-CV %	-	-	-	≤ 5%	≤ 6%	≤ 6%

### 3.1.2.b. Ergebnisse der Ringversuche in den fünf Zentren

In den fünf Zentren fanden sich recoveries zwischen 101,2% - 106,3% sowie Variationskoeffizienten von 1,7% - 9,1% für Kontrollproben mit niedrigem PINP-Wert (PCB1), recoveries zwischen 100% - 109,1% sowie Variationskoeffizienten von 1,6% - 11,3% für Kontrollproben mit mittlerem PINP-Wert (PCB2) und recoveries zwischen 103,1% - 117,2% sowie Variationskoeffizienten von 2,7% - 5,9% für Kontrollproben mit hohem PINP-Wert (PCB3). Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 1,5% - 6,2% und die recoveries zwischen 96,9% - 101,9% für Serumproben mit niedrigem PINP-Wert (QA1), zwischen jeweils 2,4% - 4,6% und 92% - 105,6% für Serumproben mit mittlerem PINP-Wert (QA2) und zwischen jeweils 2,6% - 19,2% und 88,7% - 111,4% für Serumproben mit hohem PINP-Wert (QA3) (Abbildung 3).

Diese Werte liegen nicht alle im vorgegebenen Rahmen, aber die Mediane der Variationskoeffizienten und der recovery für jede einzelne Gruppe von Proben (PCB1: CV = 3%, recovery = 104,8%; PCB2: CV = 3,7%, recovery = 105,7%; PCB3: CV = 3,7%, recovery = 110,2%; QA1: CV = 3,3%, recovery = 101%; QA2: CV = 3%, recovery = 100,7% und QA3: CV = 2,8% und recovery = 99,8%) lagen innerhalb des vom Protokoll vorgegebenen Rahmens, so dass diese Ergebnisse akzeptabel sind.

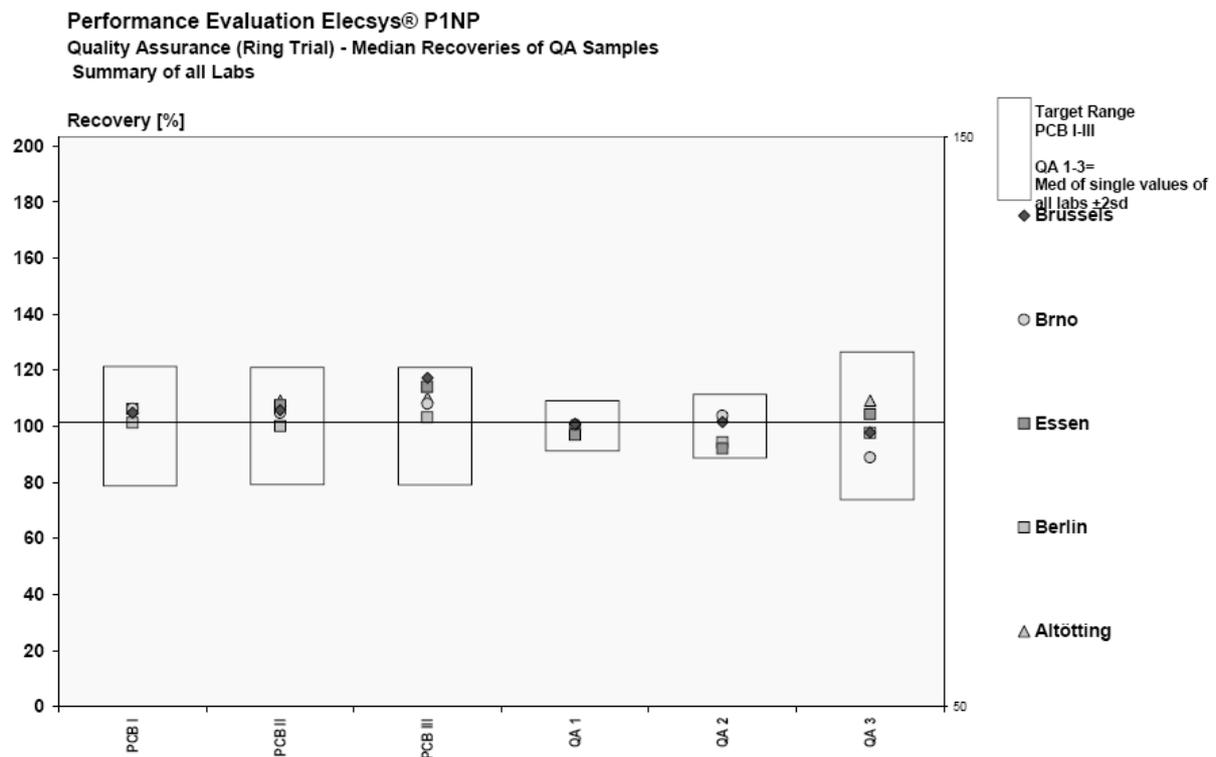
### 3.1.3. Inter-Assay-Ergebnisse

#### 3.1.3.a. Inter-Assay- Ergebnisse in Berlin

Für die erste Kontrollprobe (PCB1) fanden sich Medianwerte zwischen 57 ng/ml - 58,5 ng/ml bei einem Wiederfindungswert von 58,5 ng/ml und Variationskoeffizienten zwischen 1,9% - 4,3% für die sechs Messungen der zehn verschiedenen PCB1-Proben. Für die PCB2-Proben lagen die Medianwerte zwischen 574 ng/ml - 589,3 ng/ml bei einem Wiederfindungswert von 572 ng/ml und die Variationskoeffizienten zwischen 1,9% - 3,4%. Für die PCB3-Proben befanden sich die Medianwerte zwischen 1216 ng/ml - 1255 ng/ml bei einem Wiederfindungswert von 1164 ng/ml und die Variationskoeffizienten zwischen 2,5% - 5,4%. Die Variationskoeffizienten lagen alle innerhalb des vom Protokoll vorgegebenen Rahmens. Für die Serumprobe mit niedrigem PINP-Wert (HSP low) fanden sich Medianwerte zwischen

57,7 ng/ml - 58,5 ng/ml bei einem Wertbereich von 30 - 80 ng/ml und Variationskoeffizienten zwischen 1,2% - 8% für die sechs Messungen der zehn verschiedenen Serumproben. Für die Serumprobe mit mittlerem PINP-Wert (HSP medium) lagen die Medianwerte zwischen 135,2 ng/ml - 137,3 ng/ml bei einem Wertbereich von 100 - 300 ng/ml und die Variationskoeffizienten zwischen 1% - 2,3%. Für die Serumprobe mit hohem PINP-Wert (HSP high) befanden sich die Medianwerte zwischen 701,6 ng/ml - 720,4 ng/ml bei einem Wertbereich > 500 ng/ml und die Variationskoeffizienten zwischen 3,7% - 7,6% (Tabelle 4).

Die Variationskoeffizienten für jede einzelne Messung lagen nicht alle innerhalb des vom Protokoll vorgegebenen Rahmens, aber die Variationskoeffizienten der einzelnen Gruppen von Proben lagen innerhalb dieses Rahmens.



**Abbildung 3:** Graphische Darstellung der Wiederfindungswerte des Ringversuchs in den fünf Zentren

**Tabelle 4:** Ergebnisse der Inter-Assay-Präzision in Berlin (Elecsys 2010®)

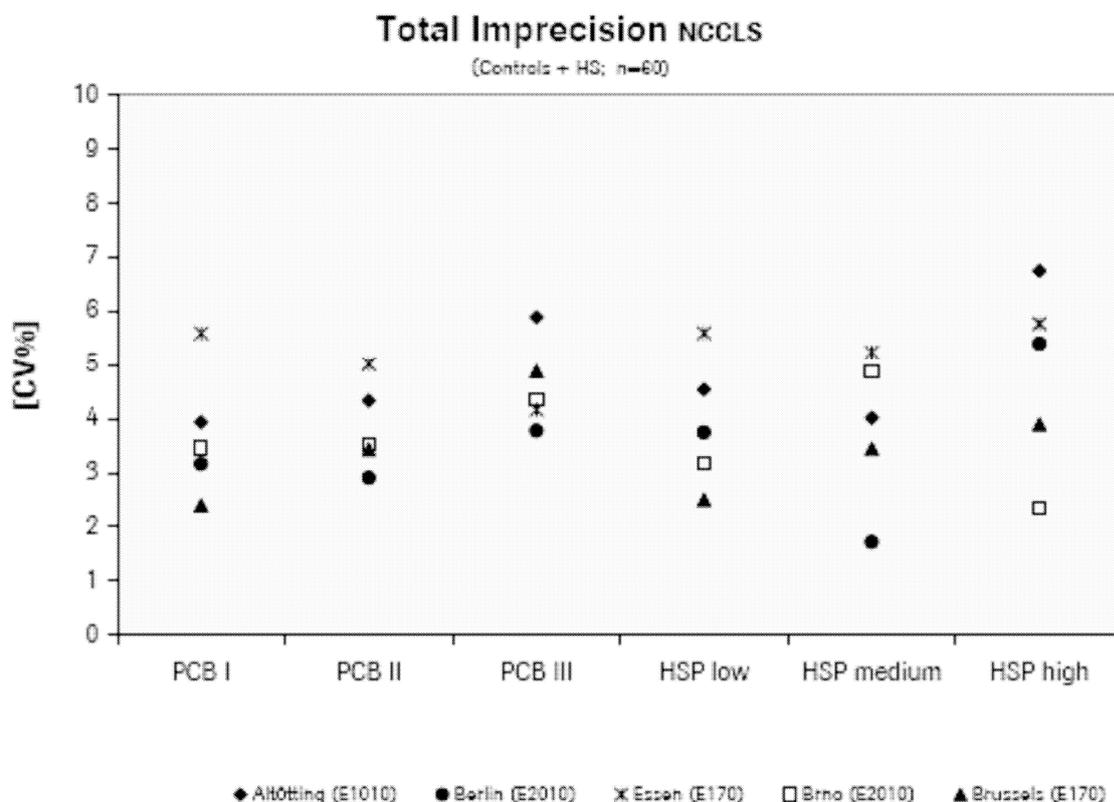
	PCB 1						PCB 2						PCB 3					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
<b>Mittelwert</b>	58,2	57,9	58,3	57,6	57,3	57,8	581,6	581,6	577,6	584,1	571	576,9	1225	1223	1250	1240	1242	1235
<b>Median</b>	58	57,7	58,5	57,5	57	57,6	582,4	589,3	576,7	581,2	574	582	1216	1228	1248	1252	1255	1230
<b>Min</b>	56,6	54,9	55	55,2	54,8	55,6	560,2	551	563,9	561,5	531,4	527	1163	1141	1161	1190	1148	1174
<b>Max</b>	59,7	61,5	64,1	59,8	59,6	61,8	603,1	604,3	597,1	623,5	598,3	591,7	1280	1278	1400	1278	1295	1297
<b>STD</b>	1,1	2	2,5	1,4	1,6	1,9	14,1	18,6	11,2	16,6	19,6	19	37,2	46,1	67,7	31	42,2	47,6
<b>CV (%)</b>	1,9	3,5	4,3	2,4	2,9	3,2	2,4	3,2	1,9	2,8	3,4	3,3	3	3,8	5,4	2,5	3,4	3,9
<b>Bereich</b>	<b>46 – 71</b>						<b>452 - 692</b>						<b>918 – 1407</b>					
<b>Soll CV (%)</b>	<b>≤ 5%</b>						<b>≤ 6%</b>						<b>≤ 6%</b>					

	HSP low						HSP medium						HSP high					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
<b>Mittelwert</b>	56,2	58,2	58	58,5	58,3	58,4	135,8	136,6	136,3	136,2	136,6	137,8	701,3	717	710	709,8	711,6	718
<b>Median</b>	57,7	58,1	57,9	58,5	58,2	58,19	135,2	136,8	135,4	135,9	136,4	137,3	701,6	709	714,5	702,9	704,4	720,4
<b>Min</b>	43,7	56,7	56,6	56,4	56,4	56,4	132,6	134,3	133,6	133,1	134,6	134,1	597,9	685	587,4	666,1	671,2	683,1
<b>Max</b>	59	59,5	58,8	61	60,7	61,24	139,8	139,7	144,1	140,3	138,6	143,5	781,2	770	781,9	762,1	752,3	767
<b>STD</b>	4,5	0,8	0,7	1,2	1,4	1,3	2,7	1,6	3	2,1	1,4	2,6	49,8	29,8	54,1	29,7	33,3	26,3
<b>CV (%)</b>	8	1,4	1,2	2,1	2,3	2,3	2	1,2	2,3	1,6	1	1,9	7,1	4,2	7,6	4,2	4,7	3,7
<b>Bereich</b>	<b>30 - 80 ng/ml</b>						<b>100 - 300 ng/ml</b>						<b>&gt;500 ng/ml</b>					
<b>Soll CV (%)</b>	<b>≤ 5%</b>						<b>≤ 6%</b>						<b>≤ 6%</b>					

### 3.1.3.b. Inter-Assay-Ergebnisse in den fünf Zentren

Für die Kontrollprobe mit niedrigem PINP-Wert (PCB1) fanden sich Variationskoeffizienten von 2,4% - 5,6%, für die Kontrollprobe mit mittlerem PINP-Wert (PCB2) verteilten sich die Variationskoeffizienten von 2,9% - 5% und für die Kontrollprobe mit hohem PINP-Wert (PCB3) lagen die Variationskoeffizienten zwischen 3,8% - 5,9%. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 2,5% - 5,6% für die Serumprobe mit niedrigem PINP-Wert (HSP low), zwischen 1,7% - 5,2% für die Serumprobe mit mittlerem PINP-Wert (HSP medium) und zwischen 2,3% - 6,7% für die Serumprobe mit hohem PINP-Wert (HSP high) (Abbildung 4).

Diese Werte lagen nicht alle im vorgegebenen Rahmen, aber die Mediane der Variationskoeffizienten für jede einzelne Gruppe von Proben (PCB1: 3,5%; PCB2: 3,5%; PCB3: 4,3%; HSP low: 3,7%; HSP medium 4,0% und HSP high: 5,4%) befanden sich innerhalb des im Protokoll vorgegebenen Rahmens, so dass die Ergebnisse des Tests akzeptabel sind.



