

Aus der Klinik für Urologie, Campus Charité Mitte
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Osteoprotegerin im Serum als Indikator der
Knochenmetastasierung beim Prostatakarzinom**
-
**ein Vergleich der diagnostischen Validität mit
konventionellen Knochenmarkern**

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina von Hößlin

aus München

Gutachter: 1 Prof. Dr. K. Jung
2. Prof. Dr. R. Lichtinghagen
3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Lun

Datum der Promotion: 01.06.2008

Teilaspekte der vorliegenden Dissertationsschrift wurden in nachfolgenden Arbeiten und Abstracts bzw. Postern publiziert:

1. Jung K, Lein M, v. Hößlin K, Brux B, Schnorr D, Loening SA, Sinha P.
"Osteoprotegerin in serum as novel marker of bone metastatic spread in prostate cancer."
Clin Chem 2001; 47:2061-3.

2. Jung K, Lein M, v.Hößlin K, Grosse A, Roth S, Possinger K, Lüftner D.
"Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANK-L) in the serum of healthy adults."
Int J Biol Markers 2002; 17:177-81.

3. v. Hößlin K, Jung K, Lein M, Schnorr D, Loening SA.
"Osteoprotegerin (OPG) as a potential marker for bone metastases in patients with prostate cancer."
12th European Students Conference at the Charité; Berlin, 14.-19.11.2001.

4. Jung K, Lein M, Stephan C, v. Hößlin K, Semjonow A, Sinha P, Loening S, Schnorr D.
"Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate cancer patients with bone metastatic spread: Diagnostic and prognostic implications"
Int J Cancer 2004;111:783-91.

Inhaltsverzeichnis.....	I
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung und Aufgabenstellung.....	1
2. Theoretischer Hintergrund.....	3
2.1 Epidemiologie und Diagnostik des Prostatakarzinoms.....	3
2.2 Knochenmetastasen beim Prostatakarzinom.....	4
2.2.1 Diagnostik durch bildgebende Verfahren.....	5
2.2.2 Physiologie und Pathologie des Knochenstoffwechsels.....	6
2.2.3 Serummarker des Knochenstoffwechsels.....	10
2.2.4 Marker des Knochenaufbaus.....	10
2.2.4.1 Alkalische Phosphatase (AP).....	10
2.2.4.2 Knochenspezifische alkalische Phosphatase (Ostase).....	11
2.2.5 Marker des Knochenabbaus.....	12
2.2.5.1 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP).....	12
2.2.5.2 N-Telopeptid des Typ I Kollagens (NTx).....	13
2.2.6 Serummarker der Osteoklastogenese.....	14
2.2.6.1 Osteoprotegerin (OPG) , RANK und RANKL.....	14
3. Material und Methoden.....	19
3.1 Probanden.....	19
3.1.1 Kontrollen.....	20
3.1.2 Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH).....	20
3.1.3 Patienten mit Prostatakarzinom ohne Metastasen (PCa pN0/N0 M0).....	20
3.1.4 Patienten mit Prostatakarzinom mit Lymphknotenmetastasen ohne Knochenmetastasen (PCa pN1/N1 M0).....	21
3.1.5 Patienten mit Prostatakarzinom mit Knochenmetastasen (PCa M1).....	21
3.2 Probenmaterial.....	22
3.3 Eingesetzte Methoden.....	22
3.3.1 Bestimmung der Aktivität der Gesamt-AP.....	22
3.3.2 Bestimmung der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (Ostase).....	22
3.3.3 Bestimmung der tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP).....	24
3.3.4 Bestimmung des N-Telopeptids des Typ I Kollagens (NTx).....	26
3.3.5 Bestimmung des Osteoprotegerins (OPG).....	27
3.4 Statistische Auswertung.....	29

4.	Ergebnisse.....	30
4.1	Analytische Präzision der durchgeführten Bestimmungen.....	30
4.2	Ermittlung der markerspezifischen Referenzgrenzen in der Kontrollgruppe.....	30
4.2.1	Altersabhängigkeit.....	31
4.2.2	Verteilungsprüfung der Markerkonzentrationen.....	33
4.2.3	Berechnung der Referenzgrenzen.....	34
4.3	Werte Verteilung der Parameter im Serum der Patientengruppen.....	36
4.4	Korrelationen zwischen den Markern und klinischen Daten.....	39
4.4.1	Korrelationen der Marker untereinander in den Patientengruppen.....	39
4.4.2	Korrelationen zwischen den Markern und dem Tumorstadium/ -grad.....	42
4.4.3	Einfluss der antiandrogenen Behandlung auf die Markerkonzentrationen..	42
4.5	Bewertung der diagnostischen Validität.....	45
5.	Diskussion.....	49
5.1	Problem und klinische Relevanz der Diagnostik von Knochenmetastasen.	49
5.2	Beurteilung der Methodik und Analytik.....	50
5.2.1	Beurteilung der Analytik anhand der intra- und interseriellen Präzision....	51
5.2.2	Referenzgrenzen in den eigenen Kontrollgruppen im Vergleich zu den Angaben der Hersteller.....	51
5.3	Eignung der untersuchten Marker als diagnostische Indikatoren einer Knochenmetastasierung.....	53
5.3.1	Marker des Knochenaufbaus: AP und Ostase.....	53
5.3.2	Marker des Knochenabbaus: TRAP und NTx.....	55
5.3.3	Marker der Osteoklastogenese: Osteoprotegerin.....	58
5.4	Osteoprotegerin als Prognosemarker beim Prostatakarzinom.....	62
5.5	Schlussfolgerung.....	63
6.	Zusammenfassung.....	64
7.	Literaturverzeichnis.....	66

8.	Anhang	78
8.1	Eidesstattliche Erklärung.....	78
8.2	Lebenslauf.....	79
8.3	Danksagung.....	80

Tabelle 1	Metabolische Knochenerkrankungen mit Beteiligung des OPG/ RANK/ RANKL-Systems.....	17
Tabelle 2	Ergebnisse der intra- und interseriellen Präzision.....	30
Tabelle 3	Deskriptive Statistik der Konzentrationen von AP, Ostase, TRAP, NTx und OPG in der Kontrollgruppe.....	34
Tabelle 4	Referenzgrenzen der AP, Ostase, TRAP, von NTx und OPG in der Kontrollgruppe sowie die Referenzgrenzen entsprechend den Herstellerangaben.....	35
Tabelle 5	Spearman-Korrelationskoeffizienten zwischen allen Knochenmarkern sowie dem PSA in der zusammengefassten Gruppe Kontrollpersonen, BPH-Patienten und PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen.....	40
Tabelle 6	Spearman-Korrelationskoeffizienten zwischen allen Knochenmarkern in der Gruppe der knochenmetastasierten PCa-Patienten.....	41
Tabelle 7	Spearman-Korrelationskoeffizienten der Marker zum Tumorstadium und dem WHO-Grad.....	42
Tabelle 8	Ermittelte diagnostische Sensitivitäten und Spezifitäten aller 5 Knochenmarker.....	47

Abbildung 1	Zusammenhang von osteoklastischer Osteolyse und osteoblastischer Osteosklerose.....	7
Abbildung 2	Schema der Osteoklastenzelllinie und ihre Beziehung zur Monozyten- Makrophagen-Zelllinie.....	9
Abbildung 3	Regulation des OPG/ RANK/ RANKL-Systems.....	15
Abbildung 4	Struktur und Funktion von Osteoprotegerin (OPG).....	17
Abbildung 5	Altersabhängigkeiten der Serummarker AP, Ostase, TRAP, NTx und OPG.....	32
Abbildung 6	Häufigkeitsverteilungen der Serummarker AP, Ostase, TRAP, NTx und OPG.....	33
Abbildung 7	Konzentration der AP in den untersuchten Gruppen.....	36
Abbildung 8	Konzentration der Ostase in den untersuchten Gruppen.....	37
Abbildung 9	Konzentration der TRAP in den untersuchten Gruppen.....	37
Abbildung 10	Konzentration von NTX in den untersuchten Gruppen.....	38
Abbildung 11	Konzentration von OPG in den untersuchten Gruppen.....	38
Abbildung 12	Box-und-Whisker-Diagramme der Konzentrationen der AP, Ostase, NTx, OPG und TRAP in der pN1M0-Gruppe mit und ohne Hormonbehandlung.....	44
Abbildung 13	ROC-Kurven aller 5 Knochenmarker.....	45

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
b-AP	Knochenspezifische alkalische Phosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BPH	Benigne Prostatahyperplasie
CT	Computertomographie
DRU	Digital-rektale Untersuchung
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EOD	Extent of Disease
Fa.	Firma
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
IL	Interleukin
kDa	KiloDalton
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MRT	Magnetresonanztomographie
NF-kB	Nuclear Factor –Kappa B
NTx	N-terminales Telopeptidpeptid des Kollagen Typ I
OCIF	Osteoclastogenesis Inhibitory Factor
ODAR	Osteoclast Differentiation and Activation Receptor
ODF	Osteoclastogenesis Differentiation Factor
OPG	Osteoprotegerin
p	Signifikanzbereich
PCa	Prostatakarzinom
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTH	Parathormon

RANK	R eceptor A ctivator of Nuklear F actor K appa B
RANKL	R eceptor A ctivator of Nuklear F actor K appa B - L igand
ROC	R eceiver O peration C haracteristics
Rs.	K orrelationskoeffizient nach Spearman
Tab.	T abelle
TNF	T umornekrose f aktor
TR1	T umor Necrosis Factor R eceptor-Like Molecule 1
TRAIL	T NF- r elated A ppoptosis I nducing L igand
TRANCE	T NF- r elated A ctivation I nduced C ytokine
TRAP	T artrate- r esistente saure P hosphatase
TRUS	T ransrektaler U ltraschall
vs.	V ersus
PINP	P rokollagen T yp I N -terminales P ropeptid

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Das Prostatakarzinom (PCa) ist der häufigste bösartige Tumor des Mannes.

Im fortgeschrittenen Stadium wird dieser Tumor oft von den Komplikationen einer Skelettmetastasierung begleitet. Die Therapie des PCa richtet sich nach dem jeweiligen Ausbreitungsgrad der Krankheit. Ein potentiell kuratives Verfahren setzt ein lokalisiertes, organbegrenztet Tumorleiden ohne Metastasen voraus. Hierbei stellt sich das Problem, dass makroskopische Skelettläsionen durch bildgebende Verfahren erst ab einer bestimmten Größe dargestellt werden, eine Mikrometastasierung wird häufig nicht sicher erfasst (1-3).

