

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es einerseits, den neuen automatisierten Test für die Messung von PINP auf den Geräten Elecsys 2010®, Elecsys 1010® und Elecsys 170® von Roche® Diagnostics nach dem internationalen Standard (NCCLS-Kriterien für Knochenmarker (24)) zu prüfen und andererseits die klinische Anwendung von PINP im Vergleich zu anderen Markern der Knochenmetastasierung, Osteocalcin und β -Crosslaps sowie einem Tumormarker, CA 15-3, bei einem Patientinnenkollektiv mit Mammakarzinom zu evaluieren.

Die Intra-Assay-Präzision fand eine exzellente Wiederholbarkeit des Tests innerhalb eines Labors (Variationskoeffizienten von 1,1 bis 2,4% für die Kontrollproben und 1 bis 3,7% für die Serumproben). Der Ringversuch zeigte eine gute Reproduzierbarkeit in einem Zentrum sowohl mit Kontrollproben (median recovery von 100% - 117,2%) als auch mit Serumproben von Roche® Diagnostics (median recovery von 88,7% - 111,4%) und der Inter-Assay bewies eine gute Reproduzierbarkeit in den unterschiedlichen Zentren mit Kontrollproben von Roche® Diagnostics (Variationskoeffizienten von 2,4% - 5,9%) und vom Labor zusammengestellten Serumproben (Variationskoeffizienten von 1,7% - 6,7%). Diese guten Ergebnisse beweisen die Praktikabilität des Elektrochemilumineszenzassays von Roche® Diagnostics für die Routinemessung von PINP.

Melkko et al. fanden für den PINP-Radioimmunoassay (RIA) im Humanserum von Orion® Diagnostica, Espoo, Finnland, schlechtere Ergebnisse mit Variationskoeffizienten von 4,8% - 13,7% für den Intra-Assay und von 3,1% - 8,2% für den Inter-Assay (9). Die dänische Arbeitsgruppe von Ørum et al. untersuchte einen Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA) für PINP. Der Median der Variationskoeffizienten lag für den Intra-Assay bei 4,9% und für den Inter-Assay bei 5,3% (10). Die Ergebnisse sind ebenfalls weniger gut als die des ECLIA-Tests für PINP.

PINP existiert in vivo in zwei Hoch- und Niedriggewichtmolekülen, entsprechend jeweils den trimerischen und monomerischen Formen der α -1-Kette der Aminoproteptide vom Kollagen Typ I. Die thermische Verwandlung der trimerischen Form zur monomerischen Form findet bei 37 °C statt und ist in vivo ein ständig ablaufender Prozess (16-18). Brandt et al. demonstrierten, dass die Halbwertszeit der trimerischen Form von PINP bei 37 °C etwa bei zehn Stunden liegt. Im Gegensatz dazu bleibt die monomerische Form von PINP 72 Stunden

bei 37 °C unverändert (17). Die polyklonalen anti-PINP Antikörper der verschiedenen Immunoassays (RIA, ELISA, ECLIA) für PINP reagieren alle mit der selben α -1-Kette von PINP und erkennen beide Formen von PINP (9;10;25-27). Der Unterschied zwischen den Techniken liegt eher in verschiedenen funktionalen Affinitäten der Antikörper für die monomerische oder die trimerische Struktur von PINP, die die Reaktivität in der kompetitiven RIA-Technik (begrenzte Menge an Antikörpern), aber nicht in ELISA- (Enzym Linked Immunosorbent Assay) oder ECLIA-Techniken (Reagenzien in Exzess) verringern (18). De facto kann der Radioimmunoassay (RIA) von Orion® Diagnostica nur die in vivo labile trimerische Form von PINP erkennen, während der Elektrochemilumineszenzimmunoassay (ECLIA) und der Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA) beide, die monomerische und die trimerische Form von PINP, erkennen können. Die Labilität der trimerischen Form von PINP in vivo kann die weniger guten Ergebnisse des RIA-Tests erklären. In Abbildung 1 wurden die Bildung des Kollagenmoleküls mit der Abspaltung durch Proteasen der zwei N- und C-terminal Propeptide von Prokollagen Typ I dargestellt (28). Für PINP sind die zwei heterogene Formen des Moleküls abgebildet: die trimerische Form mit einer Tripelhelixdomäne, während die monomerische Form ein Nichttripelhelixdomäne aufweist.