**Abbildung 4:** Graphische Darstellung der Variationskoeffizienten für den Inter-Assay in den fünf Zentren

### 3.2. Demographische Angaben zu den Patientinnenkollektiven

Zum Zeitpunkt der biochemischen Analyse hatten 51 Patientinnen eine metastasierte Erkrankung und elf Patientinnen waren in der neoadjuvanten Situation (lokaler Brustkrebs ohne nachweisbare Metastasen). Diese Gruppe von Patientinnen war jünger als die Patientinnen mit metastasierter Erkrankung (medianen Alter von 43,9 Jahre für den Zeitpunkt der Blutabnahme versus 57,2 Jahre für die Patientinnen mit Knochenmetastasen und 56,5 Jahre für die Patientinnen ohne ossären Befall). Das Alter in beiden Gruppen mit Filiae war somit vergleichbar. In der Gruppe der metastasierten Patientinnen hatten 38 Frauen ossäre Filiae, davon 63,2% mehr als sieben Knochenmetastasen. In diesen zwei Gruppen litt die Mehrheit der Patientinnen unter viszeralen Metastasen (rund 70%). 63,2% der Patientinnen in der Gruppe mit ossären Filiae hatten einen Leberbefall und 10,5% einen Befall der Lunge, wohingegen in der Gruppe der metastasierten Patientinnen ohne Knochenbefall 30,8% der Frauen hepatische Metastasen und 38,4% pulmonale Filiae hatten. Die Mehrheit der Patientinnen in den drei Gruppen bekam Chemotherapie: 100% der neoadjuvanten Patientinnen, 84,2% der Patientinnen mit Knochenmetastasen und 61,5% der Patientinnen ohne ossären Befall. Die Frauen in der neoadjuvanten Situation bekamen nur Chemotherapie, während die Patientinnen in den zwei anderen Gruppen zum Teil eine Kombinationstherapie mit Antikörpern erhielten. Nur wenige Patientinnen waren unter hormoneller Therapie. Alle Patientinnen mit Knochenmetastasen wurden mit intravenösen Bisphosphonaten (Pamidronat oder Zoledronat) behandelt (Tabelle 5).

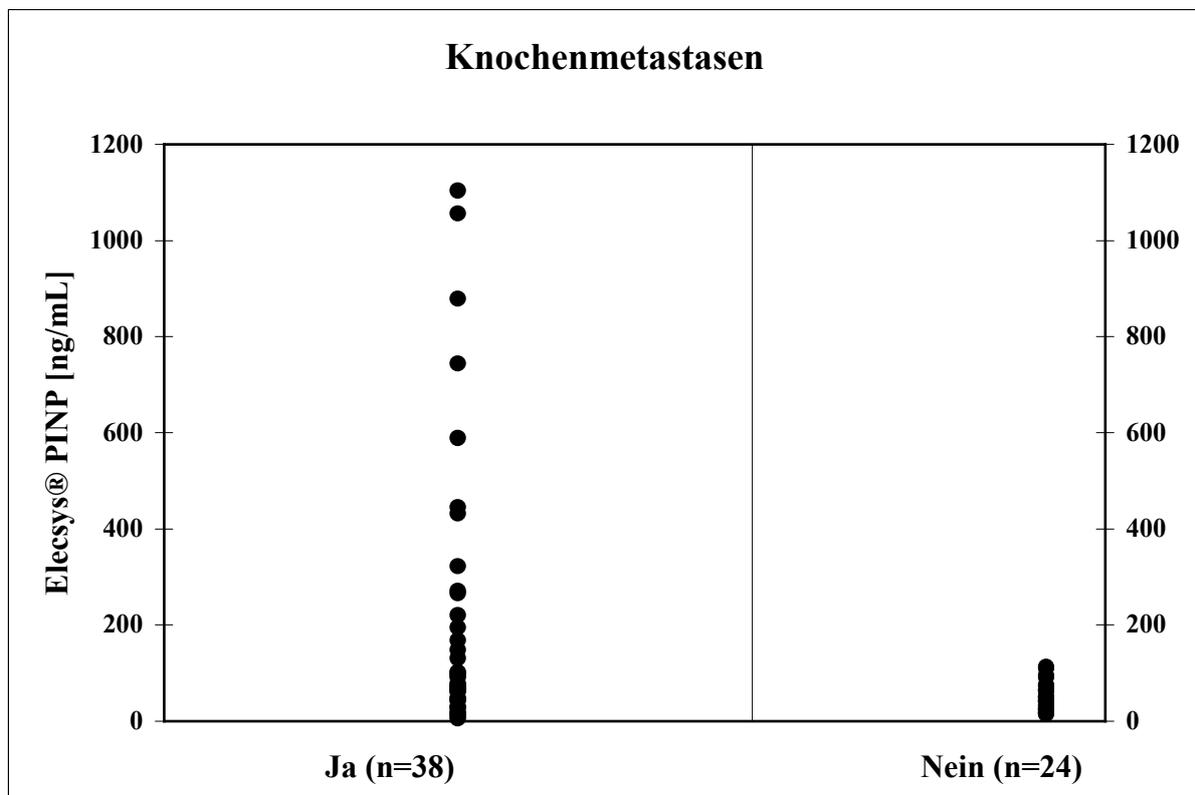
**Tabelle 5:** Demographische Angaben zu den Patientinnenkollektiven

<b>Patientinnencharakteristika</b>	<b>Metastasierte Patientinnen mit ossären Filiae (n = 38)</b>	<b>Metastasierte Patientinnen ohne ossäre Filiae (n = 13)</b>	<b>Neoadjuvante Patientinnen (n=11)</b>
Mittleres Alter bei Diagnose (Jahre)	51,4 (range: 29–76)	50,1 (range: 33-65)	43,6 (range: 31-63)
Mittleres Alter bei Studieneintritt (Jahre)	57,2 (range: 29-85)	56,5 (range: 36–69)	43,9 (range: 31-63)
Menopausenstatus bei Studienbeginn:	prä- post-	21,1% 78,9%	30,8% 69,3%
Tumormanifestationen:			
Knochen	100%	---	---
Brust	28,9%	7,7%	100%
Leber	63,2%	30,8%	---
Lunge	10,5%	38,4%	---
Lymphknoten	39,5%	69,2%	---
andere	21%	46,2%	---
Vortherapie:			
hormonell	76,3%	30,8%	Keine
zytostatisch	76,3%	69,3%	Keine
Therapie während der Studie:			
hormonell	13,2%	15,5%	0%
zytostatisch	84,2%	61,5%	100%
Antikörper	28,9%	53,8%	0%
Anzahl an Knochenmetastasen:			
1-7	34,2%		
> 7	63,2%		
Charakteristika der Knochenmetastasen			
osteolytisch	36,8%		
osteoplastisch	31,5%		
gemischt	26,3%		

### 3.3 Die vier biochemischen Marker zur Differenzierung der drei Patientinnengruppen

#### 3.3.1. PINP zur Differenzierung zwischen Patientinnen mit und ohne Knochenbefall

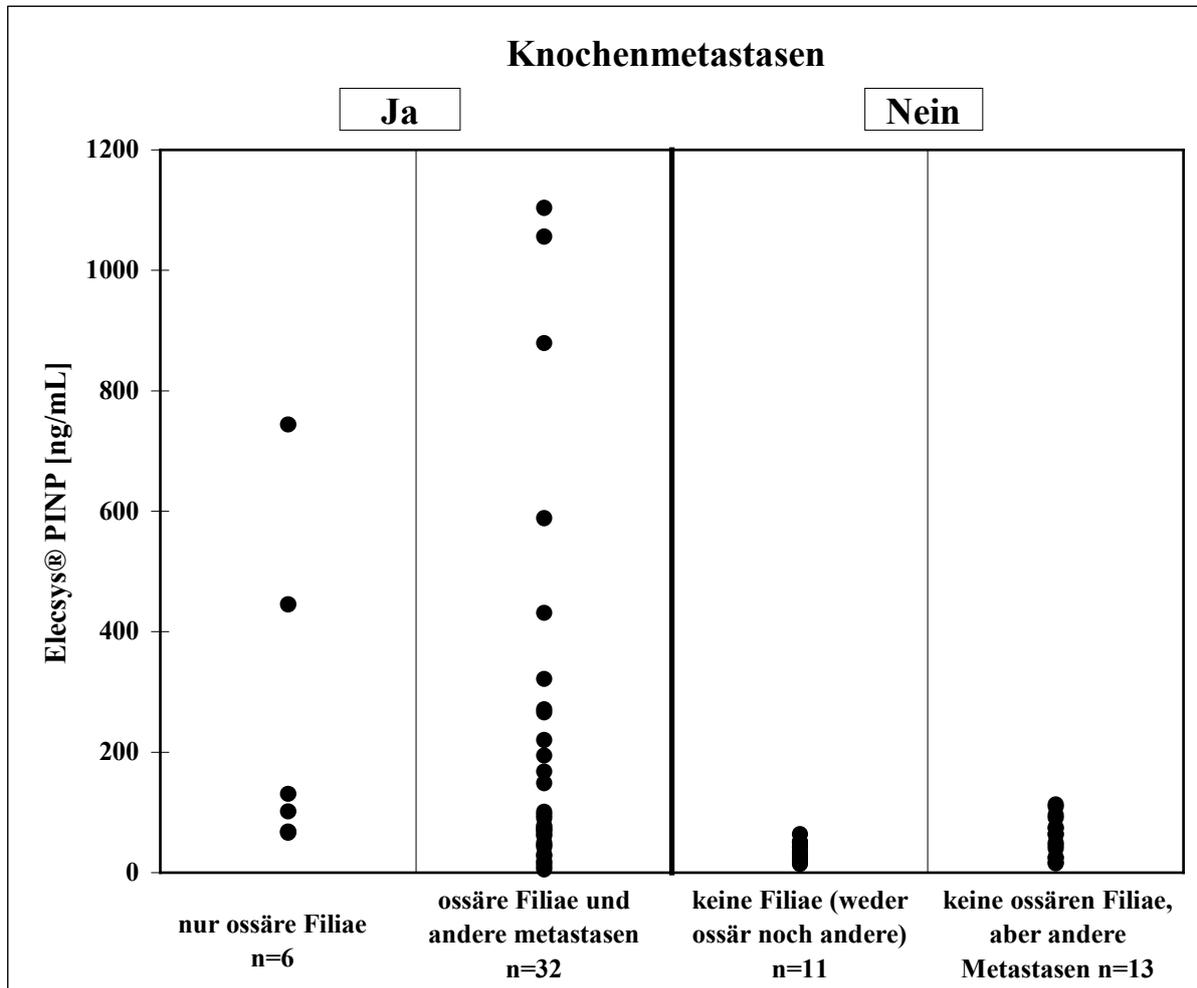
Die PINP-baseline-Werte der 38 Patientinnen mit Knochenmetastasen liegen deutlich höher als die PINP-Konzentrationen der Patientinnen ohne ossäre Filiae (neoadjuvante und metastasierte Patientinnen zusammen) (Abbildung 5). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 5:** PINP-Konzentrationen der Patientinnen mit Knochenmetastasen im Vergleich zu PINP-Konzentrationen der Patientinnen ohne ossäre Filiae (Primärtumor im loco primario unter neoadjuvanter Chemotherapie oder Brustkrebs im Stadium IV ohne Knochenmetastasen)

Alle Patientinnen unter neoadjuvanter Therapie hatten PINP-baseline-Werte unterhalb des Normbereichs von 95 ng/ml. Bei den Patientinnen mit viszeralen- oder Weichteilmetastasen hatten nur zwei Frauen PINP-baseline-Werte oberhalb dieses Normbereichs, einmal mit 95,6 ng/ml und die andere mit 112 ng/ml. Die Patientinnen mit ausschließlich Knochenmetastasen hatten PINP-baseline-Werte bis zu 800 ng/ml, während die Frauen mit

ossärem und viszeralem- oder Weichteilbefall PINP-Werte bis 1200 ng/ml zeigten (Abbildung 6).



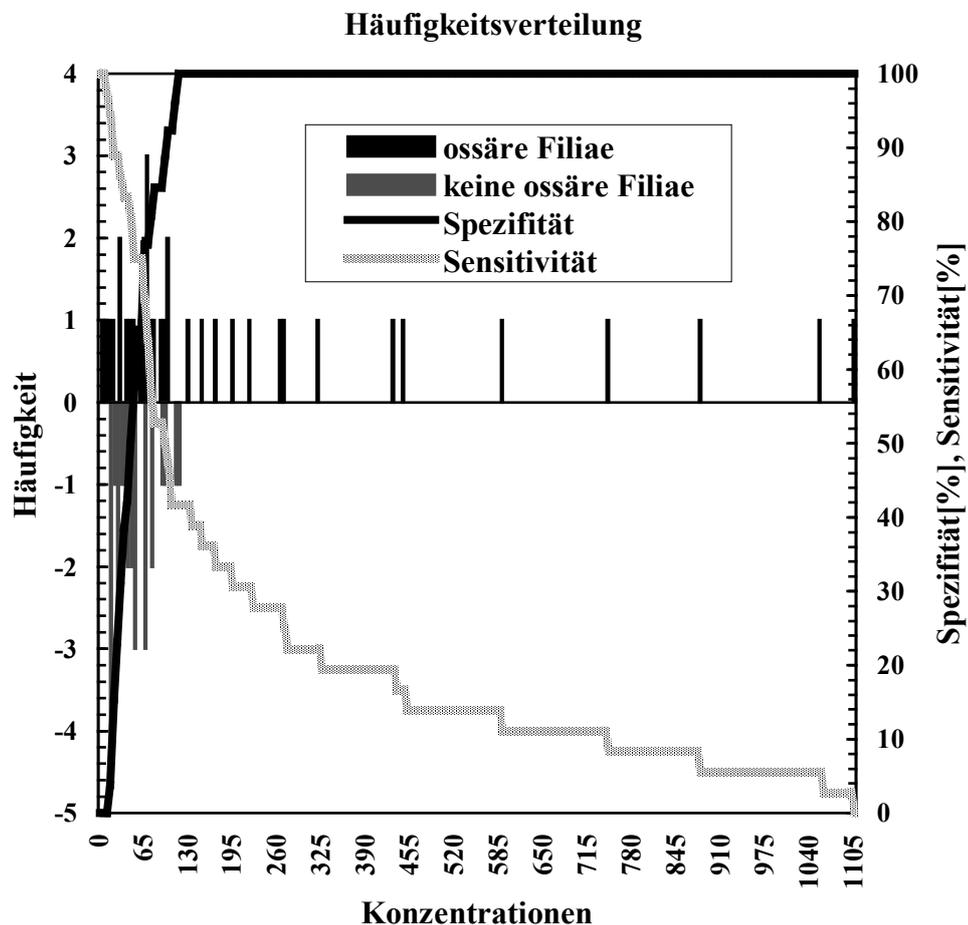
**Abbildung 6:** PINP-Konzentrationen im Zusammenhang mit der Verteilung der Metastasen: ausschliesslich im Knochen oder an anderen Lokalisationen wie Viszera oder Weichteile

Die baseline-Werte von PINP ergaben eine Sensitivität von 50% und eine Spezifität von 92% für die Diagnose von Knochenmetastasen. Der positive prädiktive Wert lag bei 0,90 mit einem negativen-prädiktiven Wert von 0,54 (Tabelle 6).