Diese Situation kann für den Patienten von entscheidender Bedeutung sein.

So werden beispielsweise PCa-Patienten ohne Nachweis einer Metastasierung einer radikalen Prostatektomie oder einer intensiven lokalen Strahlentherapie zugeführt. Bei erkannter Knochenmetastasierung wird im Allgemeinen ein anderer, meist palliativer Therapiezweig gewählt. Wird eine Metastasierung nicht erfasst, so hat der Patient von obengenannten Therapieformen keinen Vorteil, muss aber durch den chirurgischen Eingriff mit einer Vielzahl von Nachteilen rechnen, welche die Lebensqualität stark einschränken, wie z.B. Impotenz und Inkontinenz (4). Zudem wird letztendlich das Überleben von Prostatakarzinompatienten maßgeblich mitbestimmt vom Ausmaß einer Knochenmetastasierung (5).

Da das Knochenszintigramm als Standardmethode der Bildgebung bei Knochenmetastasen außerdem unspezifisch, teuer und auch ungeeignet für die Beurteilung der weiteren Entwicklung von Metastasen ist, besteht größtes Interesse an einem nicht-invasiven, einfachen Nachweis von Knochenmetastasen. Eine solche Möglichkeit stellt die Bestimmung von Knochenmarkern im Serum dar (6;7).

Bisher sind eine Vielzahl von Knochenmarkern untersucht worden und es gibt sehr unterschiedliche Ergebnisse über die diagnostische Validität zur Erkennung von Knochenmetastasen beim PCa (7;8). Die kritische Sichtung der bisher vorliegenden Literatur ergibt, dass meistens jedoch nur eine begrenzte Auswahl von Knochenmarkern untersucht wurde. Die Empfehlungen für die jeweiligen Marker sind damit häufig widersprüchlich und nicht immer nachvollziehbar. Zu einzelnen Markern werde ich im Kapitel „Theoretischer Hintergrund“ Stellung nehmen.

Ende der Neunziger wurde das Glykoprotein Osteoprotegerin (OPG) und seine Schlüsselrolle in der Steuerung der Osteoklastogenese entdeckt (9). Wir entwickelten die Hypothese, dass dieses Protein die Ursache dafür sein könnte, dass die Knochenmetastasen beim PCa im Gegensatz zu anderen Knochenmetastasen (z.B. Mammakarzinom) vor allem osteoblastische Komponenten aufweisen.

Ausgehend von dieser Annahme, und da die Expression von Gewebeproteinen durch Freisetzung derselben oft im Blut reflektiert wird, war es Aufgabe dieser Arbeit, die diagnostische Validität von OPG im Serum als Knochenmarker des Prostatakarzinoms zu evaluieren. Diese Untersuchung sollte ferner gekoppelt werden mit der Bestimmung von Knochenmarkern, wie sie bisher für diese Zwecke eingesetzt bzw. gegenwärtig empfohlen werden. Daraus folgte als Gesamtziel dieser Pilotstudie, einen Überblick zur diagnostischen Validität der aktuell verfügbaren und empfohlenen Marker zur Erkennung von Metastasen beim PCa zu erarbeiten.

2. Theoretischer Hintergrund

2.1 Epidemiologie und Diagnostik des Prostatakarzinoms

Die Inzidenz des PCa hat sich in den letzten 15 Jahren verdreifacht. In Deutschland werden jährlich etwa 48.650, weltweit ca. 680.000 PCAs diagnostiziert (10;11).

Damit ist die Prostata mit 22,3% die häufigste Lokalisation bösartiger Neubildungen beim Mann, gefolgt von Karzinomen der Lunge und des Darms. Bei den zum Tode führenden Krebserkrankungen steht das PCa mit 10,4% an dritter Stelle hinter dem Lungen- und dem Darmkrebs. Die Ursachen des PCa sind weitgehend unbekannt. Möglicherweise spielen das Sexualverhalten, hormonelle Einflüsse sowie ein hoher Fettverzehr oder eine virale Genese eine Rolle. Mit einem mittleren Erkrankungsalter bei knapp über 70 Jahren liegt das PCa vergleichsweise hoch, ca. 2 Jahre höher als bei Neoplasien insgesamt (10).

Aufgrund einer langen symptomatischen Latenz und der dadurch unbemerkten Proliferation und Metastasierung des malignen Prozesses sind die wichtigsten Voraussetzungen für eine Heilung die Diagnosestellung im frühen Krankheitsstadium, die schnelle Einleitung kurativer therapeutischer Maßnahmen und die sofortige Erkennung von Tumorrezidiven in der Nachsorgephase. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt inzwischen bei etwa 80% (10;12-14).

Die Früherkennung des PCa ist von herausragender Bedeutung. Als Vorsorgeuntersuchung wird in Deutschland seit 1971 die digitale rektale Untersuchung (DRU) ab dem 45. Lebensjahr als Leistung der Krankenkassen angeboten. Die Tumorerkennungsraten liegen hier bei etwa 3,2%, der positive prädiktive Wert bei ungefähr 21%. Eine Vielzahl von Tumoren wird also durch diese Methode nicht erkannt (15).

Die zweite Säule der PCa-Diagnostik ist der transrektale Ultraschall (TRUS), mit dem in der Prostata echoarme Bezirke nachgewiesen werden können. Bei dieser Methode liegen die PCa-Entdeckungsraten zwischen 0,64% und 16,2%, die positiven Vorhersagewerte schwanken zwischen 10% und 56% (16;17).

Die dritte und wichtigste Säule in der PCa-Diagnostik ist die Bestimmung des prostataspezifischen Antigens (PSA). Das PSA ist eine Glykoprotein-Serin-Protease mit einem Molekulargewicht von 34.000 Dalton, die von epithelialen Zellen der Prostata gebildet wird. Nachgewiesen wurde das PSA erstmals 1979 von Wang et al. (18) im Prostatagewebe und 1980 von Papsidero et al. (19) im Serum.

Anhand einer PSA-Bestimmung können bereits klinisch stumme PCas entdeckt werden, lange bevor sie durch Palpation oder im Ultraschall auffallen. In PSA-Screeningstudien liegen die PCa-Entdeckungsraten bei etwa 4,6%, der positive prädiktive Wert bei ca. 32% (15). Zusammen mit der DRU kann die PCa-Entdeckungsrate auf ca. 19%, der positive prädiktive Wert auf ca. 50% angehoben werden (20). Die PSA-Bestimmung lässt sich außerdem zur Therapiekontrolle verwenden. Erhöhte PSA-Konzentrationen nach radikaler Prostatektomie weisen auf verbliebenes Karzinomgewebe bzw. ein lokales Rezidiv oder eine Metastasierung hin (21).

2.2 Knochenmetastasen beim Prostatakarzinom

Für Karzinome allgemein ist der Knochen nach Lymphknoten, Lunge und Leber der vierthäufigste Ort einer Metastasierung. Beim PCa steht der Knochen, häufig auch als einziger Ort einer Fernmetastasierung, an erster Stelle. Etwa 13% aller Patienten mit Prostatakarzinom weisen bereits bei Diagnosestellung Knochenmetastasen auf, zum Zeitpunkt des Todes lassen sich sogar bei mehr als 85% der Patienten ossäre Metastasen feststellen (22).

Knochenmetastasen verursachen eine beträchtliche Morbidität, insbesondere durch Schmerzen, funktionelle Einschränkungen, Hyperkalzämie und mögliche epidurale Kompressionen (5). Während sich bei den meisten in das Skelett metastasierenden Krebsformen (Mamma-, Nierenzell-, Schilddrüse-, Bronchialkarzinom) eine überwiegend osteolytische Metastasierung findet, ist für das PCa eine osteoblastische Metastasierung typisch (23).

Die Metastasierung in den Knochen erfolgt beim PCa überwiegend auf hämatogenem Weg, in wenigen Fällen auch durch direkte Infiltration des Primärtumors bzw. einer in Nachbarschaft gelegenen Metastase oder durch lymphogene Streuung (24).

Es gibt jedoch auch Studien, die gezeigt haben, dass Prostata- und auch andere Krebszellen sowohl in vitro als auch in vivo die Fähigkeit besitzen, sich entlang der Oberfläche anatomischer Strukturen wie Nerven und Gefäßen auszubreiten (25;26). Lugassy et al. (27) konnten nachweisen, dass bei diesem Angiotropismus die Zellen dabei entlang der Gefäßaußenfläche wandern, ohne intravaskulär nachweisbar zu sein. Aktuell laufen Studien zur Identifikation von Markern, die dieses metastatische Potential der Prostatakrebszellen vorhersagbar machen und damit die Diagnostik und die Behandlung des PCa stark vereinfachen könnten.

2.2.1 Diagnostik durch bildgebende Verfahren

Bei Verdacht auf eine Knochenmetastasierung dient zur Bildgebung in erster Linie die Knochenszintigraphie. Die Skelettszintigraphie ist ein funktionell bildgebendes Verfahren, welches durch Verabreichung einer mit Technetium-99m markierten osteotropen Phosphonatverbindung den Knochenumbau anhand der Osteoblastenaktivität darstellt (28). Das klassische Knochenszintigramm gilt als Goldstandard, um Patienten auf eine Skelettmastasierung hin zu untersuchen (29;30).

Neben der Sensitivität und Spezifität hängt der klinische Stellenwert der Skelettszintigraphie auch von der Wahrscheinlichkeit ossärer Metastasen im jeweiligen Krankengut ab. Der positiv prädiktive Wert eines pathologischen Skelettszintigramms nimmt mit steigender Prävalenz zu. Umgekehrt ist der negative prädiktive Wert bei normalem Szintigramm und niedriger Prävalenz außerordentlich hoch (30;31).

Nachteile der Szintigraphie sind die relativ hohen Kosten und eine nur mäßige Aussagekraft bei einer Mikrometastasierung (31;32). Eine weitere Schwachstelle des Szintigramms ist das „flare phenomenon“, das definiert ist über einen Anstieg der Zahl oder der Intensität der Knochenmetastasen im Szintigramm während der ersten sechs Monate einer Chemotherapie. Wie man mittlerweile weiß, ist dieses Phänomen – beobachtet v. a. bei Brust- und Prostatakarzinom – Zeichen einer Heilungsreaktion, nach spätestens einem halben Jahr ist eine Rückbildung der Läsionen zu sehen (33).