Ein weiterer Vorteil des PINP-ECLIA-Tests gegenüber dem RIA-Test ist die Dauer des Tests von 18 Minuten versus zwei Stunden für den RIA-Test und auf jeden Fall, dass der Test keine radioaktive Substanz benötigt.

In der vorliegenden Arbeit konnte der Marker der Knochenmetastasierung PINP die Patientinnengruppe mit Knochenbefall von der Patientinnengruppe ohne ossäre Metastasen unterscheiden. Andere Studien bei Prostatakarzinom sowie bei Mammakarzinom ergaben ebenfalls eine gute Differenzierung der Gruppe von Patienten mit ossärem Befall von der Gruppe von Patienten ohne Knochenmetastasen durch PINP (13;14;29).

Osteocalcin und β -Crosslaps konnten in unserer Untersuchung keinen statistischen Unterschied zwischen den zwei Patientinnengruppen nachweisen. Diese Ergebnisse bestätigen die Studie von Jung et al. In dieser Untersuchung wurden zwei Patientengruppen mit Prostatakarzinom mit und ohne Knochenmetastasen miteinander verglichen. Die Messungen erfolgten ebenfalls durch einen ECLIA-Test auf dem Gerät Elecsys 2010® von Roche® Diagnostics. Sie fanden eine ähnliche area under the curve (AUC) wie wir für PINP

(AUC von 0,84), β -Crosslaps (AUC von 0,59) und Osteocalcin (AUC von 0,56) sowie ähnliche Sensitivität und Spezifität für PINP (jeweils 61% und 96%) (30).

Andere Studien ergaben unterschiedliche Ergebnisse für die Spezifität und die Sensitivität der zwei Knochenmarker β -Crosslaps und PINP, zum Beispiel zeigte die Untersuchung von de la Piedra et al, dass im Humanserum sowohl PINP als auch β -Crosslaps Patienten mit Knochenmetastasen von Patienten ohne ossären Befall bei Prostatakarzinom unterscheiden können (31). Im Vergleich bestätigte die Studie von Ebert et al. unsere Ergebnisse mit einer besseren Differenzierung der Knochenmetastasierung für PINP als für β -Crosslaps bei Patienten mit Lungenkarzinom (32).

Die Arbeitsgruppe von Coleman et al. zeigte bereits in 1988, dass Osteocalcin, ein nicht-kollagener Marker der Osteoblastenaktivität, signifikant höhere Werte bei Brustkrebspatientinnen mit Knochenmetastasen als bei solchen ohne ossären Befall vorwies (33). Jedoch verlor die Bestimmung durch Osteocalcin bei ossär metastasiertem Mammakarzinom in den letzten Jahren an Bedeutung, da andere Studien zwar einen erhöhten Median von Osteocalcin bei ossärem metastasiertem Brustkrebs, aber keine statistische Signifikanz nachwiesen (34;35).

Die Diagnostik von ossären Metastasen durch einen biochemischen Marker des Knochenmetabolismus ist also durchaus möglich. Dabei zeigt unsere Untersuchung in Übereinstimmung mit der Fachliteratur, dass PINP dafür geeigneter als Osteocalcin oder β -Crosslaps erscheint.