Die Abbildung 7 zeigt die Sensitivität und die Spezifität für einen großen Bereich von PINP-baseline-Konzentrationen mit der absoluten Anzahl der Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen, die diese Konzentration aufwiesen.

**Tabelle 6:** Vierfelder-Tafeln der Verteilung der Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen und der PINP-Konzentrationen höher oder niedriger als der Normbereich von 95 ng/ml zum Zeitpunkt baseline

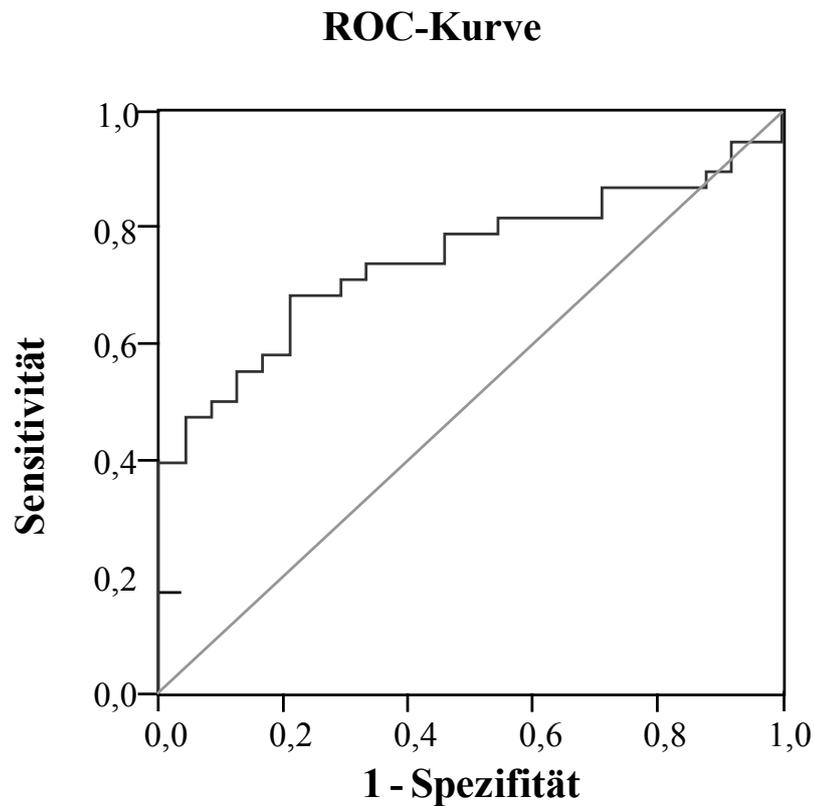
	Mit Knochenmetastasen		Ohne Knochenmetastasen		Summe
<b>PINP + (&gt; 95 ng/mL)</b>	<b>19</b>	<b>50%</b>	<b>2</b>	<b>8.3%</b>	<b>21</b>
<b>PINP – (≤ 95 ng/mL)</b>	<b>19</b>	<b>50%</b>	<b>22</b>	<b>91.7%</b>	<b>41</b>
<b>Summe</b>	<b>38</b>	<b>100%</b>	<b>24</b>	<b>100%</b>	<b>62</b>



**Abbildung 7:** Häufigkeit der PINP-Baselinekonzentrationen für Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen zusammen dargestellt mit der Sensitivität und der Spezifität der einzelnen PINP-Konzentrationen (Gerhard-plot)

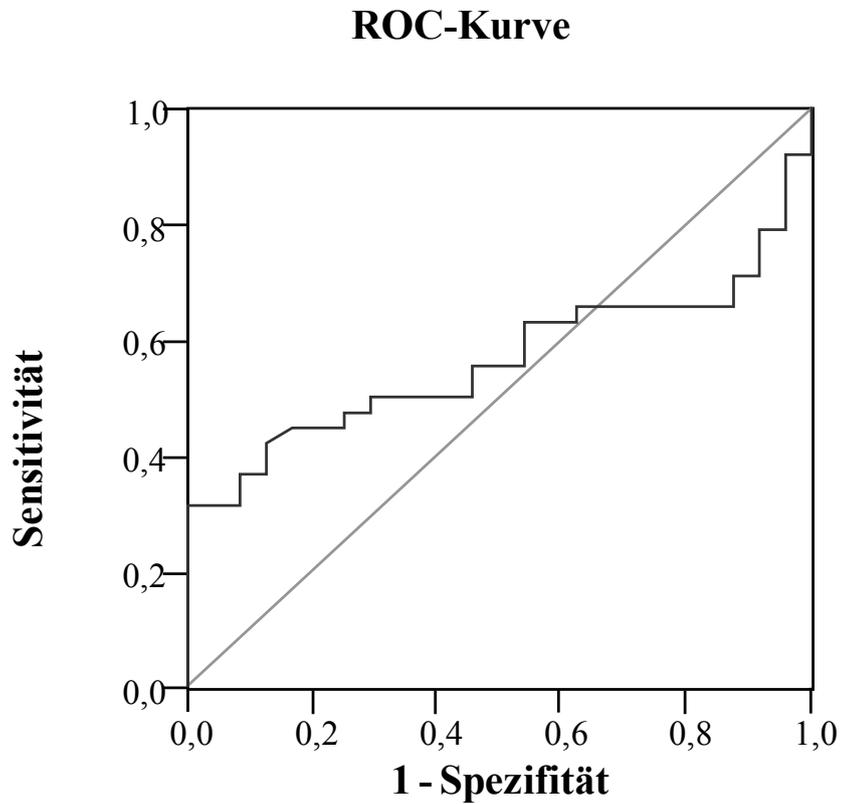
### 3.3.2. ROC-Analyse für die drei Marker des Knochenstoffwechsels

Eine ROC-Analyse (receiver operating characteristics) wurde durchgeführt, um den diagnostischen Nutzen dreier Knochenmarker (PINP,  $\beta$ -Crosslaps oder  $\beta$ -CTX und Osteocalcin) zur Differenzierung zwischen Brustkrebspatientinnen mit und ohne Knochenmetastasen zu überprüfen. Diese Analyse ergab für PINP eine area under the curve (AUC) von 0,75 (Abbildung 8).



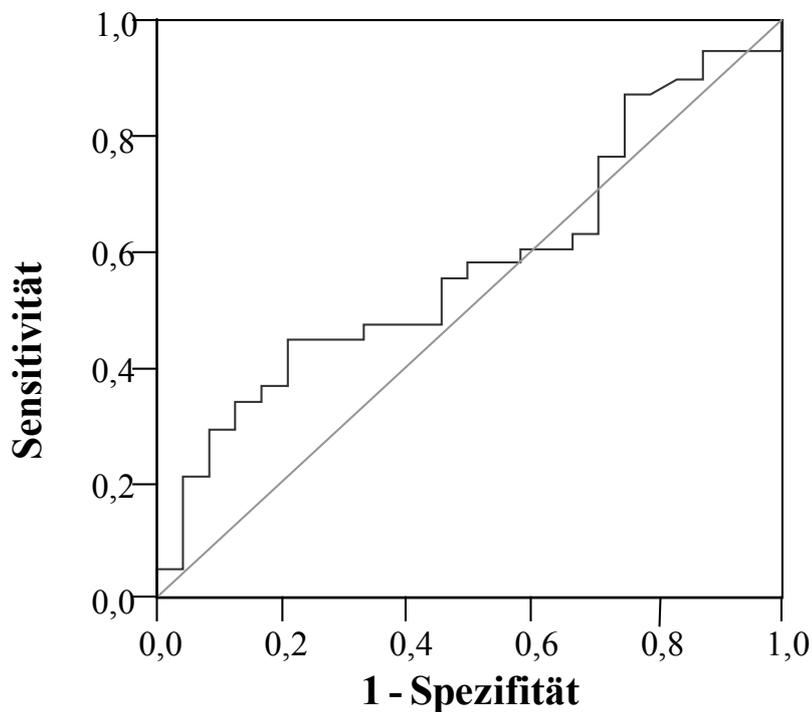
**Abbildung 8:** ROC-Kurve für PINP

Die Ergebnisse für  $\beta$ -Crosslaps und Osteocalcin waren mit einer AUC von jeweils 0,58 und 0,56 deutlich schlechter (Abbildungen 9 und 10). Für den Tumormarker CA 15-3 wurde keine ROC-Analyse durchgeführt, weil es sich nicht um einen Marker des Knochenbefalls handelt.



**Abbildung 9:** ROC-Kurve für  $\beta$ -CTX

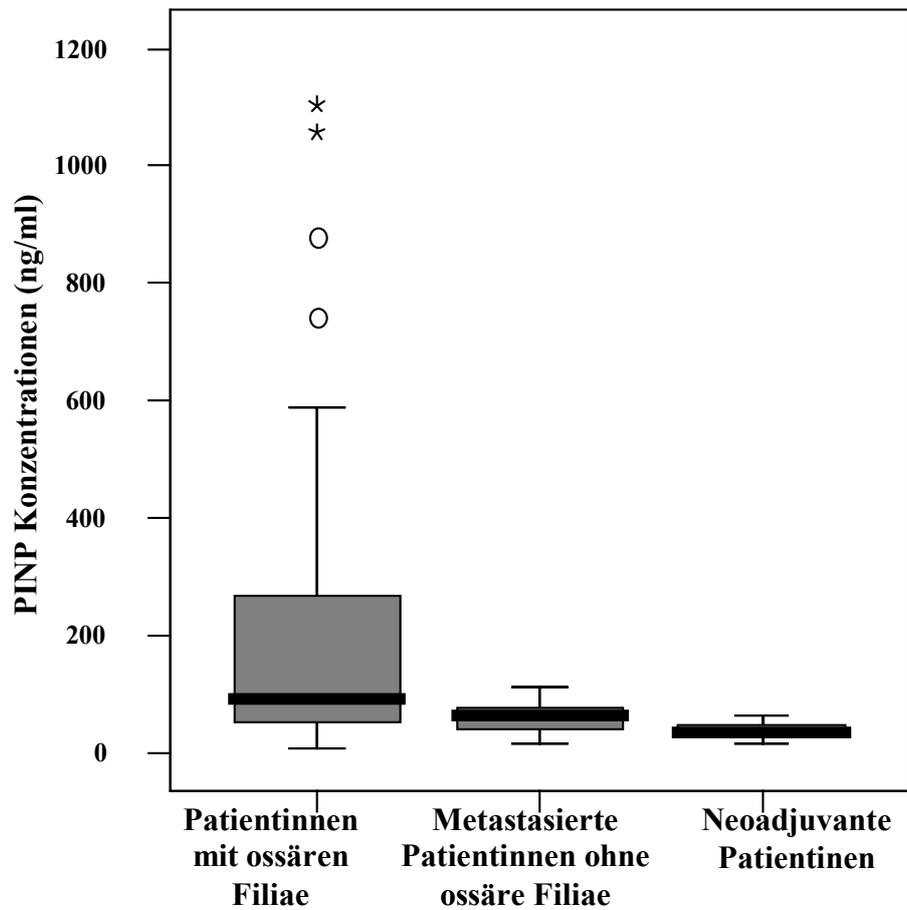
## ROC-Kurve



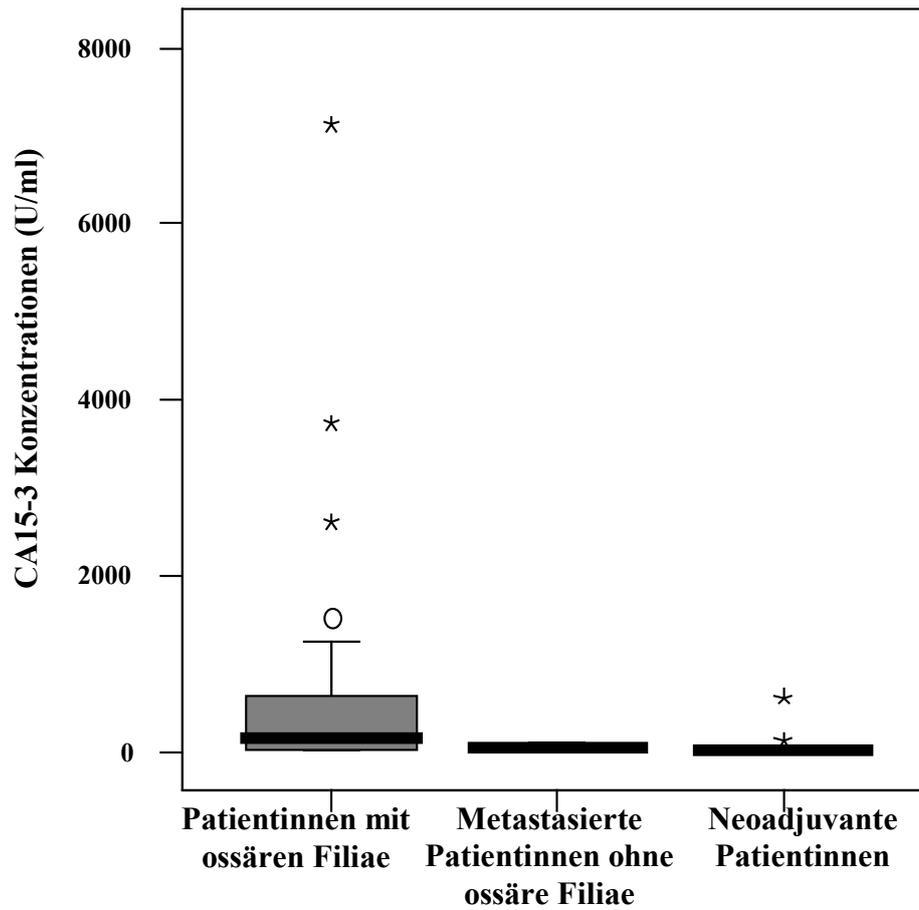
**Abbildung 10:** ROC-Kurve für Osteocalcin

### 3.3.3. Deskriptive Statistik der vier Marker zum Zeitpunkt baseline

Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen den baseline-Werten der Patientinnen mit metastasierter Erkrankung und Knochenbefall und den metastasierten Patientinnen ohne Knochenfiliae für PINP ( $p=0,044$ ) und CA 15-3 ( $p=0,004$ ). Ebenfalls zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den baseline-Werten der Marker PINP ( $p=0,002$ ) und CA 15-3 ( $p=0,006$ ) bei Patientinnen mit ossären Filiae und neoadjuvanten Patientinnen. Hingegen fanden wir zwischen Patientinnen ohne Knochenmetastasen und neoadjuvanten Patientinnen keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,06$  und  $p=0,65$ ) (Abbildungen 11 und 12).