Die konventionelle Röntgenuntersuchung kann behilflich sein, wenn es darum geht, Knochenmetastasen näher zu charakterisieren. In der Frühphase einer Metastasierung mit noch niedrigem Mineralisierungsgrad der Knochenmatrix v. a. bei osteolytischen Metastasen versagt sie jedoch. Die Skelettszintigraphie kann hier bis zu 18 Monate früher Metastasen anzeigen (34;35).

Die Computertomographie (CT) bietet anhand von hochqualifizierten Bildern eine dreidimensionale Information. Dargestellt wird ein begrenzter Körperabschnitt, weshalb das CT sich nicht zum Screening eignet. Die Dichte-Diskrimination ist der des konventionellen Röntgens bei weitem überlegen. Wenn Knochenmark durch Tumor ersetzt wird, lässt sich dort eine höhere Absorption der Röntgenstrahlung im Kontrast zum betroffenen Mark beobachten. Das CT ermöglicht die frühzeitige Identifizierung von Knochenmetastasen, insbesondere von axialen Läsionen, und gleichzeitig die Beurteilung von Metastasen außerhalb des Knochens. Gelegentlich kann es der Therapiekontrolle dienen, allerdings sind hierfür repräsentative,

möglichst spinale Läsionen zum optimalen Vergleich im Verlauf zu wählen (32).

Neuere Untersuchungen sehen auch in der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) eine gute Methode, Knochenmetastasen beim PCa zu erkennen. Eine endgültige Bewertung ist bisher aber nicht möglich (36).

Auch die Magnetresonanztomographie (MRT) ist sehr gut geeignet, um Knochenmetastasen zu diagnostizieren. Im Gegensatz zum CT erlaubt das MRT in sagittalen Schnitten große Abschnitte des Skeletts zu begutachten. Da der Knochen in einer T1-gewichteten Sequenzierung eine signalarme, Knochenmarksfett hingegen eine signalreiche Intensität aufweist, spiegeln Knochenmetastasen, die ein reduziertes Signal produzieren, den Ersatz des Markfettes empfindlich wider. Wie das CT ermöglicht das MRT so das Erkennen einer sehr frühen Metastasierung (32). Wie sich in einer Studie zeigte, weist die MRT im Vergleich zur Szintigraphie bei PSA-Serumkonzentrationen $<20\mu\text{g/l}$ eine bessere Sensitivität auf (37).

MRT sowie CT sind hilfreich, um im Szintigramm gefundene verdächtige Herde, die radiographisch nicht erklärt werden können, zu evaluieren. Beide Verfahren können so eine Entscheidungshilfe sein, falls eine Biopsie, eine palliative Operation oder eine Radiotherapie in Betracht gezogen wird. Bei Durchführung einer Nadelbiopsie kann das CT außerdem dem „Monitoring“ dienen (32;34;35;38).

2.2.2 Physiologie und Pathologie des Knochenstoffwechsels

Knochengewebe stellt eine hoch spezialisierte Form von Bindegewebe dar, das durch trajektorielle Bauweise eine ausgeprägte Rigidität mit einem hohen Grad an Elastizität vereint. Es bildet die strukturelle Grundlage für die Fortbewegung von Vertebraten sowie den Schutz vitaler Organe und ist das größte Reservoir an Kalzium und Phosphat.

Das menschliche Skelett wird aufgrund periodischer, kontinuierlicher Umbauprozesse etwa alle 10 Jahre komplett erneuert. Dieser ständige Wandel, das sogenannte „remodeling“, erfolgt durch Resorption von altem Knochen und Ersatz durch neuen an derselben Stelle. Die Knochenhomöostase wird gewährleistet durch die streng gekoppelte, koordinierte Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten, sodass der Nettoeffekt von Resorption und Formation stetig null bleibt (39;40). Wenngleich die Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind, herrscht Einstimmigkeit darüber, dass viele Knochenkrankheiten unmittelbar mit einer Kommunikationsstörung zwischen Osteoblasten und Osteoklasten zusammenhängen (41).

Obwohl beim ossär metastasierten PCa der verstärkte Knochenaufbau (osteoblastische Metastasen) eindeutig überwiegt, weist der vermehrte Nachweis von biochemischen Markern der Knochenresorption darauf hin, dass die Osteolyse auch hier eine wichtige Rolle spielt (6;23;42).

Eine klassische Theorie, die nach wie vor ihre Gültigkeit hat, besagt, dass jede primäre Läsion oder Metastase im Knochen mit einer Osteolyse beginnt (43). In einer Studie, in der PCa-Patienten mit Dichlormethylen-Biphosphonat – einem spezifischen Osteoklastenhemmer – vorbehandelt worden waren, zeigte sich, dass daraufhin sowohl osteoklastische als auch osteoblastische Reaktionen unterdrückt wurden. Es wird angenommen, dass die Osteolyse Raum, Nährstoffe und Calcium für die nachfolgende osteoblastische Reaktion zur Verfügung stellt (44). In Abbildung 1 ist dieser Vorgang vereinfacht dargestellt.

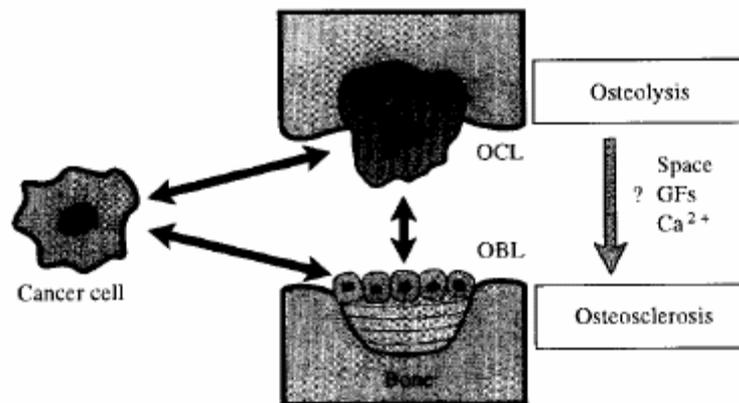


Abb.1: Zusammenhang von osteoklastischer Osteolyse und osteoblastischer Osteosklerose in Knochenmetastasen bei PCa-Patienten. Die Osteolyse bietet Raum, Nährstoffe, Calcium und knochenspezifische Wachstumsfaktoren, die essentiell sind für das Wachstum und die Differenzierung der Osteoblasten und fördert so die Osteosklerose. (Aus: Yoneda T, "Cellular and molecular mechanisms of breast and prostate cancer metastasis to bone." Eur J Cancer 1998;34:240-5.)

Osteoklasten und Osteoblasten stammen von Vorläuferzellen im Knochenmark ab. Für die Osteoblasten sind dies multipotente mesenchymale Stammzellen. Die Vorläuferzellen der Osteoklasten gehören zu den hämatopoetischen Stammzellen der Makrophagen- und Monozytengruppe (45).

Entscheidenden Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen osteoblastischer und osteoklastischer Aktivität hat die Osteoklastogenese. Bipotente Vorläuferzellen können sich entweder zu Osteoklasten oder zu Monozyten-Makrophagen ausbilden. Unter der Kontrolle von Wachstumsfaktoren, Zytokinen (z.B. M-CSF, IL -1, -6, -11, TNF etc. siehe Abb. 2), Peptiden, Steroidhormonen sowie durch sequentielle Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren (c-src, c-fos) kommt es zum „Commitment“, dem Verlust der Pluripotenz und zur Bildung von Osteoklastenvorläuferstufen, die sukzessiv durch Differenzierung, Fusionierung und Aktivierung zu voll funktionsfähigen, multinukleären Osteoklasten ausreifen (45;46). Eine Übersicht über diesen Reifungsweg stellt die Abbildung 2 dar.

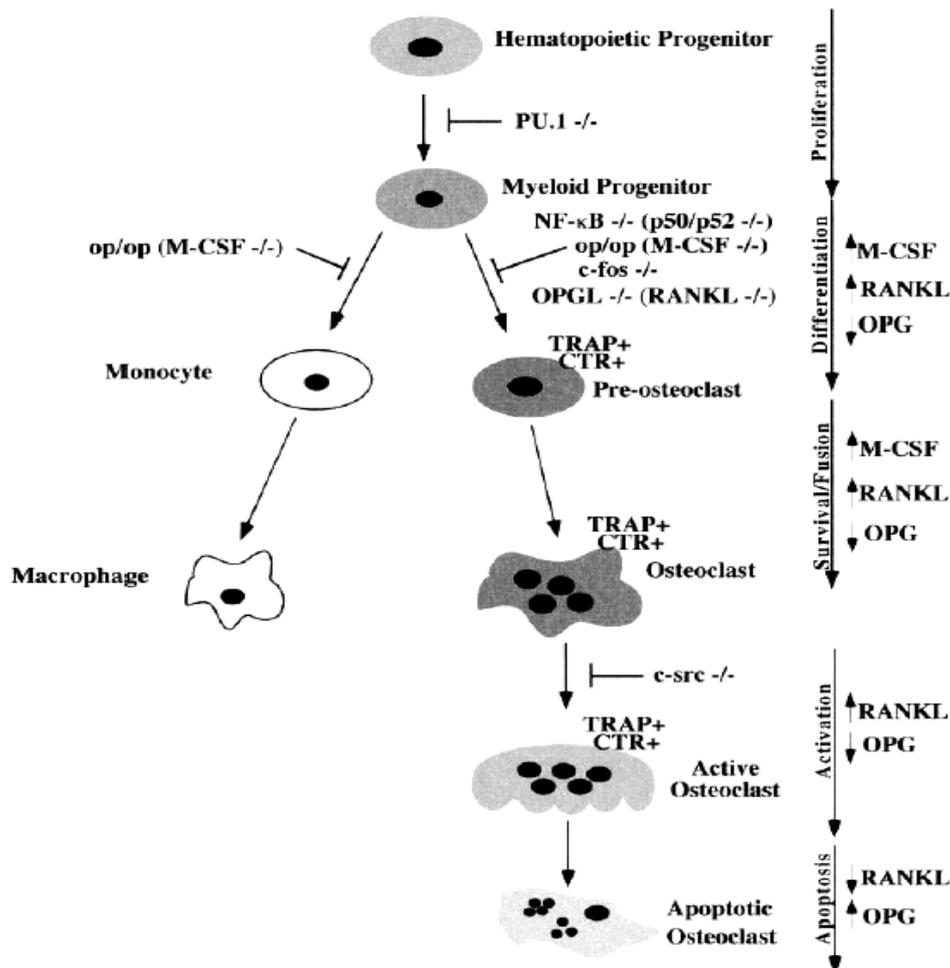


Abb. 2: Schema der Osteoklastenzelllinie und ihre Beziehung zur Monozyten-Makrophagen-Zelllinie. Innerhalb der Linie sind die Übergangspunkte markiert, an denen bestimmte Moleküle eingreifen (+/↑ aktivierend, -/↓ hemmend): PU.1 (Transkriptionsfaktor); CTR = „Calcitonin-Rezeptor“; TRAP = „Tartrat-resistente saure Phosphatase“; M-CSF = „Macrophage-colony stimulating factor“; c-src / c-fos (= Proto-Onkogene); NF-κB = „Nuclear factor of kappa B“; OPG-L = „Osteoprotegerin-Ligand“ = RANK-L = „Receptor activator of nuclear factor kappa B-ligand“. Zunächst proliferiert die hämatopoetische Stammzelle zur bipotenten Vorläuferzelle. Die Differenzierung erfolgt dann unter hemmendem Einfluß von NF-κB, c-fos, M-CSF, OPG-L/RANK-L und aktivierendem Einfluß von TRAP und CTR weiter zur unipotenten Osteoklastenvorläuferzelle. Im nächsten Schritt finden Fusion und Aktivierung des Osteoklasten statt. Insbesondere sind die hemmende und aktivierende Wirkung von OPG, RANK-L und M-CSF in den jeweiligen Stadien seitlich vermerkt. (Aus: Aubin JE, Bonnellye E., „Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption“. *Osteoporos Int.* 2000;11:905-13)