Als weiterer Marker konnte CA 15-3 in der vorliegenden Studie die zwei Gruppen von Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen unterscheiden. Dieses muzinöse Glykoprotein ist das Produkt des sogenannten MUC-1-Gens und wird an der Oberfläche des Brustdrüsenepithels exprimiert (36). CA 15-3 wird in der Nachsorge von Patientinnen mit Mammakarzinom im Stadium I-III, als Indikator von möglicher Metastasenentwicklung sowie in der Verlaufsbeobachtung von metastasierten Mammakarzinompatientinnen angewendet (37). In der Literatur fanden wir zwei Arbeiten über CA 15-3 als Indikator der Knochenmetastasierung bei Patientinnen mit Mammakarzinom. Diese Arbeitsgruppen verglichen beide die Ergebnisse der Knochenszintigraphie als Referenzuntersuchung für die Diagnose von Knochenmetastasen mit dem CA 15-3-Wert. Beide fanden einen statistischen

Unterschied für den CA 15-3-Wert zwischen der Gruppe von Patientinnen mit und ohne Knochenmetastasen mit einer Spezifität von 86% und einer Sensitivität von 78% (38), aber keine Korrelation mit der Anzahl an Knochenmetastasen (39). Die Knochenszintigraphie ist also Tumormarkern und Markern des Knochenmetabolismus zur Diagnosestellung des Knochenbefalls überlegen und bleibt bei Knochenmetastasen weiterhin der Diagnosestandard.

Einige Studien zeigen die Überlegenheit der Knochenszintigraphie gegenüber Markern des Knochenaufbaus (PINP, PICP, knochenspezifische alkalische Phosphatase, total alkalische Phosphatase) sowie Marker des Knochenabbaus (DPD-Crosslinks, PYD, ICTP, CTX, Trap 5b) (32;40). Da eine einfache und zuverlässige nichtbildgebende Detektionsmethode der ossären Filiae weiterhin nicht vorhanden ist, bleibt so die Knochenszintigraphie der Goldstandard für die Diagnosestellung von Knochenmetastasierung. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben keinen Anlass, diesen Standard zu verändern.

Der Knochenstoffwechsel variiert extrem im Laufe des Lebens eines Menschen. Einer Wachstumsperiode in der Kindheit bis zum 20. Lebensjahr folgt ein Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau über Jahrzehnte. Ab der Menopause bei Frauen und etwa ab dem 60. Lebensjahr bei Männern ist ein Verlust an Knochenmasse und die eventuell daraus folgende Osteopenie beziehungsweise Osteoporose zu verzeichnen. Diese Veränderungen des Knochenmetabolismus können sowohl bei Männern (41) als auch bei Frauen (42) durch Veränderung der Werte der Knochenmarker gut beobachtet werden. Die Studie von Peris et al. bewies, dass bei Frauen diese Marker bereits in der Perimenopause zunehmen. Sie untersuchten 14 Frauen mit chirurgisch induzierter Menopause im Vergleich zu 31 prämenopausalen Frauen im gleichen Alter. Schon drei Monate nach dem chirurgischen Eingriff zeigten die Marker der Knochenresorption und der Knochenformation im Serum eine deutliche Zunahme, insbesondere PINP und β -CTX (43).

Diese Knochenmarker werden seit Jahren sowohl im Rahmen von Studien als auch in der Praxis für die Verlaufsbeurteilung des Ansprechens auf eine Bisphosphonat- oder Hormontherapie bei Patienten mit Osteoporose verwendet. Unter Therapie werden die Knochenveränderungen erst Monate später mittels normalem Röntgen, Knochendichtemessung (BMD: bone mass density) oder DEXA (dual energy X-ray absorptiometry bone scan) festgestellt, während die Knochenmarker schon nach ein paar Wochen einen Unterschied im Knochenstoffwechsel andeuten können. In diesem Zusammenhang haben

bereits Osteocalcin, PINP und β -Crosslaps im Serum ihren Nutzen in vielen verschiedenen Studien bewiesen (42-44).