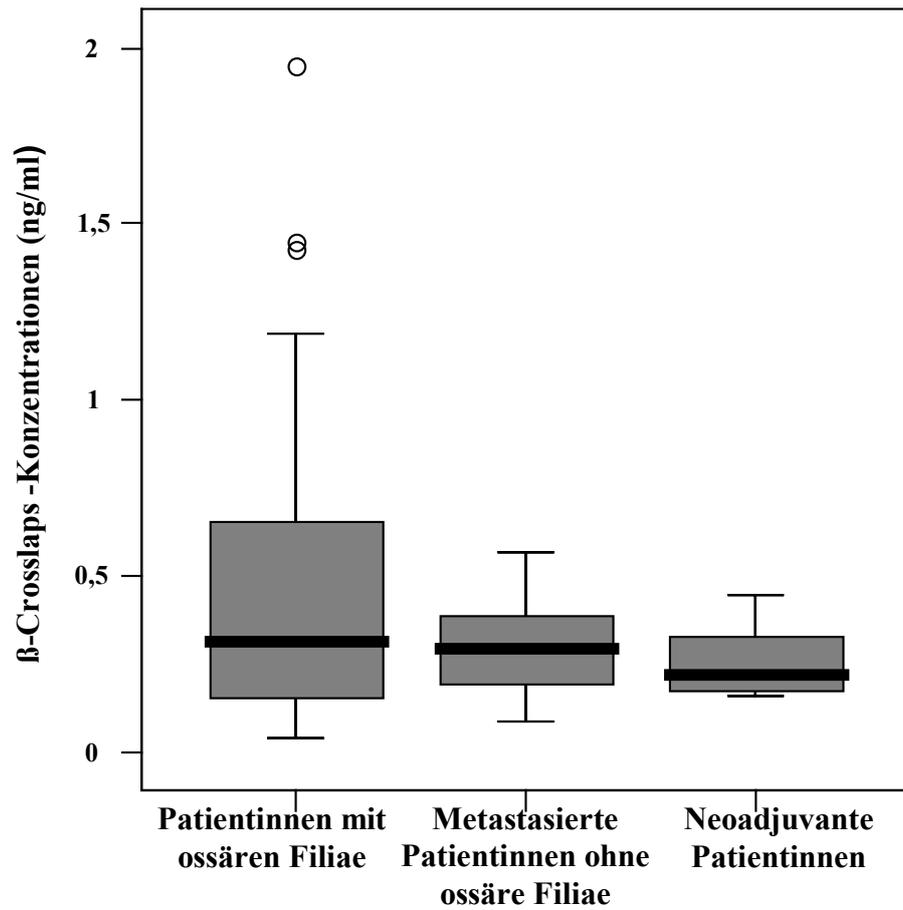


**Abbildung 11:** Box plot der PINP-baseline-Werte der metastasierten Patientinnen mit und ohne ossäre Filiae und der neoadjuvanten Patientinnen. Der Median wird als schwarze horizontale Linie abgebildet; der graue Bereich wird vom 25%-Quantil und 75%-Quantil begrenzt; die vertikalen Linien zeigen jeweils das Maximum und das Minimum der Daten. „\*“ und „o“ bezeichnen Ausreißer

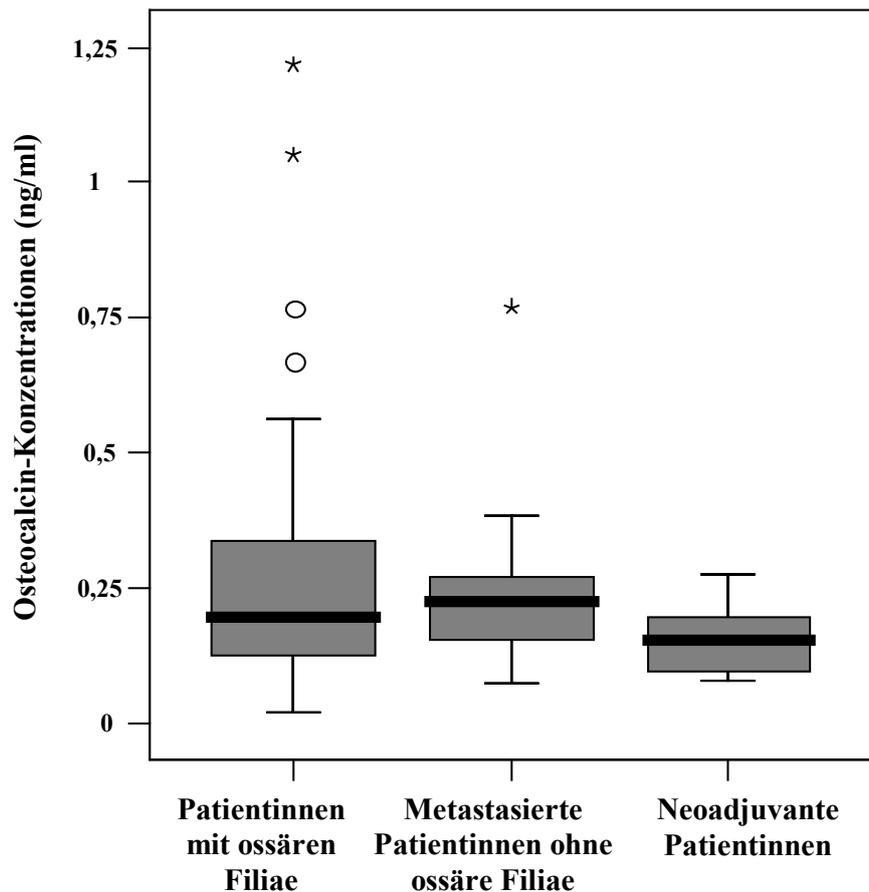


**Abbildung 12:** Box plot der CA 15-3-baseline-Werte der metastasierten Patientinnen mit und ohne ossäre Filiae sowie der neoadjuvanten Patientinnen

Für  $\beta$ -Crosslaps und Osteocalcin war zwischen den drei Patientinnengruppen kein signifikanter Unterschied festzustellen (Abbildungen 13 und 14).



**Abbildung 13:** Box plot der  $\beta$ -Crosslaps-baseline-Werte der metastasierten Patientinnen mit und ohne ossäre Filiae sowie der neoadjuvanten Patientinnen



**Abbildung 14:** Box plot der Osteocalcin-baseline-Werte der metastasierten Patientinnen mit und ohne ossäre Filiae sowie der neoadjuvanten Patientinnen

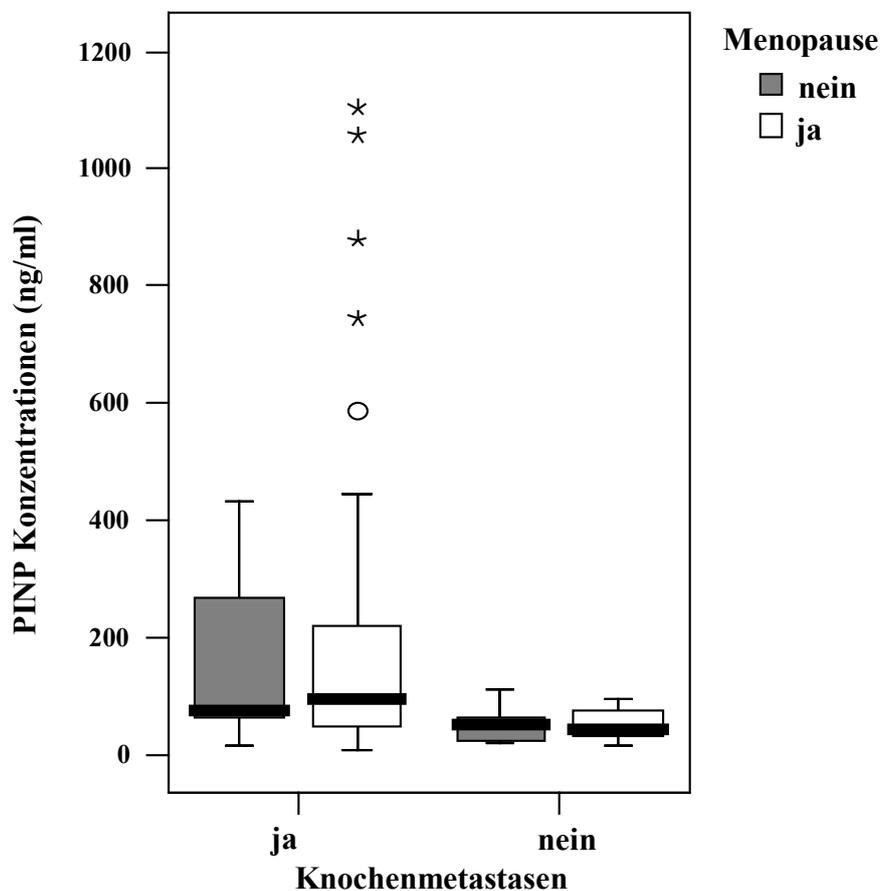
In Tabelle 7 werden die Mediane der vier Marker dargestellt. Interessanterweise bleiben die Mediane für die drei Knochenmarker unterhalb des Normbereichs, wenn auch bei PINP nur knapp (Median von 92,8 ng/ml bei einem Normbereich < 95 ng/ml). Für CA 15-3 waren die Mediane der metastasierten Patientinnen deutlich oberhalb des Normbereichs von 30 U/ml und zwar mit 165,9 U/ml für die Patientinnen mit Knochenfiliae und 44,2 U/ml für die Patientinnen mit viszeralen oder Weichteilmetastasen (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Mediane der vier gemessenen Marker im Zusammenhang mit dem Tumorbefall

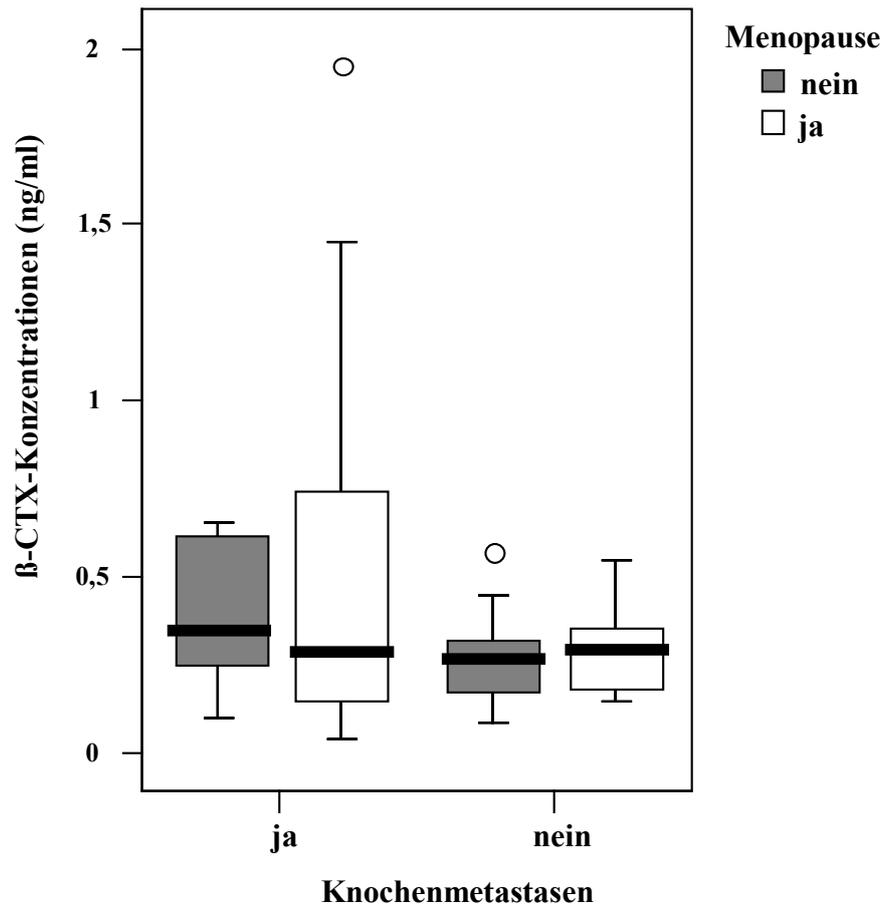
Median	PINP	Crosslaps	Osteocalcin	CA 15-3
Patientinnen mit Knochenmetastasen	92,8 ng/ml	0,31 ng/ml	0,19 ng/ml	165,9 U/ml
Patientinnen ohne Knochenbefall	63,2 ng/ml	0,29 ng/ml	0,22 ng/ml	44,2 U/ml
Neoadjuvante Patientinnen	33,6 ng/ml	0,22 ng/ml	0,15 ng/ml	22,4 U/ml

### 3.4. Verlauf der biochemischen Marker in Relation zur Menopause

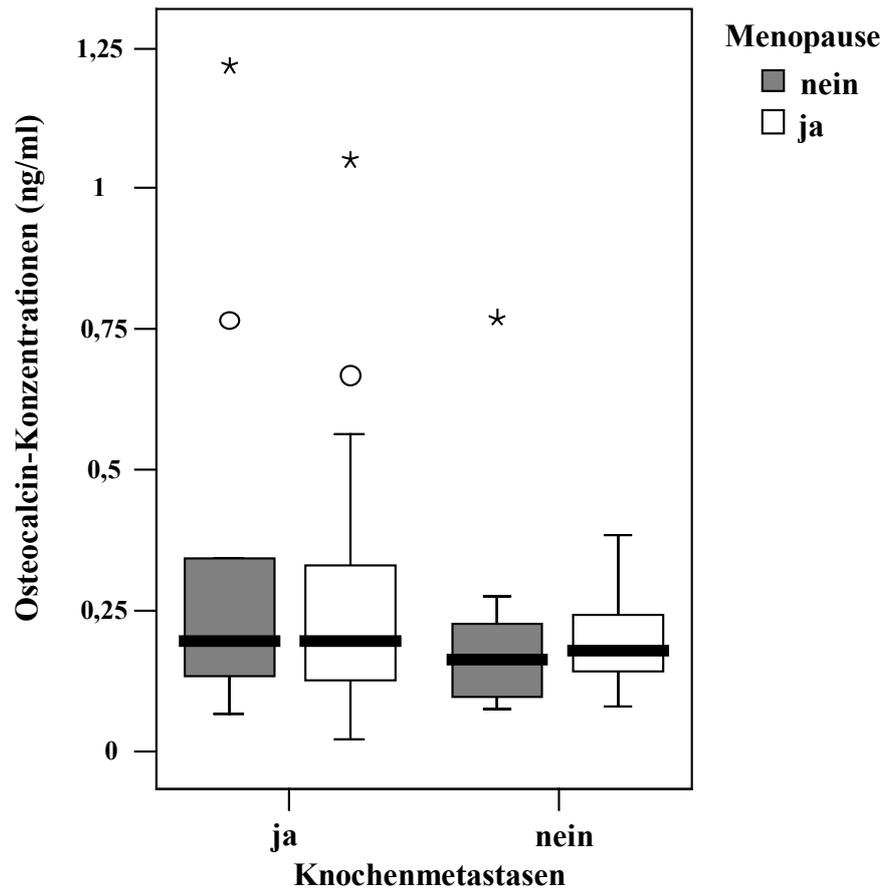
In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied der Serumkonzentrationen von PINP,  $\beta$ -Crosslaps, Osteocalcin und CA 15-3 zwischen prä- und postmenopausalen Frauen festgestellt werden. Für diese Auswertung haben wir die Patientinnen in 2 Gruppen mit und ohne Knochenbefall geteilt und jede Gruppe dann in 2 Subgruppen prä- und postmenopausiert unterteilt (Abbildungen 15 bis 18). Die p-Werte zum Vergleich zwischen prä- und postmenopausalen Patientinnen waren  $p=0,92$  für PINP,  $p=0,54$  für  $\beta$ -Crosslaps,  $p=0,69$  für Osteocalcin und  $p=0,30$  für CA 15-3.