Diese Umgebungsregulation spielt eine herausragende Rolle für die Reifung der Osteoklasten, unter anderem schafft sie eine unfruchtbare Umgebung für Tumorzellen und ihre Proliferation (47;48).

Die postmitotischen Vorläufer fusionieren also und sind somit aktiviert, um Knochen zu resorbieren. Sie sezernieren dabei Proteasen und Säuren in den Zwischenraum von Zellmembranen und Knochenmatrix. Die Säure löst Hydroxyapatit und die Proteasen zerstören organische Bestandteile. Die Matrixabbauprodukte werden über Endozytose vom Osteoklasten in Vesikel eingeschlossen und durch den Osteoklasten transportiert (49).

Einer inadäquat hohen Knochenresorption aufgrund einer gesteigerten Osteoklastenaktivität wird eine zentrale Bedeutung bei der Mehrzahl metabolischer Knochenerkrankungen (verschiedene Osteoporoseformen, Knochenmetastasen, Morbus Paget, rheumatoide Arthritis, Peridontitis usw.) zugeschrieben. Die Hemmung dieses Prozesses ist ein effektives und klinisch relevantes Therapieprinzip (50;51).

Serummarker des Knochenmetabolismus bieten die Möglichkeit, mehr oder weniger spezifisch/ sensitiv pathologische Prozesse im Knochen anzuzeigen. Im Folgenden werden die in dieser Studie untersuchten Parameter in ihrer (Patho-) Physiologie dargestellt.

2.2.3 Serummarker des Knochenstoffwechsels

Verschiedene metabolische Knochenmarker wurden in den letzten Jahren daraufhin untersucht, ob sie sich als Indikatoren für eine Knochenmetastasierung eignen. Im Allgemeinen wird hier zwischen Markern der Knochenneubildung/ -formation, Markern der Knochenresorption und Markern der zellulären Rekrutierung unterschieden.

In dieser Studie werden als Knochenaufbauparameter die alkalische Phosphatase (AP) und die knochenspezifische alkalische Phosphatase (Ostase), als Knochenabbauparameter die tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) und das N- (oder amino-) terminale Telopeptid des Typ I Kollagens (NTx), als Marker der zellulären Rekrutierung der Osteoklastogeneseparameter Osteoprotegerin (OPG) untersucht.

2.2.4 Marker des Knochenaufbaus

2.2.4.1 Alkalische Phosphatase (AP)

Die alkalische Phosphatase (AP) ist in der Routinediagnostik eines der am häufigsten bestimmten Enzyme. Sie wird durch eine typische Aktivitätsbestimmung über die kontinuierliche Registrierung eines beim Substratabbau entstehenden Farbstoffes

(p-Nitrophenol) gemessen. Die AP kommt im menschlichen Organismus in drei Formen vor. Für die Kodierung dieser drei Formen sind drei Gene verantwortlich, je ein Gen für die Plazenta- und die Dünndarm-AP und ein weiteres für die AP aus Leber/ Knochen/ Niere. Obwohl die genetische Kodierung dieser Formen also nicht ausschließlich organbezogen ist, werden organtypische Isoenzymmuster beobachtet (52).

Im Serum von gesunden Probanden werden vor allem AP aus Leber, Knochen sowie Dünndarm bestimmt, die sich durch ihre besonderen Eigenschaften gegenüber Inhibitoren und Hitze differenzieren lassen. Erhöhte AP-Aktivitäten im Serum treten bei Verschlussikterus und Leberschäden unterschiedlichster Genese sowie bei Knochenerkrankungen, besonders mit osteoblastischer Komponente, auf. In der hier beschriebenen Studie wird mit der Bezeichnung AP die Gesamt-Aktivität der alkalischen Phosphatase ohne Differenzierung der Isoformen verstanden.

Es konnte gezeigt werden, dass sich die Gesamt-AP sowohl als sensitiver Marker zur Diagnostik von Knochenmetastasen beim PCa als auch als unabhängiger prognostischer Faktor für das Überleben dieser Patienten eignet (42;53).

2.2.4.2 Knochenspezifische alkalische Phosphatase (Ostase)

Die knochenspezifische Form der alkalischen Phosphatase wird fast ausschließlich in den Osteoblasten gebildet. Sie wird entsprechend der Bezeichnung des Testes zur Bestimmung auch als Ostase bezeichnet. Diese Bezeichnung werde ich auch in meinen Ausführungen verwenden.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass die knochenspezifische alkalische Phosphatase ein geeigneter Marker ist, um eine frühe Metastasierung im Knochen anzuzeigen. Sie weist eine hervorragende Korrelation mit der „EOD“ (extent of disease) auf und kann insbesondere den Grad der Metastasierung sehr gut einschätzen (54;55). In der Vergangenheit wurde auf diesen Marker bereits großes Augenmerk in der Verlaufsbeurteilung des metastasierten PCas gelegt (53;56).

2.2.5 Marker des Knochenabbaus

2.2.5.1 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)

Bei den Abbauprozessen durch die Osteoklasten hat die tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) eine entscheidende Bedeutung. Osteoklasten endozytieren Knochenmatrixabbauprodukte aus der darunterliegenden Knochenlagune zu Vesikeln und transportieren diese durch die Zelle, um sie anschließend durch eine Sekretionsdomäne in die basolaterale Membran zu sezernieren. Alle bisherigen Daten deuten darauf hin, dass zu diesen Vesikeln TRAP enthaltende Vesikel fusionieren. Dort besteht die Funktion der TRAP darin, reaktive Sauerstoffradikale zu produzieren, die wiederum die Knochenabbauprodukte weiter zerstören (57).

Mit der im Folgenden in dieser Arbeit erwähnten TRAP ist durchgehend die aus dem Knochen stammende Isoform, die TRAP 5b, gemeint.

Die TRAP 5 erhielt ihren Namen ursprünglich aufgrund ihrer schnellen elektrophoretischen Bewegung, erst später wurde sie von Lam et al. (58;59) im Serum entdeckt und konnte in ihre Isoformen differenziert werden. Stepan et al. (60) erhielten zwei verschiedene Gipfel bei einer Kationen-Austausch-Elektrophorese und benannten diesbezüglich die TRAP in 5a und 5b. Ähnliche Beobachtungen wurden später auch von Janckila et al. (61) gemacht. Kürzlich fand man jedoch heraus, dass sich die Enzyme betreffend ihrer Struktur nur im „Redox-State“ ihres binuklearen Eisenzentrums unterscheiden (62). Diese 5a und 5b sind folglich nicht identisch mit den von Lam beschriebenen Isoformen 5a und 5b. Mittlerweile konnten beide Formen in vor allem vier Kriterien näher charakterisiert werden:

- 1.) Die 5a ist ein ungespaltenes Polypeptid, die 5b ein proteolytisch gespaltenes disulfidgekoppeltes Heterodimer von 32 kD mit einem hochmannosehaltigen Karboanhydratanteil.
- 2.) Die TRAP 5a enthält Sialinsäure, die TRAP 5b nicht.
- 3.) Das pH-Optimum der 5a liegt bei etwa 5,2, das der TRAP 5b bei etwa 5,8.
- 4.) Die spezifische Enzymaktivität der 5a liegt deutlich niedriger als die der 5b.

In diversen Studien konnte anhand dieser Eigenschaften bezüglich ihrer Abstammung die TRAP 5b eindeutig den Osteoklasten, die 5a mit hoher Wahrscheinlichkeit den dendritischen Zellen und den Makrophagen zugeordnet werden. Beide Formen zirkulieren im Serum in einer Art Komplex, der unter anderem Calcium enthält (63-66).

Scheven et al. (67) konnten außerdem zeigen, dass die Freisetzung von Kollagenfragmenten im Knochen signifikant mit der Sekretion der TRAP der Osteoklasten während der Knochenresorption korreliert. Diese Erkenntnis und die eindeutige Zuordnung der TRAP 5b zu den Osteoklasten macht die TRAP zu einem potenziell überaus nützlichen Marker der Knochenresorption.

In der Vergangenheit bestanden verschiedene Probleme, ein spezifisches und sensitives Messverfahren für die TRAP zu etablieren. Grund dafür waren die die Messung beeinflussenden, ebenfalls im Serum vorliegenden verschiedenen Formen der TRAP: inaktivierte und fragmentierte TRAP wie oben beschrieben, die TRAP der Erythrozyten und der Leukozyten, sowie die beiden beschriebenen Isoformen 5a und 5b. Ein Immunoassay mit einem polyklonalen Antiserum erbrachte zunächst nicht den gewünschten Erfolg, da er nicht zwischen den verschiedenen Formen differenzieren konnte, und zusätzlich Bilirubin die spektrofotometrische Erkennung des Endprodukts störte. 2000 gelang es Halleen et al. (68) einen "Two-site-assay" mit einem Antikörper (O1A), der bereits früher entwickelt worden war, herzustellen. Dieser Assay erfasst spezifisch die TRAP 5b. Dabei fiel auf, dass die detektierte Menge nur etwa ein Zehntel der im herkömmlichen Test gemessenen Menge betrug. Dies legt nahe, dass alle anderen Formen der TRAP ca. 90% der Gesamt-TRAP ausmachen (69).