Durch die medikamentöse (Hormon- oder Chemotherapie) Behandlung des Mammakarzinoms haben die Frauen sowohl in der Nachsorge als auch in der metastasierten Situation ein erhöhtes Risiko, eine Osteoporose zu entwickeln und eine Fraktur zu erleiden (45;46). Die Untersuchung von Kanis et al. konnte die erhebliche Steigerung des Frakturrisikos von Mammakarzinompatientinnen nachweisen (47). Die Inzidenz an Wirbelkörperfrakturen war schon bei Erstdiagnose des Mammakarzinoms fünfmal höher als beim gesunden Kontrollkollektiv (Odds Ratio 4,7; 95% Konfidenzintervall 2,3 - 9,9). Im Fall einer Niedrigrisiko-Hautmetastasierung ohne Nachweis eines Knochenbefalls stieg das Risiko sogar um den Faktor 20 an (Odds Ratio 22,7; 95% Konfidenzintervall 9,1 - 57,1). Als besonders gefährdet gelten dabei Frauen, die allgemeine Risikofaktoren für eine Osteoporose haben. Die aktuellen Empfehlungen der ASCO (American Society of Clinical Oncology) bezüglich Mammakarzinom weisen auf die Notwendigkeit der Berücksichtigung des erhöhten Osteoporoserisikos von rückfallsfreien Mammakarzinompatientinnen hin (48).

In der vorliegenden Untersuchung unterschieden sich die vier Marker weder in der Gruppe der Frauen mit Knochenmetastasen noch in der Gruppe der Patientinnen ohne Knochenbefall bezüglich des Menopausalstatus.

Einige Studien haben bereits belegt, dass PINP einen guten Hinweis für die Anzahl an Knochenmetastasen bei Prostatakarzinom (gemessen am Soloway's score) geben kann (13;49). Unsere Untersuchung ist eine der ersten Studien, die zeigt, dass die PINP-Werte die Anzahl an Knochenmetastasen auch beim Mammakarzinom reflektieren, mit einem Median von PINP deutlich über dem Normbereich für Patientinnen mit mehr als sieben ossären Filiae. β -Crosslaps und Osteocalcin zeigten in der vorliegenden Arbeit zwar einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe von Patientinnen mit 1-7 Knochenmetastasen und der Gruppe mit mehr als sieben Knochenmetastasen, aber die Mediane beider Marker blieben deutlich unter dem Normbereich, so dass diese zwei Marker für die Anzahl an Knochenmetastasen nicht aussagekräftig genug erscheinen. Für CA 15-3 fand sich keinen Unterschied zwischen den zwei Gruppen von Frauen. Diese Ergebnisse entsprechen denen von Begic et al. (39).

Einige Studien fanden eine Korrelation zwischen PINP-Konzentrationen und der Aggressivität des Tumors sowohl beim Lungenkarzinom (50) als auch beim Brustkrebs. Der PINP-Wert reflektierte allgemein die extrazelluläre Homeostase der Matrix und die Aggressivität des Brustkrebses (51;52). Die Mammakarzinompatientinnen mit hohen PINP-Werten waren statistisch signifikant kränker, hatten eine erhöhte Tumorlast und zeigten eine niedrigere Ansprechrate auf eine Anthrazyklin-basierte Chemotherapie sowie einen kürzeren Zeitraum bis zur Progression der Erkrankung als die Patientinnen mit niedrigen PINP-Werten. Die niedrigsten PINP-Werte wurden dann beobachtet, wenn die Patientinnen nur einen Lymphknoten- und Hautbefall zeigten; zunehmende PINP-Werte wurden beim ossären und viszeralem Befall gefunden. Zusammenfassend zeigte diese Studie: aggressiver Brustkrebs induziert eine große fibroproliferative Antwort mit Synthesis von Kollagen Typ I. Diese Ergebnisse entsprechen einer anderen Studie mit 373 lymphknotenpositiven Mammakarzinompatientinnen, bei denen postoperative PINP-Werte gemessen wurden (53). Insgesamt 120 Patientinnen (32%) erlitten einen Rückfall der Erkrankung während der Nachsorge. Der PINP-Mittelwert war signifikant höher bei den Patientinnen, die eine Metastasierung entwickelten, als bei den Frauen ohne Metastasen. Wenn Patientinnen nur mit Knochenmetastasen oder Patientinnen mit Knochen- und Weichteil- und/oder viszeralem Metastasen oder aber Patientinnen mit nur viszeralem oder Weichteilmetastasen mit den Patientinnen ohne Metastasen verglichen wurden, zeigte sich PINP signifikant höher in der Gruppe mit Knochenmetastasierung.