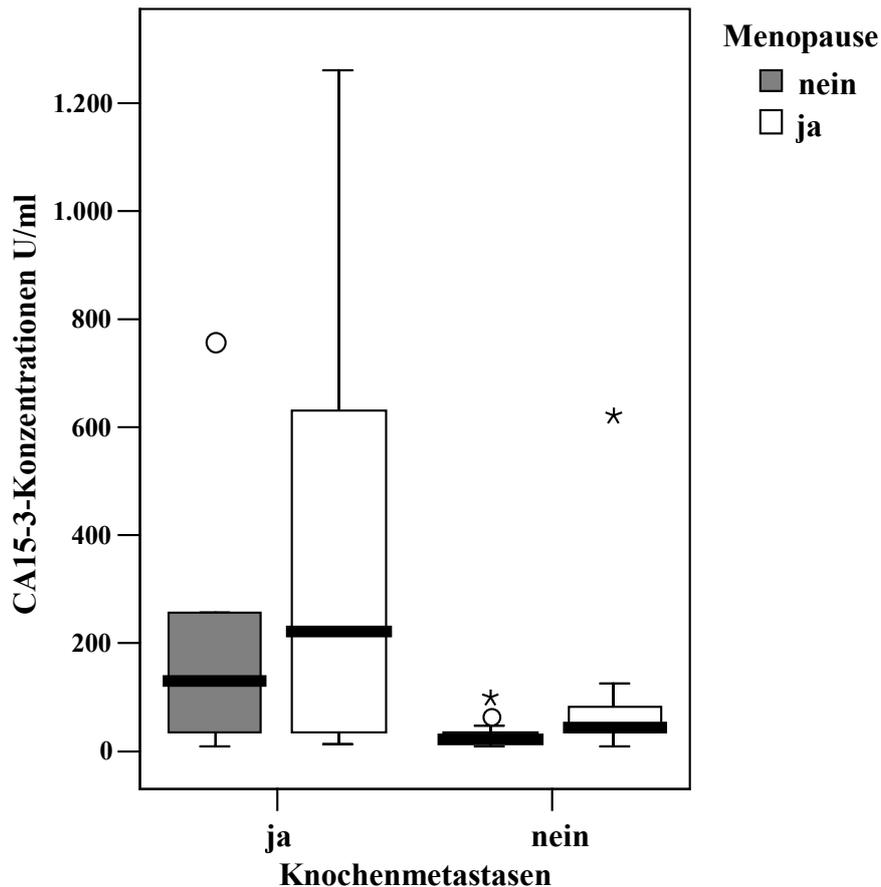
**Abbildung 15:** Box plot der PINP-baseline-Werte der Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen (einschließlich neoadjuvanter Patientinnen) in Abhängigkeit von deren Menopausenstatus



**Abbildung 16:** Box plot der  $\beta$ -CTX-baseline-Werte der Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen (einschließlich neoadjuvanter Patientinnen) in Abhängigkeit von deren Menopausenstatus



**Abbildung 17:** Box plot der Osteocalcin-baseline-Werte der Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen (einschließlich neoadjuvanter Patientinnen) in Abhängigkeit von deren Menopausenstatus

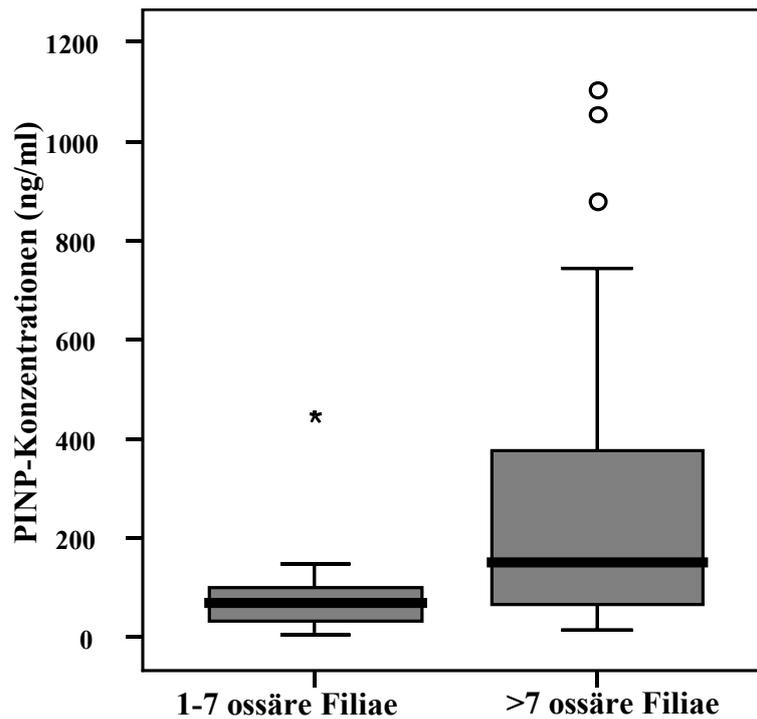


**Abbildung 18:** Box plot der CA 15-3-baseline-Werte der Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen (einschließlich neoadjuvanter Patientinnen) in Abhängigkeit von deren Menopausenstatus. Für die graphische Darstellung wurden drei Ausreißer herausgenommen

In den folgenden statistischen Auswertungen wurden die neoadjuvanter Patientinnen aufgrund der Negativität aller Marker herausgenommen. Ein Vergleich wurde nur noch zwischen metastasierten Patientinnen ohne ossären Befall und Patientinnen mit Knochenmetastasen durchgeführt.

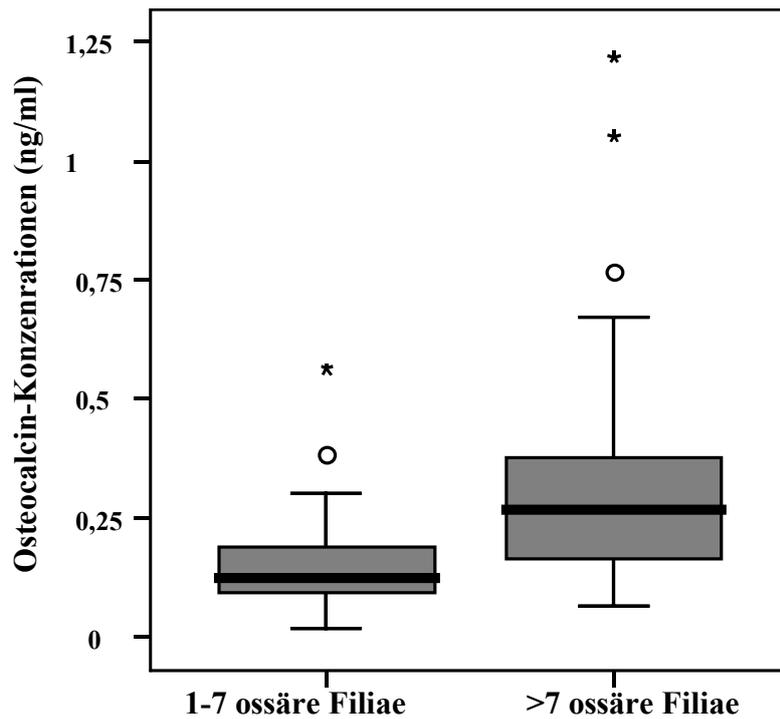
### 3.5. Verlauf der biochemischen Marker in Relation zum Ausmaß der Knochenmetastasierung

Patientinnen, die mehr als sieben Knochenmetastasen vorwiesen, hatten einen signifikant höheren PINP-Baselinewert (Median 149,7 ng/ml) als die Patientinnen mit weniger als sieben Knochenmetastasen (Median 67,6 ng/ml;  $p=0,04$ ; Grenzwert 95 ng/ml) (Abbildung 19).

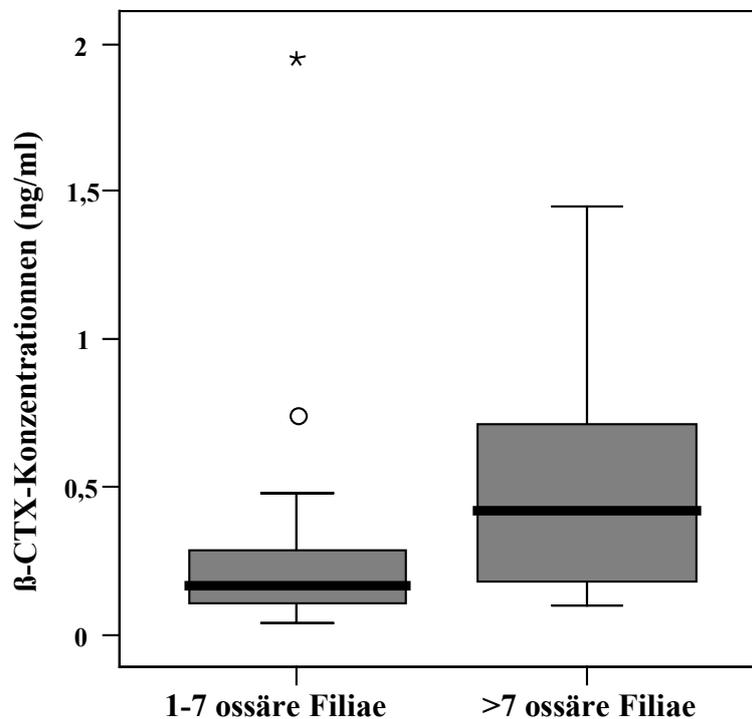


**Abbildung 19:** Box plot der PINP-baseline-Werte von Patientinnen mit 1-7 Knochenmetastasen im Vergleich zur Patientinnen mit mehr als sieben Knochenfiliae

Auch für Osteocalcin und  $\beta$ -Crosslaps fanden wir einen signifikanten Unterschied mit jeweils  $p=0,02$  und  $p=0,04$ . Dennoch blieben die Medianwerte für diese zwei Knochenmarker unterhalb des Normbereiches von 1,008 ng/ml für  $\beta$ -CTX und 0,413 ng/ml für Osteocalcin. Bei mehr als sieben Knochenläsionen lag der Medianwert für Osteocalcin bei 0,266 ng/ml und für  $\beta$ -CTX bei 0,422 ng/ml. Bei 1-7 Knochenmetastasen lagen die Werte bei 0,124 ng/ml für Osteocalcin und bei 0,167 ng/ml für  $\beta$ -CTX (Abbildungen 20 und 21).

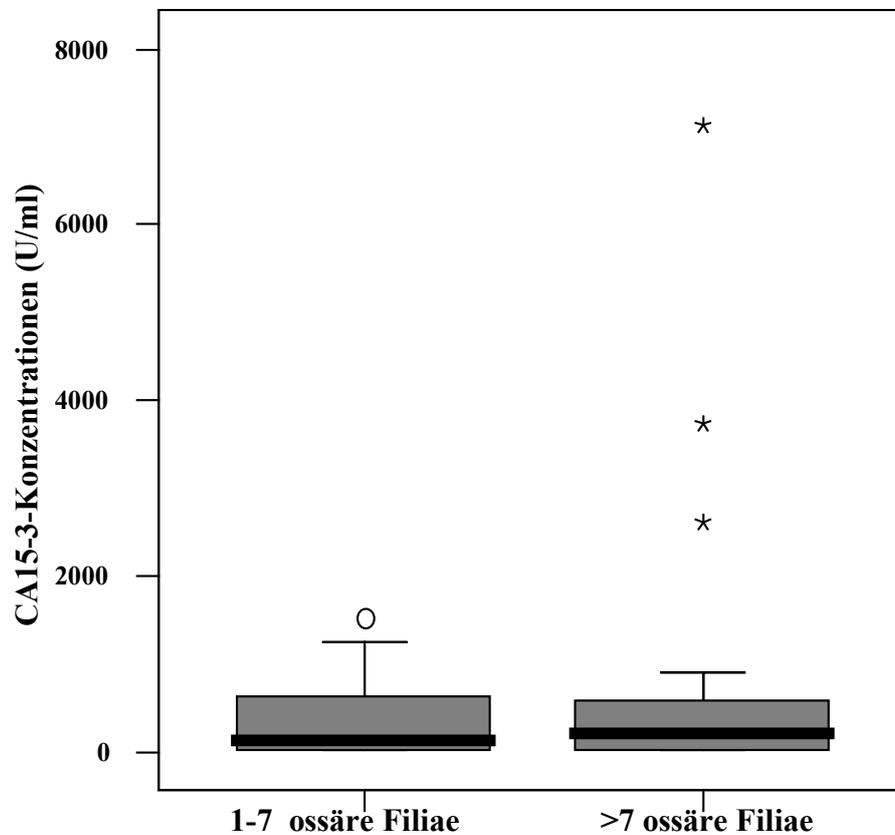


**Abbildung 20:** Box plot der Osteocalcin-baseline-Werte von Patientinnen mit 1-7 Knochenmetastasen im Vergleich zu Patientinnen mit mehr als sieben Knochenfiliae



**Abbildung 21:** Box plot der β-Crosslaps-baseline-Werte von Patientinnen mit 1-7 Knochenmetastasen im Vergleich zu Patientinnen mit mehr als sieben Knochenfiliae

Für CA 15-3 fand sich kein statistischer Unterschied zwischen den beiden Patientinnengruppen (Abbildung 22).