In den letzten Jahren wurde anhand verschiedenster Knochenerkrankungen nachgewiesen, dass die TRAP 5b im Serum die Knochenresorptionsrate widerspiegelt und somit als Knochenresorptionsparameter gelten kann (56;70).

2.2.5.2 N-Telopeptid des Typ I Kollagens (NTx)

NTx ist als aminoterminales Telopeptid ein Abbauprodukt des Typ I Kollagens. Dieses Kollagen stellt den Hauptanteil der organischen Matrix dar. NTx zeigt den physiologischen, über Cathepsin K vermittelten Abbauweg der Knochensubstanz an. Cathepsin K ist eine Cysteinprotease, die ausgeprägte degradative Aktivität gegen die Extrazellulärmatrix aufzeigt und in die osteoklastenvermittelte Knochendestruktion involviert ist (71).

Die NTx-Konzentration im Serum korreliert mit der Knochenresorptionsrate und wird daher

auch als Serummarker für den Knochenabbau empfohlen. Erhöhte Serumkonzentrationen von NTx in PCa-Patienten wurden bereits häufig beschrieben (6;42;71-73).

Häufiger als im Serum wird NTx im Urin bestimmt, da der ursprüngliche Test für Urin entwickelt wurde. Untersuchungen im Urin haben wir bei der Festlegung unserer Parameter von vornherein ausgeschlossen, da neben den analytischen Unsicherheiten (Instabilität der zu untersuchenden Analyte im Urin) auch erhebliche Variationen durch unzuverlässige Harnsammlungen problematisch sind (74;75).

2.2.6 Marker der Ostoklastogenese

2.2.6.1 Osteoprotegerin (OPG), RANK und RANKL

1997 wurden von Simonet et al. (9) Proteine identifiziert, die bei der Steuerung der Osteoklastogenese von Bedeutung sind und in die Tumornekrosefaktor (TNF)- Rezeptorgruppe eingeordnet werden.

Dazu gehören das membrangebundene RANK („Receptor activator of NF- κ B“ oder ODAR), sein Ligand RANKL („Receptor activator of NF- κ B-Ligand“, auch OPG-L, ODF oder TRANCE) und OPG (Osteoprotegerin, auch OCIF oder TR1) (39). Nach einer revidierten Nomenklatur sollen künftig die Bezeichnungen OPG, RANK und RANKL verwendet werden (American Society for Bone and Mineral Research President’s Committee on Nomenclature).

OPG, RANK und RANKL sind drei Schlüssel-moleküle, die die Osteoklasten-Rekrutierung und -Funktion regulieren. Dieses System wird gesteuert über verschiedene Hormone (Glukokortikoide, Vitamin D, Östrogene), Zytokine (TNF α , IL-1, -4, -6, -11 und -17) und mesenchymale Transkriptionsfaktoren (cbfa-1, fibroblast growth factor-2, indian hedgehog etc.) (76).

In Abbildung 3 ist der Zusammenhang zwischen diesen Molekülen dargestellt. RANKL wird auf der Oberfläche von präosteoblastischen und stromalen Zellen exprimiert und kann durch osteotrope Faktoren wie z.B. PTH, IL-11 und 25(OH)2D3 hochreguliert werden. RANK, der auf Osteoklastenvorläuferzellen exprimiert wird, erkennt RANKL durch Zell-zu-Zell-Kontakt. Diese Interaktion bewirkt in Gegenwart von M-CSF die Stimulation von NF- κ B und damit die Differenzierung der Osteoklastenvorläufer. RANKL ist darüber hinaus involviert in das Überleben und die Fusion der Vorläufer und die Aktivierung reifer Osteoklasten (77;78).

OPG ist ein löslicher Rezeptor für RANKL. Es wird produziert und sezerniert von Osteoblasten und stromalen Zellen und fungiert durch Bindung an seinen Liganden als ein „Störrezeptor“ (Köderrezeptor) im RANK-RANKL-Signalsystem.

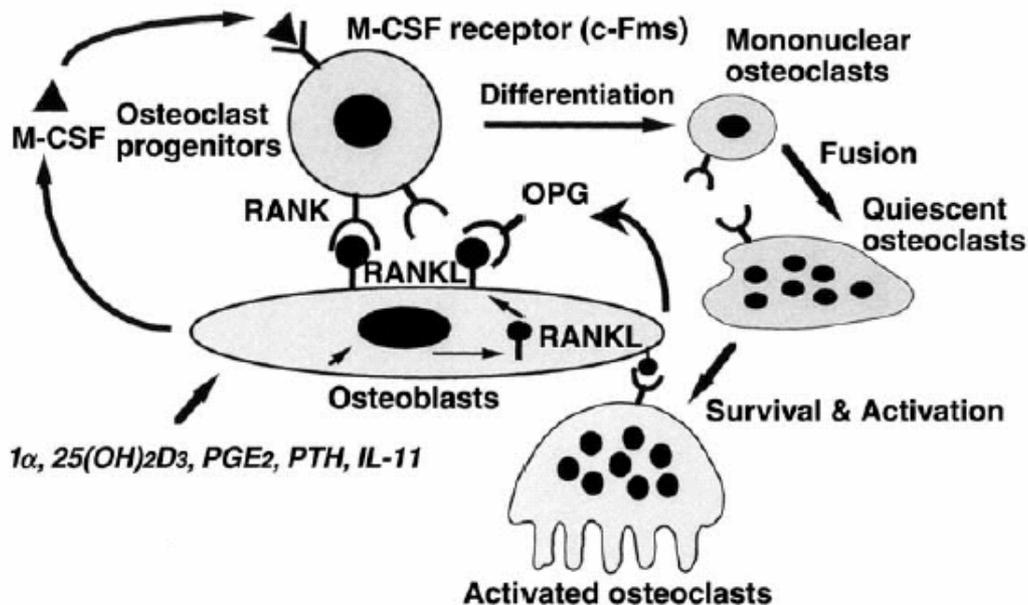


Abb.3: Regulation des OPG/RANK/RANKL-Systems. Die RANK-RANKL-Interaktion bewirkt über M-CSF die Aktivierung der Osteoklastendifferenzierung. OPG konkurriert mit dem an Osteoblasten gebundenen RANKL-Liganden um die Bindung an den von Osteoklasten exprimierten RANK-Rezeptor. Die RANKL-Expression kann durch 1α , $25(\text{OH})_2\text{D}_3$, PGE_2 , PTH und IL-11 hochreguliert werden. (Aus: Nobuyuki Udagawa, „Mechanisms involved in bone resorption.“ *Biogerontology* 2002;3:79-83)

Dadurch wirkt OPG indirekt hemmend auf die Osteoklastenaktivität und –reifung und kann daher als ein „Knochenabbauhemmer“ angesehen werden (79).

Das Verhältnis RANKL zu OPG, die sog. RANKL/OPG-Ratio vor Ort entscheidet somit über das Gleichgewicht bei der Knochenresorption. Das Glukokortikoid Dexamethason etwa hemmt die OPG-Expression um annähernd 90% und führt gleichzeitig zu einer Steigerung der RANKL-Expression um das Zwei – bis Vierfache (80). Der in der Folge gesteigerte RANKL-OPG-Quotient ist mit einer erhöhten Osteoklastogenese assoziiert. Umgekehrt verhält es sich beispielsweise unter dem Einfluss der proinflammatorischen Zytokine $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF-}\alpha$. Die Abnahme des RANKL-OPG-Quotienten geht hier mit dem Verlust einher, die Differenzierung der Osteoklasten zu induzieren. Diese Daten belegen, dass der RANKL-OPG-Quotient positiv

mit der Resorptionsfunktion der Osteoklasten und negativ mit der Knochenmasse korreliert (81).

Die zentrale Bedeutung von OPG, RANK und RANKL für die Osteoklastenzellbiologie und den Knochenstoffwechsel wurde inzwischen durch die Charakterisierung von transgenen und Knock-out-Mäusen sowie durch Applikation der einzelnen Komponenten dieses Zytokin-Systems eindrucksvoll belegt. Die transgene Überexpression führt ebenso wie die parenterale Gabe von OPG zu einer Osteopetrose, deren zellbiologisches Korrelat das komplette Fehlen funktionsfähiger Osteoklasten ist. Eine Therapie mit OPG in Form parenteraler Injektionen des rekombinanten Proteins oder eines adenoviralen Expressionsvektors konnte erfolgreich zur Prävention des Knochenverlusts nach Ovariectomie eingesetzt werden (9;82). Das Fehlen von OPG hingegen ist, wie mehrere Analysen von OPG-Mäusen belegen, durch eine schwere juvenile Form der Osteoporose infolge einer massiv erhöhten Zahl und Aktivität von Osteoklasten sowie einer Kalzifizierung großer Arterien charakterisiert (9;83;84). Diese Untersuchungen haben gezeigt, dass die Knochenmasse positiv mit der skeletalen Konzentration von OPG korreliert.

Das OPG-Gen, lokalisiert auf Chromosom 8q23-24, kodiert für ein sezerniertes basisches Glykoprotein, das entweder in monomerer (60 kDa) oder - nach Ausbildung einer Disulfidbrücke - in homodimerer Form (120 kDa) vorliegen kann. Das Signalpeptid besteht aus 21 Aminosäuren und insgesamt 7 strukturellen Domänen. Es besitzt an seinem N-terminalen Ende vier cysteinreiche TNF-Rezeptor-Moleküle, die für die Hemmung verschiedener Osteoklastenfunktionen verantwortlich sind. Das C-terminale Ende, bzw. Domäne 7, enthält neben einer Heparin-bindenden Domäne auch eine Cysteinverbindung, welche durch eine Disulfidbrücke eine Dimerisierung ermöglicht (85;86). OPG besitzt keine transmembranen Strukturdomänen und ist deshalb anders als RANK und RANKL ein lösliches Protein, das vor allem im extrazellulären Raum agiert (87).

Die Abbildung 4 zeigt die Signalpeptidstruktur von OPG.