Insgesamt scheinen die PINP-Werte ein wichtiger diagnostischer und prognostischer Marker mit direkten therapeutischen Konsequenzen zu sein. Zum Beispiel sollten Patientinnen mit metastasiertem Mammakarzinom und erhöhtem PINP-Wert öfter zu ihrem Arzt gehen, eventuell sollten bei ihnen öfter bildgebende Untersuchungen durchgeführt werden, und letztendlich sollten sie eine frühere und gegebenenfalls aggressivere systemische Therapie als andere Frauen mit niedrigem PINP-Wert bekommen.

PINP, als Produkt der Bildung von Kollagen Typ I, ist ein früherer Marker des Aufbaus der Knochenmatrix; Osteocalcin wird in einer deutlich späteren Phase während der Mineralisierung der Knochenmatrix produziert; β -CTX ist ein Abbauprodukt von Kollagen Typ I. Daher wurde in der vorliegenden Untersuchung die Frage gestellt, ob ein Unterschied zwischen den Markern in Bezug auf den Typ (osteolytisch, osteoplastisch oder gemischt) der

Knochenfiliae zu finden ist. In der Literatur wurden nur wenige Arbeiten mit dieser Fragestellung veröffentlicht.

Bereits in 1988 zeigten Coleman et al, dass in einer Gruppe von Patienten mit Mamma- oder Prostatakarzinom bei osteoplastischen Knochenmetastasen die Osteocalcinkonzentration höher war als bei osteolytischen (33). Unsere Ergebnisse mit Osteocalcin konnten diese Untersuchung nicht bestätigen. Ebert et al. untersuchten β -CTX im Serum und PINP bei ossär metastasiertem Lungenkarzinom und fanden, so wie wir, keinen Unterschied zwischen osteolytischen und osteoplastischen Filiae für die zwei Marker (32).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Patientinnen mit Zustand nach Knochenfraktur einen erhöhten PINP-Wert aufwiesen. Ingle et al. zeigten in zwei verschiedenen Studien bei Personen ohne bekannte Knochenerkrankung, aber mit frischer Knochenfraktur, dass sowohl Osteocalcin als auch PINP zwischen einer bis vier Wochen nach der Fraktur erhöht waren und 52 Wochen nach dem Ereignis immer noch nicht zum Baselinenniveau zurückgekommen waren (54;55). Obrandt et al. bewiesen sogar, dass Osteocalcin, PINP und β -CTX zwei Jahre nach einer Knochenfraktur bei älteren Frauen erhöht blieben (56). Kann man diese Ergebnisse bei Menschen ohne ossäre Filiae auf Patientinnen mit Knochenmetastasen übertragen? Wenn ja, wäre bei einem Patienten mit einer Fraktur in der Anamnese aus mindestens den letzten zwei Jahren eine Messung des Knochenmetabolismus mit einem Marker nicht interpretierbar, da metabolisch verfälscht.

Veränderungen im Knochen werden erst nach ein paar Monaten mittels Knochenszintigraphie oder röntgenologischer Untersuchung sichtbar. Des Weiteren ist die Wirksamkeitskontrolle einer Therapie der Knochenmetastasen schwierig und wird normalerweise später initiiert als das restaging von viszeralen oder Weichteilmetastasen. Die Verwendung von spezifischen biochemischen Markern des Knochenmetabolismus könnte die Verlaufsbeurteilung der Knochenmetastasen unter Therapie verbessern und ein besseres und früheres Monitoring der Knochenmetastasierung ermöglichen. Nur wenige Studien stellten die Frage der Nützlichkeit von PINP, Osteocalcin und β -CTX als Verlaufparameter bei Knochenmetastasen.