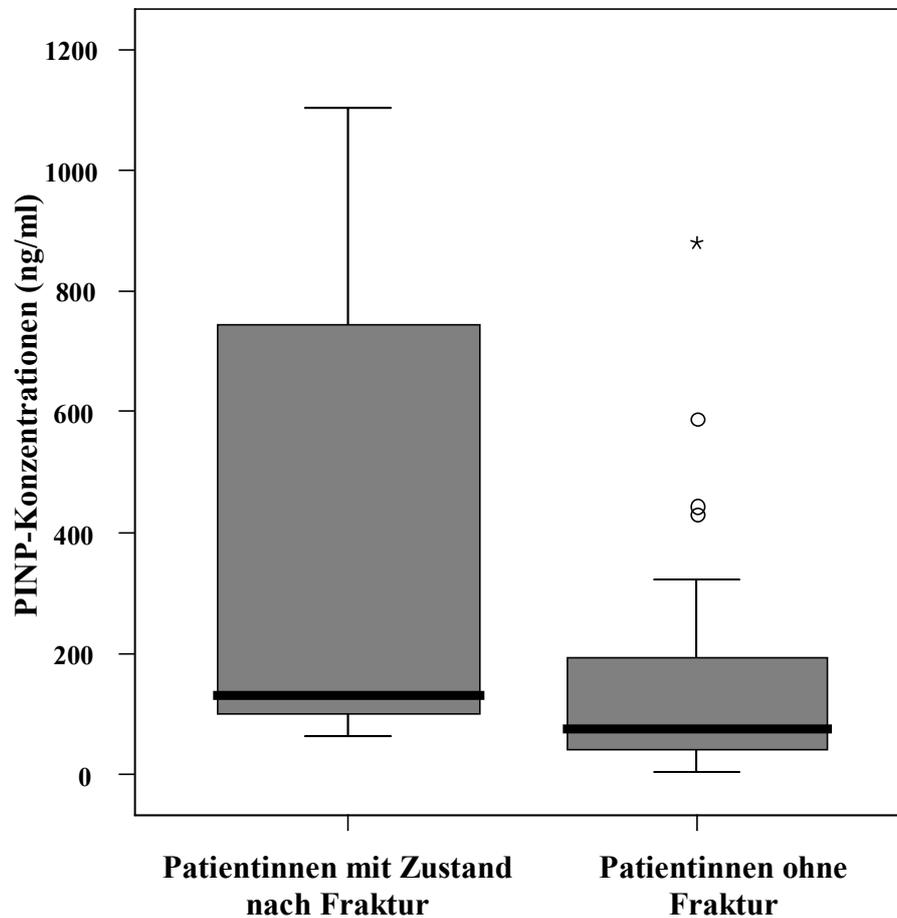


**Abbildung 22:** Box plot der CA 15-3-baseline-Werte von Patientinnen mit 1-7 Knochenmetastasen im Vergleich zu Patientinnen mit mehr als sieben Knochenfiliae

### 3.6. Verlauf der biochemischen Marker in Relation zu Knochenfrakturen

Bei der Gruppe der Patientinnen mit ossärem Befall untersuchten wir die vier Marker in Bezug auf den Nachweis von Knochenfrakturen. Der Zustand nach Knochenfraktur musste im Zusammenhang mit der ossären Metastasierung der Erkrankung sein, durfte aber schon zeitlich zurückliegen. Es gab in unserer Untersuchung keine Patientin mit einem frischen Knochenbruch. Bei unseren 38 Patientinnen mit Knochenbefall hatten neun eine Fraktur erlitten. Für PINP fand sich eine signifikant erhöhter Wert in der Gruppe der Patientinnen mit Knochenfraktur mit  $p=0,049$ . Die Medianwerte von PINP stiegen von 74,7 ng/ml bei

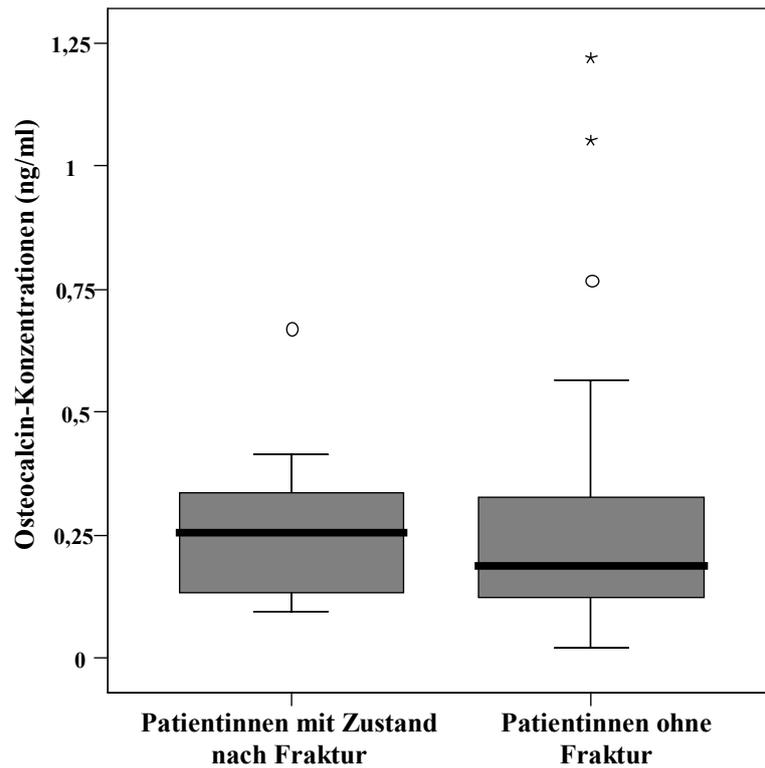
Patientinnen ohne Fraktur auf 131,1 ng/ml für die Patientinnen mit Zustand nach ossärer Fraktur (Abbildung 23 und Tabelle 8).



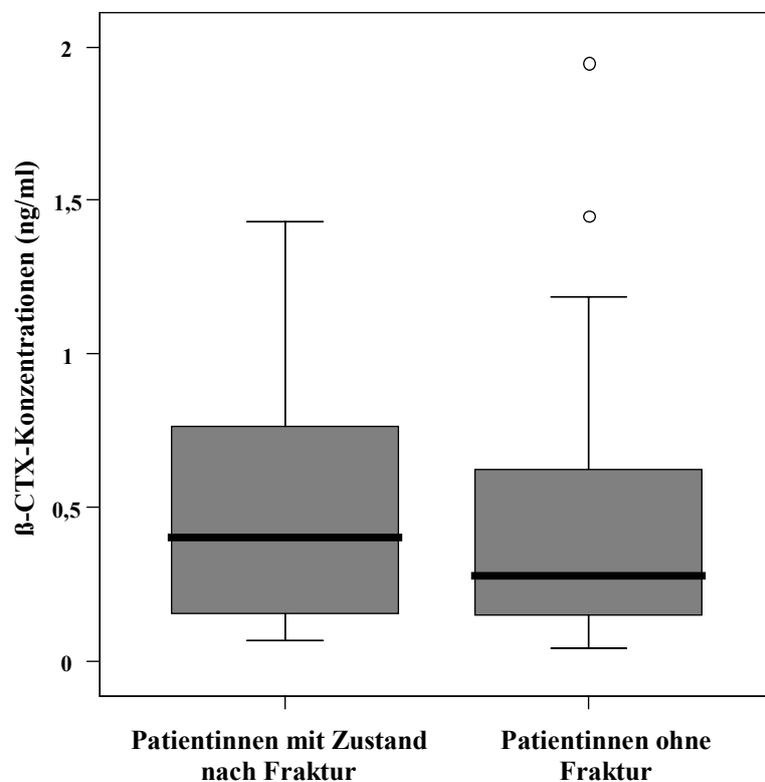
**Abbildung 23:** Box plot der PINP-baseline-Werte von Patientinnen mit Zustand nach Knochenfrakturen im Vergleich zu Patientinnen ohne Frakturen

Von den neun Patientinnen mit Zustand nach Knochenfraktur, hatten sieben mehr als sieben Knochenmetastasen und zwei zwischen eine bis sieben ossäre Filiae; drei hatten osteolytische Knochenmetastasen und die sechs anderen gemischte ossäre Filiae.

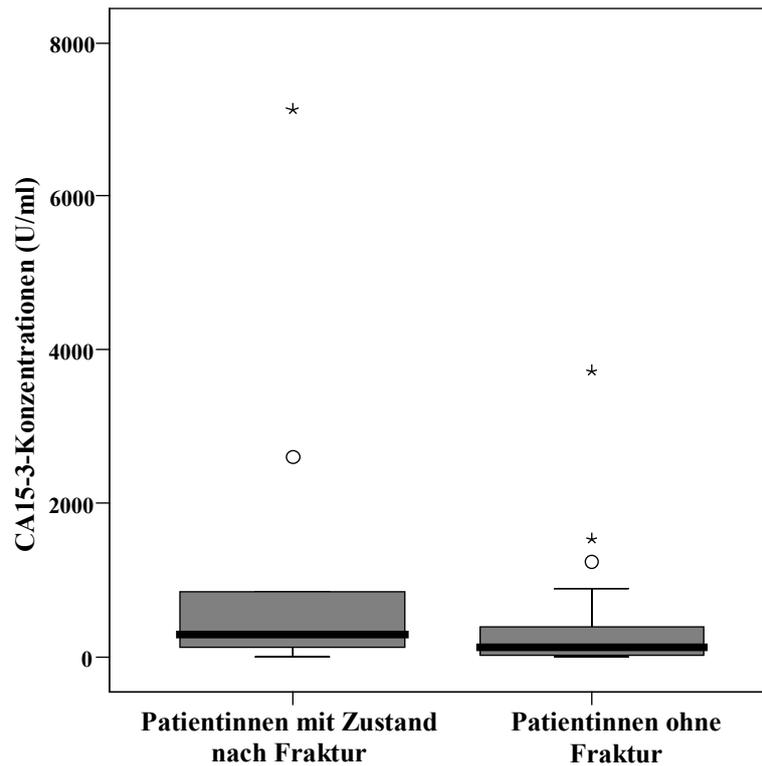
Obwohl die Mediane höher bei der Gruppe mit Knochenfraktur waren, fanden wir für die Knochenmarker Osteocalcin und  $\beta$ -Crosslaps sowie für den Tumormarker CA 15-3 keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen von Frauen mit jeweils p-Werten von  $p=0,64$  für Osteocalcin,  $p=0,58$  für  $\beta$ -CTX und  $p=0,28$  für CA 15-3 (Abbildungen 24-26 und Tabelle 8).



**Abbildung 24:** Box plot der Osteocalcin-baseline-Werte von Patientinnen mit Zustand nach Knochenfrakturen im Vergleich zu Patientinnen ohne Frakturen



**Abbildung 25:** Box plot der  $\beta$ -CTX-baseline-Werte von Patientinnen mit Zustand nach Knochenfrakturen im Vergleich zu Patientinnen ohne Frakturen



**Abbildung 26:** Box plot der CA 15-3-baseline-Werte von Patientinnen mit Zustand nach Knochenfrakturen im Vergleich zu Patientinnen ohne Frakturen

**Tabelle 8:** Mediane der vier Marker in Relation mit Knochenfrakturen in der Anamnese

Zustand nach Fraktur	PINP	$\beta$ -CTX	Osteocalcin	CA 15-3
Ja	131,1 ng/ml	0,4 ng/ml	0,26 ng/ml	287,2 U/ml
Nein	74,7 ng/ml	0,28 ng/ml	0,19 ng/ml	130,9 U/ml

### 3.7. Verlauf der biochemischen Marker in Relation zum Typ der Knochenmetastasen

Bei der Gruppe der Frauen mit ossärem Befall haben wir die Patientinnen in drei Subgruppen unterteilt, die den Charakteristika der Knochenmetastasen entsprechen: Patientinnen mit Osteolysen, Patientinnen mit osteoplastischen Knochenmetastasen und Patientinnen mit gemischten Knochenmetastasen. Für die Marker des Knochenaufbaus, PINP und Osteocalcin, lagen die Medianwerte zum Zeitpunkt baseline bei den Patientinnen mit osteolytischen Knochenmetastasen bei 78 ng/ml für PINP und 0,19 ng/ml für Osteocalcin; bei den

Patientinnen mit osteoplastischen Knochenmetastasen bei 109,3 ng/ml für PINP und 0,19 ng/ml für Osteocalcin und bei den Patientinnen mit gemischten Knochenmetastasen bei 84,4 ng/ml für PINP und 0,24 ng/ml für Osteocalcin. PINP schien also höher zu sein beim Aufbauprozess als beim Abbau. Der Mann-Whitney-Test zwischen osteoplastischen und osteolytischen Filiae fand keinen signifikanten Unterschied. Die p-Werte lagen bei  $p=0,69$  für PINP und  $p=0,76$  für Osteocalcin. Für den Knochenabbaumarker  $\beta$ -Crosslaps lagen die Medianwerte zum Zeitpunkt baseline bei den Patientinnen mit osteolytischen Knochenmetastasen bei 0,28 ng/ml, bei den Patientinnen mit osteoplastischen Knochenmetastasen bei 0,4 ng/ml und bei den Patientinnen mit gemischten Knochenmetastasen bei 0,28 ng/ml. Mit einem p-Wert von  $p=0,45$  ergab sich kein signifikanter Unterschied. Für CA 15-3 fanden wir mit  $p=1$  ebenfalls keinen Unterschied (Tabelle 8).