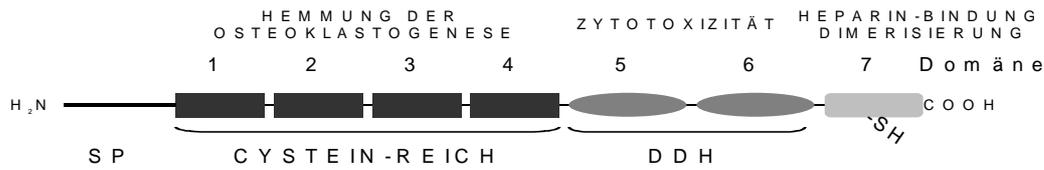


Abb.4: Struktur und Funktion von Osteoprotegerin (OPG). OPG-Domänen und ihre biochemischen und funktionellen Eigenschaften. NH₂, Aminoterminus; COOH, Carboxyterminus, SP, Signaleptid; DDH, Death domain homologous-Region, SH, Sulfhydrylgruppe von Cystein (Aus: Yamaguchi K. „Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor“ J Biol Chem 1998; 273, 5117-23).

Interessanterweise ist das menschliche Gen für OPG in unmittelbarer Nähe des Gens für die familiäre Osteochondromatose, einer Erkrankung gekennzeichnet durch das Auftreten multilokulärer Exostosen, und des Gens für den Wachstumsfaktor „BMP“ (bone morphogenetic protein) lokalisiert (9;88).

Zu den Geweben starker OPG-Expression gehören neben dem Knochen der Zahnhalteapparat, die Wand großer Arterien, die Brust- und die Schilddrüse (89;90;90;91). Außerdem spielen OPG, RANK und RANKL eine wichtige Rolle bei der Organogenese des Immunsystems, der Antigenpräsentation und der zellulären Immunantwort (92;93).

Nachfolgende Tabelle zeigt eine kurze Übersicht.

Tab.1: Metabolische Knochenerkrankungen mit Beteiligung des OPG/ RANK/ RANKL-Systems.

• Osteoporoseformen (postmenopausal, Glukokortikoidinduziert, Posttransplantation, Immobilisation)
• Hyperparathyreoidismus
• Morbus Paget
• Rheumatoise Arthritis
• Ostetrophe Tumoren/ Metastasen (Riesenzelltumor, Plasmozytom, Metastasiertes Mamma- und Prostatakarzinom, Neuroblastom, Osteosarkom)
• Peridontitis
• Familiäre expansive Osteolyse

Als ich meine ersten OPG-Bestimmungen an PCa-Patienten durchführte, war OPG bereits in eben diesen Patienten überexprimiert vorgefunden worden (94;95). Diese Überexpression könnte indirekt eine osteoblastische Reaktion durch Hemmung der Osteoklastogenese hervorrufen und somit die typischen Läsionen in PCa-Patienten erklären.

3. Material und Methoden

3.1 Probanden

Die in die Studie aufgenommenen Probanden wurden ausschließlich aus dem Patientenkollektiv der Klinik und Poliklinik für Urologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Charité Mitte (Direktor Prof. Dr. S. A. Loening) rekrutiert. In die Kontrollgruppe wurden zwei Angehörige des medizinischen Personals der Charité mit eingeschlossen. Die Probanden verteilten sich auf folgende Gruppen:

36 gesunde Männer

35 BPH-Patienten

44 PCa-Patienten ohne Metastasen (pN0/N0 M0)

34 PCa-Patienten mit Lymphknotenmetastasen ohne Knochenmetastasen (pN1/N1 M0)

17 PCa-Patienten mit Knochenmetastasen (M1 ossär)

Klinische und paraklinische Daten zu den einzelnen Patienten wurden anhand der Epikrisen in einem selbstentwickelten Datenbogen erfasst. Darunter fielen das Alter des Patienten, die aktuelle und die allgemeine Anamnese, Daten zur Diagnosestellung (Zeitpunkt, digitale rektale Untersuchung, Sonographie, Histologie von Lymphknoten und Prostata, Befunde bildgebender Verfahren), der Behandlungsbeginn und die Therapieform, das Staging mittels der TNM-Klassifikation und das Grading. Außerdem beinhaltete die Tabelle Laborwerte (Kreatinin, Alaninaminotransferase, Aspartataminotransferase, Gammaglutamyltransferase) und Informationen zu eventuellen anderen Erkrankungen, um deren Einfluß auf die untersuchten Knochenmarker berücksichtigen zu können. Patienten mit akut entzündlichem Geschehen, Zweitumoren sowie Leber- und Nierenerkrankungen wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

3.1.1 Kontrollen

Die männliche Kontrollgruppe bestand aus 36 gesunden Männern, wobei die Altersspannweite 23 bis 77 Jahre betrug und der Altersmedian bei 50 Jahren lag. Die Gruppe setzte sich aus gesunden Männern und Patienten mit Steinerkrankungen der ableitenden Harnwege, erektiler Dysfunktion, Phimosen oder Varikozelen zusammen.

Der mittlere PSA-Wert betrug 2,1µg/l (Bereich von 0,4 bis 3,4µg/l).

3.1.2 Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH)

Die Diagnose wurde bei den Patienten dieser Gruppe anamnestisch, durch digitale rektale Untersuchung, Ultraschall und anhand des PSA-Wertes gestellt und durch histologische Untersuchung des Biopsiematerials (Sextanten- bzw. Oktantenbiopsie) bzw. des durch transurethrale Resektion der Prostata gewonnenen Gewebes bestätigt. Die Patienten unterlagen keiner medikamentösen Vorbehandlung. Der Altersmedian der Gruppe betrug 68 Jahre (Bereich 56 – 83 Jahre). Der mediane PSA-Wert betrug 4,6µg/l (untere und obere Quartile: 1,7 und 11,6µg/l).

3.1.3 Patienten mit Prostatakarzinom ohne Metastasen (PCa pN0/N0 M0)

Das Kollektiv umfasste 44 Patienten mit einem Altersmedian von 64 Jahren bei einer Altersspannweite von 54 bis 77 Jahren. Die Diagnose Adenokarzinom erfolgte durch histologische Begutachtung des nach Sextanten- bzw. Oktantenbiopsie gewonnenen Gewebematerials. Für die Einordnung in das TNM-System wurden, falls bei den Patienten eine Prostatektomie erfolgte, auch die histologischen Daten (WHO-Grad) und die makroskopischen Daten (pT-Stadium) herangezogen. Angaben zur Tumorausbreitung und -differenzierung erfolgten entsprechend der TNM-Klassifikation.

Pathologisch wurde 8 x die Diagnose pT2 und 11 x die Diagnose pT3 gesichert, klinisch fanden sich 2 x das Stadium T1, 14 x das Stadium T2 und 5 x das Stadium T3. Da nicht von allen Patienten die histologische Differenzierung des Tumors nach Gleason vorlag, erfolgte die Einordnung nach G-Stadien: 3 x G1, 27 x G2 und 14 x G3. In keinem Fall zeigte die pelvine Lymphadenektomie Lymphknotenmetastasen. Eine Knochenmetastasierung wurde durch

Skelettszintigraphie ausgeschlossen. In speziellen Fällen wurde dies durch konventionelle Röntgendiagnostik sowie durch MRT- und CT-Untersuchungen bestätigt.

Die in diese Gruppe aufgenommenen Patienten wurden nicht antihormonell vorbehandelt. Der PSA-Median-Wert betrug $8,6\mu\text{g/l}$ (untere und obere Quartile: $4,9$ und $12,8\mu\text{g/l}$).

3.1.4 Patienten mit Prostatakarzinom und Lymphknotenmetastasen ohne Knochenmetastasen (PCa pN1/N1 M0)

Diese Gruppe bestand aus 34 Prostatakarzinompatienten. Der Altersmedian der Patienten lag bei 68, die Spannweite betrug 38 bis 77 Jahre. Bei allen Patienten wurde der Lymphknotenbefall histopathologisch durch eine Lymphadenektomie diagnostiziert. Das Vorliegen von Fernmetastasen wurde, wie oben beschrieben, ausgeschlossen.

Die klinische und pathologische Einteilung ergab die Stadien pT3 (1x) bzw. T1 (1x), T2 (10x) und T3 (22x). Der Tumordifferenzierungsgrad variierte zwischen G1 (1x), G2 (21x) und G3 (11x). 12 der 34 Probanden waren zum Zeitpunkt der Blutabnahme antihormonell vorbehandelt. Die Behandlungszeit vor der Blutentnahme betrug im Median 1,7 Monate (Spanne 0,5 - 2,8 Monate). Der PSA-Median-Wert betrug $19,4\mu\text{g/l}$ (untere und obere Quartile: $9,8$ und $34,2\mu\text{g/l}$).

3.1.5 Patienten mit Prostatakarzinom mit Knochenmetastasen (PCa M1)

Die Gruppe umfasste 17 Männer mit gesichertem Prostatakarzinom, bei denen mittels der oben angeführten Verfahren eine Fernmetastasierung nachgewiesen werden konnte.

Dabei wiesen 13 Patienten eine reine Knochenmetastasierung auf, weitere 4 Patienten zusätzlich pulmonale Metastasen. Zum Zeitpunkt der Blutabnahme waren 3 Patienten unbehandelt, 2 Patienten wurden radiotherapeutisch behandelt, 12 Patienten erhielten eine Hormontherapie (Orchiektomie, LH-RH-Analoga und/ oder Antiandrogene) entweder primär (n=6) oder bei Metastasierung nach Radiotherapie oder radikaler Prostatatektomie (n=6). Bei einer Spannweite von 47 bis 83 Jahren lag der Altersmedian der Patienten bei 64 Jahren. Der PSA-Median-Wert betrug $49,1\mu\text{g/l}$ (untere und obere Quartile: $10,2$ und $1185\mu\text{g/l}$).

3.2 Probenmaterial

Die Analysen erfolgten an insgesamt 166 Serumproben von den Probanden der oben beschriebenen Personengruppen.

Die Probenentnahmen erfolgten mit dem Monovettensystem 04.1904 der Fa. Sarstedt, Nümbrecht. Die Blutproben wurden innerhalb von 2 Stunden nach der Venenpunktion für 15 min bei 4°C mit 1600g zentrifugiert, der Überstand anschließend in Reaktionsgefäße der Fa. Eppendorf abpipettiert und bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt. Keine der Proben wurde bis dahin zwischenzeitlich für andere Zwecke aufgetaut, sodass eine evtl. Beeinflussung der Seren durch mehrmaliges Frieren-Tauen ausgeschlossen werden konnte.

Zur Präzisionskontrolle diente ein Sammelserum, das aus den Seren gesunder Probanden durch Mischen gleicher Teile hergestellt wurde.