In der vorliegenden Untersuchung zeigten Osteocalcin und β -Crosslaps schlechtere Ergebnisse in der Verlaufsbeurteilung der metastasierten Mammakarzinompatientinnen als PINP. Bereits in 1988 zeigten Coleman et al, dass die Osteocalcin-Konzentration beim ossär

metastasierten Mamma- und Prostatakarzinom beim Ansprechen auf die Therapie im ersten Monat erhöht war und dann in den nächsten Monaten abnahm (33). Body et al. verglichen bei ossär metastasiertem Mammakarzinom Osteocalcin und β -CTX im Serum vor und nach Einleitung einer Bisphosphonattherapie. Die Osteocalcin-Werte blieben stabil, während β -CTX eine statistisch signifikante Verringerung aufwies (57). Garnero et al. kamen in einer ähnlichen Studie bei Prostatakarzinom zu den gleichen Ergebnissen (58). Koizumi et al. untersuchten Osteocalcin und PINP bei 31 Patienten mit ossär metastasiertem Prostatakarzinom und zeigten, dass die Ratio von Osteocalcin und PINP dem klinischen Ansprechen in 94% der Fälle entsprach (59).

Eine Studie von Kobayashi et al. untersuchte die PINP-Werte in Bezug auf das Ansprechen auf die Therapie bei metastasiertem Prostatakarzinom. Sie unterteilten die Patienten in drei Subgruppen: Patienten mit ossären Metastasen und progredienter Erkrankung (Gruppe 1), ossär metastasierte Patienten mit stabiler Erkrankung (Gruppe 2) und Patienten ohne Knochenbefall (Gruppe 3). Die PINP-Werte für die Patienten, die eine Progression erlitten, waren signifikant höher als die der Gruppen 2 und 3 (49). Eine andere Studie von Lüftner et al. untersuchte PINP, AP, DPD und ICTP bei 73 Patientinnen mit ossär metastasiertem Mammakarzinom; im Zusammenhang mit dem Ansprechen auf die Therapie wurden die Patientinnen in responder (stabile oder regrediente Erkrankung) und progrediente Patientinnen unterteilt. PINP zeigte nach der AP die besten Ergebnisse für die Normalisierung des Wertes bei respondern. Der Unterschied, genauso wie in unserer Untersuchung, war aber nicht statistisch signifikant (60). Jedoch sind die Ergebnisse von PINP in den beiden Studien besser für die Verlaufsbeurteilung der Knochenmetastasen bei Prostatakarzinom mit einem statistischen Unterschied zwischen den Patienten, die angesprochen haben und denen, die progredient waren, als bei Mammakarzinom, wo die PINP-Verringerung statistisch nicht signifikant war. Wenn wir uns auf diese Ergebnisse stützen, können wir nicht ausschließen, dass die Qualität der Diagnosestellung und der Verlaufsbeurteilung mit Markern des Knochenmetabolismus abhängig von der Tumorentität ist. Das Prostatakarzinom kann ein gutes Beispiel für die Diagnosequalität der Knochenmarker sein, es häufiger als alle anderen Krebsarten zu einer fortgeschrittenen knochenspezifischen Tumorlast führt.

Der klinische Nutzen des Tumormarkers CA 15-3 in der Verlaufsbeurteilung von Mammakarzinompatientinnen in der Nachsorge oder unter Therapie ist längst in mehreren

Studien (61-66) bewiesen worden. In unserer Untersuchung zeigt sich auch CA 15-3 als einziger Marker, der das Therapieansprechen (PR/CR, SD, PD) genau darstellen kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass PINP im Vergleich zu Osteocalcin, β -CTX oder CA 15-3 dem Ausmaß an Knochenmetastasen bei Mammakarzinom entspricht und den Zustand nach Frakturen in der Anamnese widerspiegelt. Als Verlaufparameter der Knochenmetastasierung bei Mammakarzinom erscheint aber PINP nicht sehr geeignet. Für diese präzise Fragestellung war aber unsere Anzahl an Patientinnen zu gering, so dass eine ähnliche Studie mit größeren Patientenkollektiven sinnvoll wäre.