**Tabelle 9:** Medianwerte der vier Marker in Relation zum Typ der Knochenmetastasen.

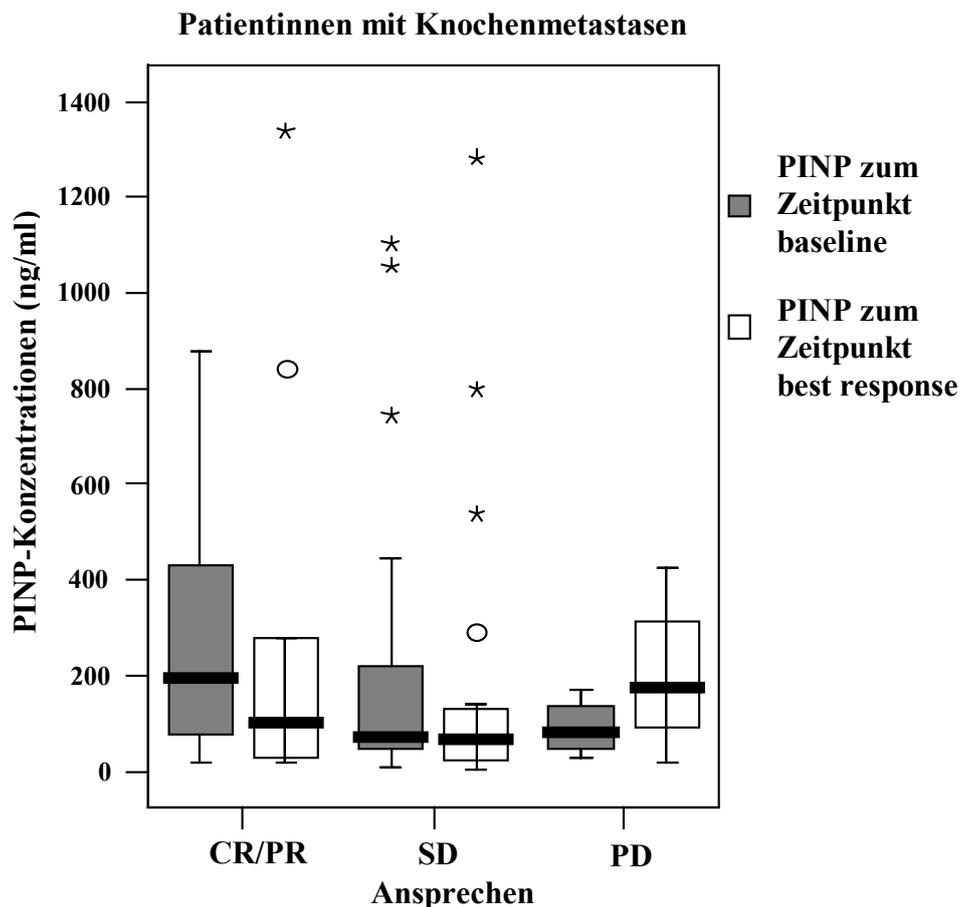
Typ von Knochenmetastasen	PINP	$\beta$ -CTX	Osteocalcin	CA 15-3
Osteolytisch	78 ng/ml	0,28 ng/ml	0,19 ng/ml	228,6 U/ml
Osteoplastisch	109,3 ng/ml	0,4 ng/ml	0,19 ng/ml	180 U/ml
Gemischt	84,4 ng/ml	0,27 ng/ml	0,24 ng/ml	138,1 U/ml

### 3.8. Verlauf der biochemischen Marker in Relation zum Tumoransprechen

Für die Gruppen von Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen haben wir die PINP-Werte zum Zeitpunkt baseline mit den PINP-Werten zum Zeitpunkt best response verglichen. Wir bildeten drei Subgruppen von Patientinnen: Patientinnen, die auf die Therapie angesprochen hatten mit einer kompletten (CR) oder partiellen Remission (PR), Patientinnen, bei denen sich die Erkrankung unter der Therapie stabilisiert hatte (SD) und Patientinnen, die unter der Therapie progredient (PD) gewesen waren.

In der Gruppe der Patientinnen mit Knochenmetastasen nahm der PINP-Wert bei Patientinnen, die auf die Therapie angesprochen hatten, deutlich ab. Der Median fiel hier von 194,3 ng/ml auf 100,4 ng/ml. Bei Patientinnen mit einer stabilen Erkrankung blieb er mit Medianen von 71 ng/ml und 65,4 ng/ml annähernd auf dem gleichen Niveau. Hingegen nahm

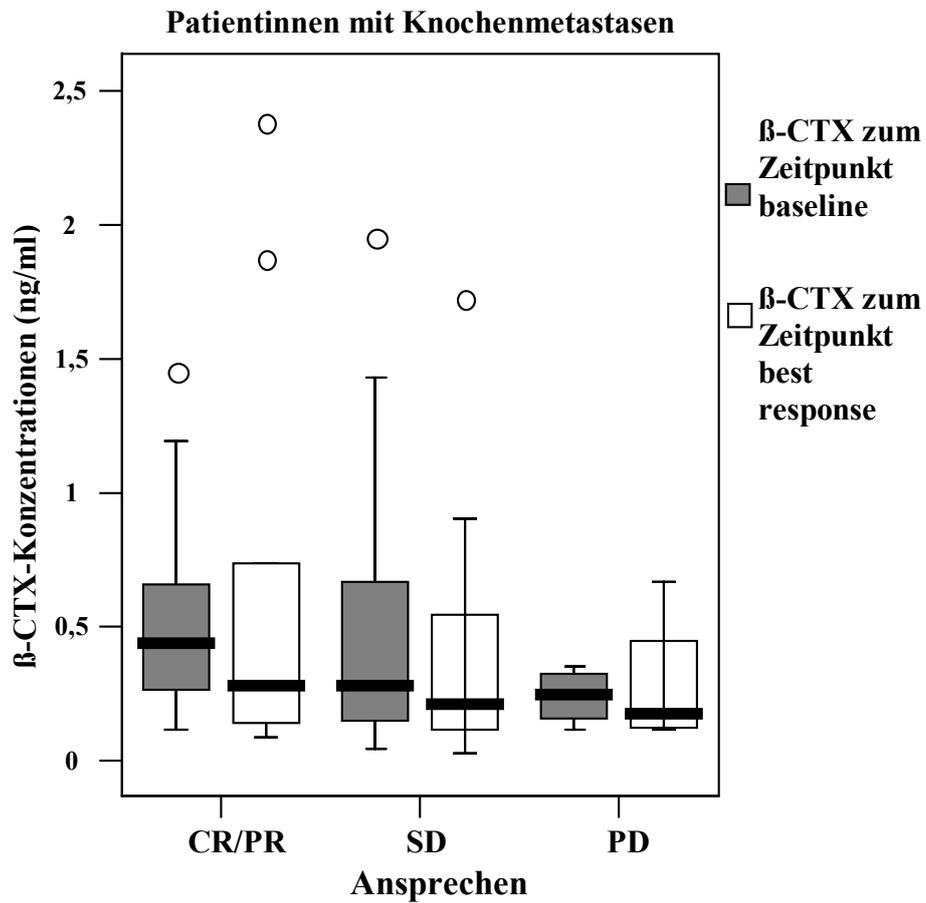
der PINP-Wert deutlich zu bei Patientinnen, die eine Progression des Brustkrebses erlitten. Die Mediane stiegen hier von 83,4 ng/ml auf 176,5 ng/ml. Aufgrund der geringen Subgruppengröße von nur 4 bis 25 Patientinnen pro Subgruppe haben diese Abweichungen jedoch keine statistische Signifikanz. Die jeweiligen p-Werte liegen bei  $p=0,23$ ,  $p=0,16$  und  $p=0,14$  (Abbildung 27).



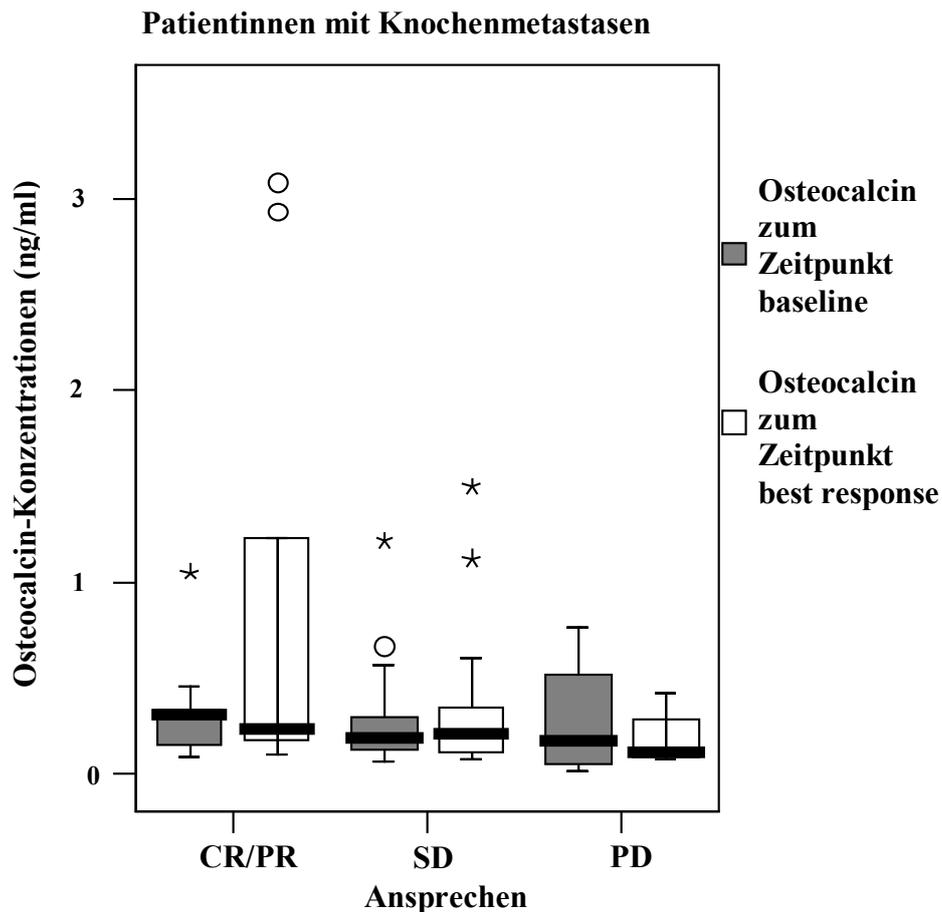
**Abbildung 27:** Box plot der PINP-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline für Patientinnen mit Knochenmetastasen im Vergleich zu den PINP-Konzentrationen zum Zeitpunkt best response

Bei den Patientinnen mit Knochenbefall, die auf die Therapie angesprochen hatten, nahmen die Werte von  $\beta$ -Crosslaps und Osteocalcin deutlich ab. Die Mediane fielen von 0,44 ng/ml auf 0,28 ng/ml für  $\beta$ -CTX und von 0,32 ng/ml auf 0,24 ng/ml für Osteocalcin. Überraschenderweise fielen die Mediane auch bei den Patientinnen mit einer progredienten Erkrankung, und zwar von 0,25 ng/ml auf 0,17 ng/ml für  $\beta$ -CTX und von 0,18 ng/ml auf 0,12 ng/ml für Osteocalcin. Bei den Patientinnen mit einer stabilen Erkrankung nahmen die

$\beta$ -CTX-Mediane von 0,28 ng/ml auf 0,21 ng/ml ebenfalls ab, während die Mediane von Osteocalcin zwischen 0,19 ng/ml und 0,22 ng/ml nahezu konstant blieben. Diese Unterschiede sind nicht signifikant mit jeweiligen p-Werte für  $\beta$ -CTX von  $p=0,36$ ;  $p=0,06$  und  $p=1$  sowie für Osteocalcin von  $p=0,27$ ;  $p=0,65$  und  $p=0,46$  (Abbildungen 28 und 29).



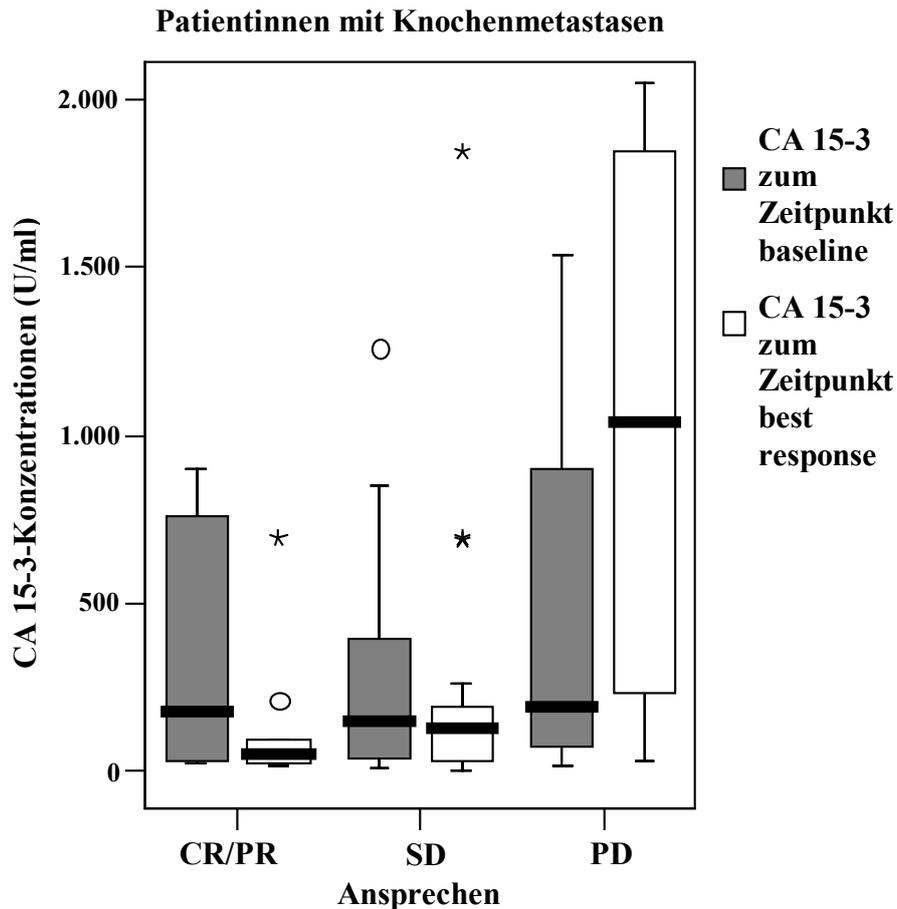
**Abbildung 28:** Box plot der  $\beta$ -CTX-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline bei Patientinnen mit Knochenmetastasen im Vergleich zu den  $\beta$ -CTX-Konzentrationen zum Zeitpunkt best response



**Abbildung 29:** Box plot der Osteocalcin-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline bei Patientinnen mit Knochenmetastasen im Vergleich zu den Osteocalcin-Konzentrationen zum Zeitpunkt best response

Für die Patientinnen ohne Knochenmetastasen, gab es keinen Unterschied zwischen den Medianen der drei Knochenmarker zum Zeitpunkt baseline und zum Zeitpunkt best response (Tabelle 10).

Innerhalb der Gruppe der Patientinnen mit Knochenmetastasen nahm der CA 15-3-Wert bei Patientinnen, die auf die Therapie angesprochen hatten, deutlich ab. Der Median fiel hier von 180 U/ml auf 51,6 U/ml. Bei den Patientinnen mit einer stabilen Erkrankung veränderte sich der Median nur geringfügig von 151,7 U/ml auf 131 U/ml. Bei Patientinnen mit einer Progression des Brustkrebses nahm der Median hingegen von 63 U/ml auf 1037 U/ml deutlich zu. Diese Ergebnisse sind statistisch signifikant mit jeweiligen p-Werten von  $p=0,003$ ,  $p=0,03$  und  $p=0,009$  (Abbildung 30).