3.3 Eingesetzte Methoden

3.3.1 Bestimmung der Aktivität der Gesamt-AP

Die Bestimmung erfolgte am Hitachi 717 (Roche Diagnostics, Mannheim) als Enzymaktivitätsmessung in einem Standardtest, der auf der katalytischen Umsetzung von 4-Nitrophenylphosphat zu 4-Nitrophenol beruht. Das im alkalischen Milieu gelb gefärbte 4-Nitrophenol wird bei 405nm gemessen. Die freigesetzte Konzentration des 4-Nitrophenols verhält sich proportional zur Aktivität der AP. Eine Differenzierung nach leber- und knochenspezifischer AP erfolgt damit nicht.

3.3.2 Bestimmung der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase (Ostase)

Die Bestimmung wurde mit dem Tandem-MP Ostase Immunozytometrie Assay (Hybritech-Test Beckman Coulter, Fullerton, USA) durchgeführt.

Das Prinzip der Bestimmung beruht auf der Immunreaktion der knochenspezifischen AP mit einem markierten, für diese AP-Isoform spezifischen monoklonalen Antikörper, der biotinyliert ist. Die Reaktion erfolgt in einer Mikrotiterplatte, deren Kammern (Well) mit Streptavidin beschichtet sind. Nach der Bildung eines Komplexes an der Festphase, bestehend aus Erfassungsantikörper und Ostase, wird die Platte gewaschen, um ungebundene Ostase zu

entfernen. Anschließend wird mit einem gepufferten AP-Enzymsubstrat (4-Nitrophenylphosphat) inkubiert. Der Umfang der Substratumwandlung wird in einem Fotometer durch Messung der Extinktion der gestoppten Reaktion bei 405nm kolorimetrisch bestimmt. Die Extinktion ist proportional zum Ostase-Spiegel der Testprobe. Die Berechnung der Konzentration der Ostase in der Probe erfolgt durch gleichzeitiges Messen von Kalibratoren.

Der Test enthielt folgende Bestandteile:

Eine Mikrotiterplatte bestehend aus 8 Teststreifen à 12 Vertiefungen, beschichtet mit Streptavidin

14ml Konjugat, Anti-sALP (monoklonales Maus-IgG) mit Biotin in einer Rind-Pferd Protein-Matrix mit 0,1% Natriumazid

14ml Null Standard/ Verdünner, Proteinmatrix (Rind) ohne messbaren Anteil von sALP mit 0,1% Natriumazid

Standards, Proteinmatrix (Rinderserumalbumin) mit jeweils

1ml Standard A : 7µg Human-sALP/L und 0,1% Natriumazid

1ml Standard B : 15µg Human-sALP/L und 0,1% Natriumazid

1ml Standard C : 30µg Human-sALP/L und 0,1% Natriumazid

1ml Standard D : 60µg Human-sALP/L und 0,1% Natriumazid

1ml Standard E : 90µg Human-sALP/L und 0,1% Natriumazid

1ml Kontrolle mit niedriger sALP-Konzentration, ca. 11µg Human-sALP/L und 0,1% Natriumazid

1ml Kontrolle mit hoher sALP-Konzentration, ca. 45µg Human-sALP/L und 0,1% Natriumazid

18ml Waschkonzentrat, Waschmittellösung (6% Tween 20) mit 0,3% Natriumazid

3ml Substratkonzentrat, p-Nitrophenylphosphat in Stabilisierungspuffer mit Konservierungsmittel

30ml Substratverdünner, Puffer mit Konservierungsmittel

29ml Stoppreagenz

Das Waschkonzentrat wurde zum Gebrauch in 500ml destilliertem Wasser gelöst. Das Substratreagenz wurde durch Verdünnen von 1ml des Substratkonzentrats mit 30ml des Substratverdünners angesetzt.

Testablauf:

50µl eines jeweiligen Standards, Kontrollmaterials bzw. der Serumprobe und 100µl Konjugat wurden in jede Reaktionskammer pipettiert und eine Stunde bei Zimmertemperatur auf einem Flachbrettrotationsmischer bei 500 –900 U/min inkubiert. Anschließend wurden die Lösungen abgesaugt, die Reaktionskammern dreimal mit jeweils ca. 300µl Waschpuffer gewaschen und die Platte danach auf Filterpapier ausgeschlagen. Unverzüglich wurde danach 150µl Substratreagenz in jedes Well pipettiert und bei Zimmertemperatur auf dem Rotator (500-900 U/min) 13-15 min inkubiert. Nach Zugabe von 150µl Stoppreagenz wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm in einem Mikrotiterplatten-Fotometer gemessen.

3.3.3 Bestimmung der tartrat-resistenten sauren Phosphatase (TRAP)

Zur Bestimmung der aktiven Isoform 5b der TRAP diente der Bone TRAP Assay von Medac Diagnostika, Wedel.

Dieser Assay bedient sich eines hochspezifischen monoklonalen Antikörpers für die TRAP 5b. Im Test wird dieser Antikörper auf einer Mikrotiterplatte zuerst in den mit Anti-Maus-IgG-beschichteten Reaktionskammern und anschließend mit den Serum-Proben inkubiert. Eine Farbreaktion ermöglicht auch hier eine direkt zur Farbintensität proportionale Aktivitätsbestimmung der gebundenen TRAP 5b durch fotometrische Ablesung bei einer Wellenlänge von 405nm.

Der Test enthielt folgende Bestandteile:

Eine Mikrotiterplatte bestehend aus 8 Teststreifen à 12 Vertiefungen, beschichtet mit Anti-Maus-IgG

40ml Waschpufferkonzentrat, Tris/NaCl/Tween (25x), pH 7,75

10,5ml Anti-TRAP-Antikörper, lyophilisiert, enthält 0,09% NaN₃.

Standards: je 0,5ml humane rekombinante TRAP, lyophilisiert, enthält 0,09% NaN₃

Standard 1: 1,0 U/l

Standard 2: 5,0 U/l

Standard 3: 10,0 U/l

0,5ml Kontrolle, humane rekombinante TRAP, lyophilisiert, enthält 0,09% NaN₃

6ml Freisetzungsreagenz

10ml Substratpuffer (Natriumacetat)

2 Substrattabletten (p-Nitrophenylphosphat)

4ml Stopplösung

Kontrollen, Anti-TRAP-Antikörper, Standards und Substratlösung wurden bei mindestens -20°C , die übrigen Materialien bei $2-8^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Vor Testablauf war es notwendig, bestimmte Reagenzien vorzubereiten. Diese mussten zunächst auf Raumtemperatur gebracht werden. Um den Waschpuffer anzusetzen, wurde das Waschpufferkonzentrat in einem Messkolben in einem Verhältnis von 1:25 (z.B. 20ml + 480ml) mit Aqua dest. verdünnt. Die Rekonstitution des lyophilisierten Anti-TRAP-Antikörpers sowie der Standards und der Kontrollen erforderte ebenso eine Lösung in Aqua dest. (10,5ml Antikörper + 10,5ml Aqua bzw. 0,5ml Standards/Kontrollen + 0,5ml Aqua). Die Rekonstitutionszeit betrug jeweils 15 min. Zur Herstellung der Substratlösung löste man eine Substrattablette in 5ml Substratpuffer.

Testablauf:

Als erster Schritt erfolgte ein einmaliger Waschvorgang der beschichteten Mikrotiterplatte, indem mittels einer Mehrkanalpipette jede Vertiefung mit $300\mu\text{l}$ Waschpuffer gefüllt und anschließend auf Filterpapier ausgeschlagen wurde. Daraufhin wurden zügig $100\mu\text{l}$ Anti-TRAP-Antikörperlösung in jede Reaktionskammer pipettiert, um ein Austrocknen zu verhindern. Im Anschluss daran wurde die Platte 60 min bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schütteln auf einem Rotator mit 950 Rotationen/min inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Platte erneut viermal hintereinander gewaschen und auf Filterpapier ausgeklopft. Dann wurden jeweils $100\mu\text{l}$ 0,9% NaCl als Leerwert, Standards, Kontrollen und Proben und gleich darauffolgend $50\mu\text{l}$ Freisetzungsreagenz jedesmal als Doppelbestimmungen in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Erneut wurde die Platte unter gleichen Bedingungen wie zuvor inkubiert und viermal gewaschen. Anschließend erfolgte die Pipettierung der Substratlösung auf die Platte, eine Inkubation für eine weitere Stunde in der feuchten Kammer bei 37° und die anschließende Zugabe von $25\mu\text{l}$ Stopplösung in jede Reaktionskammer. Vor der fotometrischen Messung war jede Vertiefung von unten abzuwischen und darauf zu achten, dass keinerlei Luftblasen in ihnen vorhanden waren.

Die Auswertung fand in einem Mikrotiterplatten-Fotometer mit einem Filter für eine Wellenlänge von 405nm statt.

3.3.4 Bestimmung des N-Telopeptids des Typ I Kollagens (NTx)

Grundlage der Bestimmung von NTx im Serum war der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Osteomark NTx der Firma Ostex International. Dafür wird ein NTx-Antigen auf einer Mikrotiterplatte adsorbiert. Die Vertiefungen werden mit verdünnter Probe versetzt, anschließend werden monoklonale, mit Meerrettichperoxidase markierte Antikörper hinzugegeben. In der Patientenprobe vorhandenes NTx konkurriert dabei mit dem NTx-Epitop um Antikörperbindungsstellen. Nach einem Waschschrift wird die Menge markierter gebundener Antikörper kolorimetrisch anhand der Bildung eines Peroxidsubstrats bestimmt. Die Extinktion wird fotometrisch gemessen und die NTx-Konzentration über eine Kalibrationskurve errechnet.

Der Test enthielt folgende Bestandteile:

Eine Mikrotiterplatte bestehend aus 8 Teststreifen à 12 Vertiefungen, beschichtet mit NTx-Antigen

40ml Probenverdünnungsmedium zum Verdünnen von Standards, Kontrollen und Proben
Standards, gereinigtes NTx-Antigen (gemessen als BCE = bone collagen equivalent) in stabilisiertem Proteinverdünnungsmedium:

20ml, 0nmol/l BCE

0,4ml, 5nmol/l BCE

0,4ml, 10nmol/l BCE

0,4ml, 20nmol/l BCE

0,4ml, 40nmol/l BCE

Serumkontrollen in zwei Stufen, Humanserum mit bekannter NTx-Konzentration

0,4ml Antikörper-Konzentrat, gereinigte monoklonale Anti-Maus-Antikörper gegen NTx mit Meerrettichperoxidase konjugiert

25ml Antikörperkonjugat-Verdünnungsmedium, gepuffertes Reagenz

125ml Waschkonzentrat, gepuffertes Tensid

0,9ml Chromogenreagenz, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in Dimethylsulfoxid

30ml gepuffertes Substrat, Wasserstoffperoxid zum Verdünnen des Chromogenreagenzes

25ml Stoppreagenz, 0,5mol/l Schwefelsäure.