**Abbildung 30:** Box plot der CA 15-3-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline für Patientinnen mit Knochenmetastasen im Vergleich zu den CA 15-3-Konzentrationen zum Zeitpunkt best response. Für die graphische Darstellung wurden drei Ausreißer herausgenommen

**Tabelle 10:** Mediane der vier Marker für Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen zum Zeitpunkt baseline und zum Zeitpunkt best response.

		PINP (ng/ml)	β-CTX (ng/ml)	Osteocalcin (ng/ml)	CA 15-3 (U/ml)
		baseline ⇒ best response			
<b>Ossäre Filiae</b>	<b>CR/PR</b>	194,3 ⇒ 100,4	0,44 ⇒ 0,28	0,316 ⇒ 0,243	180 ⇒ 51,6
	<b>SD</b>	71,0 ⇒ 65,4	0,28 ⇒ 0,21	0,19 ⇒ 0,22	151,7 ⇒ 131
	<b>PD</b>	83,4 ⇒ 176,5	0,25 ⇒ 0,17	0,18 ⇒ 0,12	193,7 ⇒ 1037
<b>Keine ossären Filiae</b>	<b>CR/PR</b>	57,2 ⇒ 62,4	0,23 ⇒ 0,22	0,23 ⇒ 0,26	49,7 ⇒ 23,5
	<b>SD</b>	54,2 ⇒ 61,9	0,30 ⇒ 0,22	0,18 ⇒ 0,21	33,4 ⇒ 36,8
	<b>PD</b>	95,6 ⇒ 102,9	0,38 ⇒ 0,48	0,22 ⇒ 0,23	63 ⇒ 74,6

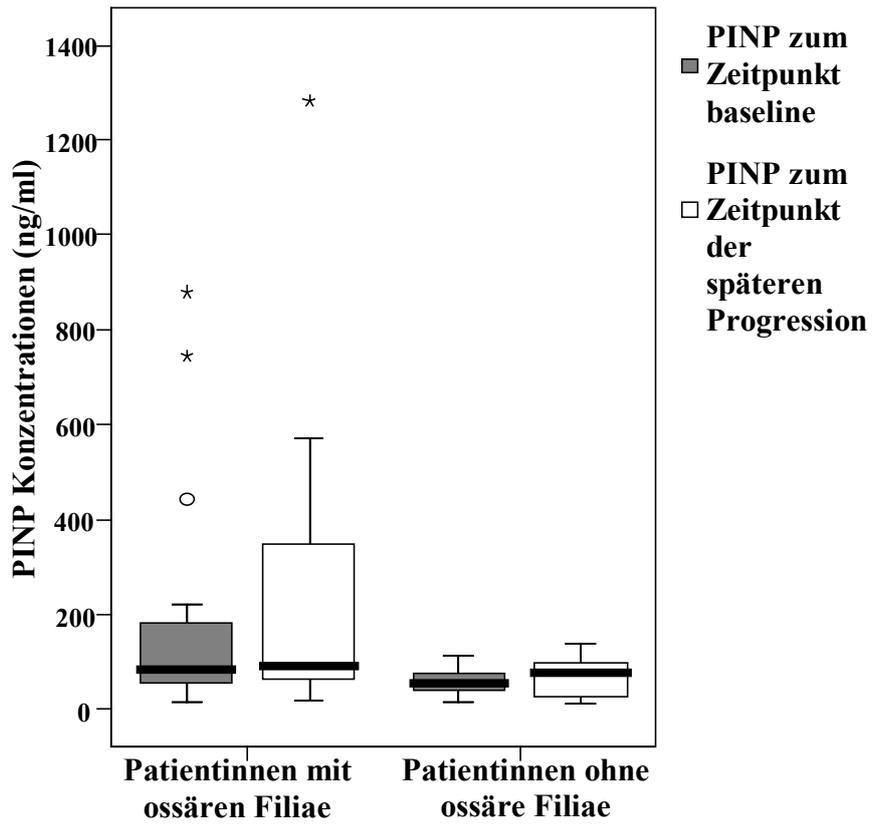
Bei Patientinnen ohne Knochenmetastasen, die auf die Therapie angesprochen hatten, fand sich eine leichte Abnahme des CA 15-3-Wertes zwischen baseline und best response mit Medianen von 49,7 U/ml und 23,5 U/ml; bei den Patientinnen mit Knochenmetastasen und einer stabilen Erkrankung blieb der Median mit Werten von 33,4 U/ml und 36,8 U/ml praktisch gleich; bei der einzigen Patientin, die eine Progression erlitt, stieg der CA 15-3-Wert von 63 U/ml auf 74,6 U/ml (Tabelle 10). Für die zwei ersten Subgruppen von Patientinnen sind diese Unterschiede statistisch nicht signifikant. Die dritte Subgruppe enthält nur eine einzige Patientin und ist deswegen statistisch nicht auswertbar.

### 3.9. Verlauf der biochemischen Marker in Relation bei späterer Progression

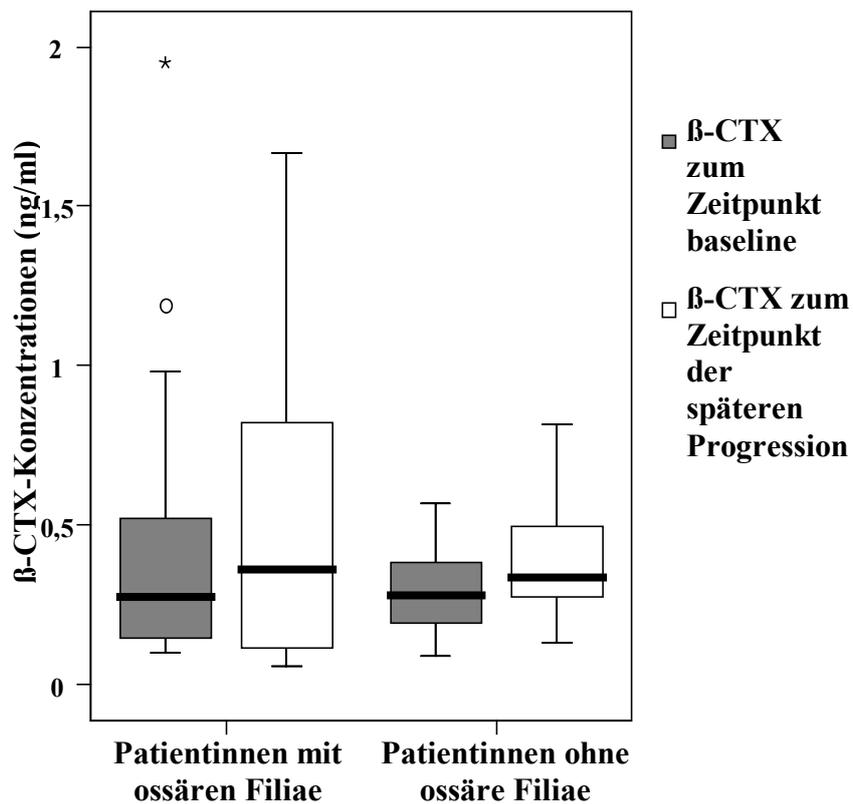
Für die Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen untersuchten wir die biochemischen Marker zum Zeitpunkt Progression im Vergleich zu dem baseline-Wert, unabhängig von dem Tumoransprechen zum Zeitpunkt best response. Nicht alle Patientinnen erlitten im Laufe der Zeit eine Progression, so dass unsere Gruppe von Patientinnen sich auf zwanzig Patientinnen mit ossärem Befall und zehn Patientinnen ohne Knochenmetastasen reduzierte.

Für PINP fanden wir keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen von Patientinnen mit und ohne Metastasen zum Zeitpunkt baseline und zum Zeitpunkt spätere Progression, mit einem p-Wert von  $p=0,054$ , wobei die Signifikanz knapp verfehlt wurde, sowie keinen Unterschied im Zeitverlauf mit  $p=0,065$  (Abbildung 31).

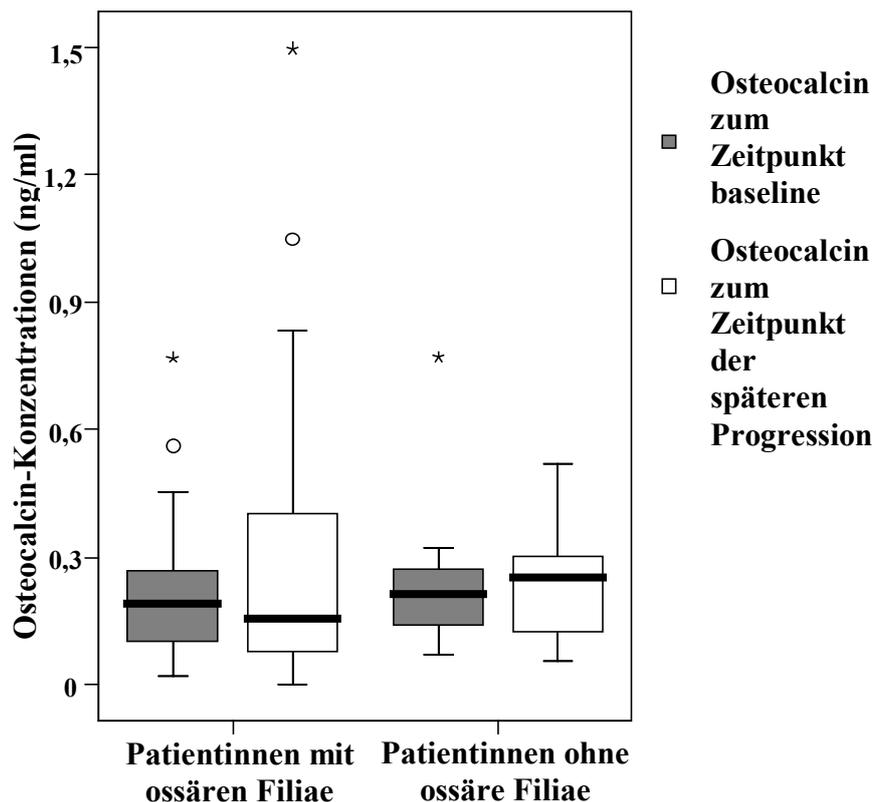
Für Osteocalcin und  $\beta$ -CTX ergab sich ebenso kein Unterschied mit p-Werten von  $p=0,58$  und  $p=0,62$  für Osteocalcin und  $p=1$  und  $p=0,09$  für  $\beta$ -CTX (Abbildungen 32 und 33).



**Abbildung 31:** Box plot der PINP-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline für Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen im Vergleich zu den PINP-Konzentrationen zum Zeitpunkt der späteren Progression



**Abbildung 32:** Box plot der  $\beta$ -CTX-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline für Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen im Vergleich zu den  $\beta$ -CTX-Konzentrationen zum Zeitpunkt der späteren Progression

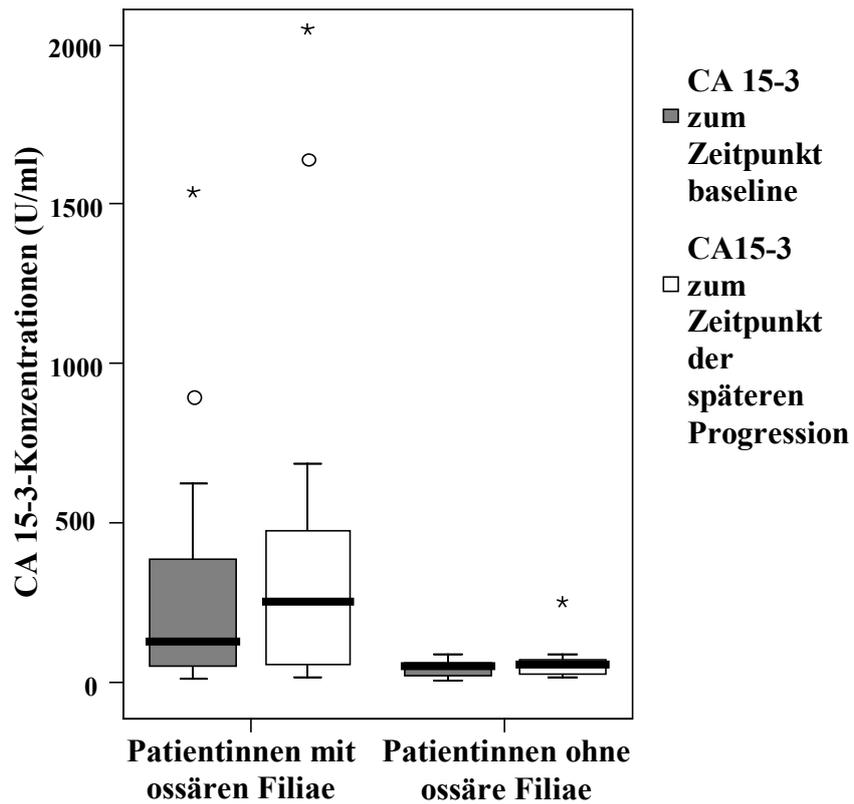


**Abbildung 33:** Box Plot der Osteocalcin-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline für Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen im Vergleich zu den Osteocalcin-Konzentrationen zum Zeitpunkt der späteren Progression

Für CA 15-3 fanden wir einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen von Patientinnen mit und ohne Metastasen zum Zeitpunkt baseline und zum Zeitpunkt der späteren Progression, mit einem p-Wert von  $p=0,001$ , aber keinen Unterschied im Zeitverlauf mit  $p=0,17$  (Abbildung 33). Für die Mediane der vier Marker siehe Tabelle 11.

**Tabelle 11:** Mediane der vier Marker zum Zeitpunkt baseline und zum Zeitpunkt der späteren Progression, für die Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen

	<b>PINP (ng/ml)</b>	<b><math>\beta</math>-CTX (ng/ml)</b>	<b>Osteocalcin (ng/ml)</b>	<b>CA 15-3 (U/ml)</b>
	<b>baseline <math>\Rightarrow</math> Progression</b>	<b>baseline <math>\Rightarrow</math> Progression</b>	<b>baseline <math>\Rightarrow</math> Progression</b>	<b>baseline <math>\Rightarrow</math> Progression</b>
<b>Ossäre Filiae</b>	84,9 $\Rightarrow$ 90,9	0,27 $\Rightarrow$ 0,36	0,19 $\Rightarrow$ 0,16	130,9 $\Rightarrow$ 256,8
<b>Keine ossären Filiae</b>	56,7 $\Rightarrow$ 78,2	0,18 $\Rightarrow$ 0,34	0,21 $\Rightarrow$ 0,25	53,6 $\Rightarrow$ 56,6



**Abbildung 34:** Box plot der CA 15-3-Konzentrationen zum Zeitpunkt baseline für Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen im Vergleich zu den CA 15-3-Konzentrationen zum Zeitpunkt der späteren Progression. Für die graphische Darstellung wurden drei Ausreißer herausgenommen