Die Reagenzien mussten bei 2-8° gelagert und vor Verwendung auf Raumtemperatur gebracht werden. Vor Beginn des Tests wurden der Waschpuffer angesetzt (Konzentrat und Aqua dest., 1:30) und die Konjugatlösung hergestellt (Antikörperkonjugat-Konzentrat und Antikörperkonjugat-Verdünnungsmedium, 1:101). Standards, Kontrollen und die Proben wurden mit Aqua dest. in einem Verhältnis von 1:5 gemischt.

Testablauf:

Zu Beginn wurden jeweils 100µl der verdünnten Standards, Kontrollen und Proben und direkt anschließend 100µl der verdünnten Konjugatlösung in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert. Nach vorsichtigem Schwenken der Platte für 15 bis 20 Sekunden auf einer ebenen Fläche erfolgte 90 min lang eine Inkubation bei Raumtemperatur. Während der letzten 5 min war die Lösung aus Chromogenreagenz und gepuffertem Substrat anzusetzen (Mischverhältnis 1:101). Die Platte wurde nach der Inkubation mit einer Mehrkanalpipette und einem Mindestwaschvolumen von 350µl fünfmal gewaschen und danach auf saugfähigem Filterpapier ausgeschlagen. Um die Streifen nicht austrocknen zu lassen, wurde gleich mit dem nächsten Schritt fortgefahren. Mit einer Mehrkanalpipette wurden in jede Reaktionskammer 20µl der verdünnten Lösung aus Chromogenreagenz und gepuffertem Substrat gegeben und die Platte wiederum bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Als Zeichen der stattgefundenen Antikörper-Antigen-Reaktion entwickelte sich in diesem Schritt ein blauer Farbstoff. Diese Farbreaktion wurde nach 30 min durch Pipettieren von 100µl Stoppreagenz in jede Vertiefung beendet. Um ein ausreichendes Durchmischen sicherzustellen, wurde die Platte wieder vorsichtig für ein paar Sekunden auf ebener Fläche geschwenkt. Nach fünfminütigem Ruhigstellen der Platte wurden die Extinktionswerte im Fotometer bei 450nm und einem Referenzfilter von 630nm gemessen.

3.3.5 Bestimmung des Osteoprotegerins (OPG)

Ein Sandwich-Enzymimmunoassay von ImmunDiagnostik, Bensheim, diente zur Messung von Osteoprotegerin im Serum. Verwendet werden zwei spezifische Antikörper gegen Osteoprotegerin, von denen einer an die Mikrotiterplatte gebunden (Bindungsantikörper), der zweite frei und mit Biotin markiert ist (Detektionsantikörper). Bei Inkubation auf einer Mikrotiterplatte bildet sich ein Sandwich, in dem OPG zwischen Bindungs- und

Detektionsantikörper eingefasst ist. Nach einem Waschvorgang, der nicht gebundenes Material entfernt, wird über ein Streptavidin/ TMB-System das OPG schließlich quantifiziert. Eine Farbentwicklung nach Zugabe einer Stopplösung ist dabei zur nachgewiesenen Analytmenge proportional. Eine Standardkurve wird erstellt, aus der die Konzentrationen ermittelt werden.

Der Test enthielt folgende Bestandteile:

Eine Mikrotiterplatte bestehend aus 8 Teststreifen à 12 Vertiefungen, beschichtet mit einem OPG-Antikörper
2 x 50ml Waschpufferkonzentrat
50µl peroxidase-markiertes Konjugat
250µl Standardkonzentrat (10 ng/ml)
50ml gebrauchsfertiger Standard- und Antikörperverdünnungspuffer
0,5ml biotinylierter Anti-OPG-Antikörper
2 x 11ml gebrauchsfertiges Tetramethylbenzidin-Substrat
7ml gebrauchsfertige Stopplösung

Wie auch in den anderen Tests, mussten zunächst bestimmte Reagenzien angesetzt werden. Das Waschpufferkonzentrat wurde vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 in Aqua dest. verdünnt. Im gleichen Verhältnis waren der Anti-OPG-Antikörper und auch die OPG-Stopplösung mit dem Verdünnungspuffer zu mischen. Das mit dem farbstoffspaltenden Enzym versehene Konjugat wurde ebenfalls 1:10 in Waschpuffer verdünnt.

Testablauf:

Begonnen wurde mit der Pipettierung von 100µl Verdünnungspuffer und gleich nachfolgend 50µl Standard und Proben in jede Reaktionskammer. Dann wurden 50µl des vorverdünnten Antikörpers hinzupipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei 2-8° C inkubiert, der Inhalt der Platte am nächsten Tag verworfen. Hierauf erfolgten mit einer Mehrkanalpipette ein fünfmaliger Waschvorgang mit 250µl des Waschpuffers und anschließendes Ausschlagen der Platte auf Saugpapier. Als nächstes wurden 200µl vorverdünntes Konjugat in jede Vertiefung pipettiert, die Platte erneut 1 Stunde lang bei 2-8° C inkubiert und ein weiteres Mal nach demselben Schema wie zuvor gewaschen.

Nach der Pipettierung von 200µl der TMB-Substratlösung auf die Platte erfolgte nun eine weitere Inkubation von 15-20 min bei Raumtemperatur.

Im letzten Schritt wurden jeder Vertiefung nochmals 50µl Stopplösung zugesetzt, sofort im Anschluss daran war die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450nm gegen die Referenzwellenlänge von 620nm zu messen.

3.4 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Messergebnisse wurden mit Hilfe der Statistikprogramme SPSS (für Windows, Version 11.5) und GraphPadPrism (für Windows, Version 4.02) ausgewertet. Genutzt wurden der T-Test für unabhängige Stichproben, das Verfahren nach Kolmogorov-Smirnov zur Verteilungsprüfung, der Korrelationskoeffizient nach Spearman und die ANOVA-Varianzanalyse. Bei signifikanter Abweichung von der Normalverteilung wurden als nichtparametrische Tests der Mann-Whitney U-Test (MWU-Test), der Wilcoxon-Test und der H-Test nach Kruskal und Wallis angewendet. Zur Bewertung der diagnostischen Validität wurde die Receiver-Operator Characteristics (ROC)-Analyse durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1 Analytische Präzision der durchgeführten Bestimmungen

Die analytische Präzision der Bestimmungen wurde durch intra- und interserielle Kontrollen charakterisiert. Als Kontrollmaterialien wurden entweder die in den Kits mitgelieferten Materialien oder gepooltes Serum eingesetzt. In Tabelle 2 sind die Daten zusammengestellt.

Tab.2: Ergebnisse der intra- und interseriellen Präzision.

Die intraserielle Präzision für die AP und von NTx wird nicht angegeben, da die AP-Bestimmungen durch das Zentrallabor im Rahmen der Routinebestimmungen in mehreren Serien vorgenommen wurden und für die NTx-Bestimmungen eine ausreichende Zahl von Testkombinationen durch die Lieferfirma nicht bereitgestellt werden konnte.

	Intraserielle Präzision			Interserielle Präzision		
	n	$\bar{x} \pm s$	s%	n	$\bar{x} \pm s$	s%
AP (U/l)	-	-	-	6	96 ± 3	3,1
Ostase ($\mu\text{g/l}$)	11	$15,6 \pm 0,40$	2,6	9	$11,6 \pm 0,60$	5,2
TRAP (U/l)	11	$2,44 \pm 0,08$	3,3	9	$3,21 \pm 0,31$	9,7
NTx (nmol/l)	-	-	-	9	$26,7 \pm 3,49$	13,1
OPG (pg/ml)	10	$62,7 \pm 4,84$		10	$63,7 \pm 4,25$	6,7

4.2 Ermittlung der markerspezifischen Referenzgrenzen in der Kontrollgruppe

Für die Knochenmarker Ostase, TRAP und NTx existierten von den Herstellern der Testkombinationen in den Gebrauchsanleitungen aufgeführte Normalwerte, die aber hinsichtlich Alters- und Geschlechtsabhängigkeit sowie Festlegung der perzentilen oberen Grenze nur unzureichend definiert waren. Für OPG gab es keine Angaben, sondern lediglich die Information, dass jedes Labor seine eigenen Referenzgrenzen ermitteln solle. Dies war letztlich

auch erforderlich, da unser Labor die ersten kommerziell erhältlichen Testkombinationen erhielt und demzufolge Literaturangaben hierzu noch nicht vorlagen. Für die AP stand die vom Zentrallabor mitgeteilte methodenspezifische obere Referenzgrenze zur Verfügung.

Somit war es zumindest für das OPG erforderlich, Referenzgrenzen in einer eigenen Untersuchung zu erstellen. Dies erfolgte in einer Kontrollgruppe von 36 Männern, in der ich gleichzeitig die Konzentrationen von AP, Ostase, TRAP und NTx ermittelte. Obwohl die Zahl der Probanden aus logistischen und z.T. auch aus Kostengründen nicht sehr hoch war, konnte damit im weiteren Verlauf eine einheitliche Beurteilung der diagnostischen Aussagekraft der Knochenmarker bei Prostatakarzinompatienten vorgenommen werden. Dieses Vorgehen erlaubte, die Bewertung der Marker nicht nur in Bezug auf die unzureichend definierten Referenzgrenzen der Hersteller vorzunehmen.

4.2.1 Altersabhängigkeit

Um einen Einfluß des Alters auf die jeweilige Serumkonzentrationen der 5 Knochenmarker auszuschließen, prüften wir diese auf eine Altersabhängigkeit. Das Alter der Männer lag zwischen 23 und 77 Jahren, der Altersmedian betrug 50 Jahre. In Abbildung 5 sind die Konzentrationen der untersuchten Marker in Abhängigkeit vom Alter dargestellt und die Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten (R_s) angegeben.

Eine Altersabhängigkeit der 5 untersuchten Knochenmarker in der Kontrollgruppe bestand nicht ($p > 0,05$), obwohl eine Tendenz zu erniedrigten Ostase- bzw. erhöhten OPG-Konzentrationen mit höherem Alter erkennbar ist.

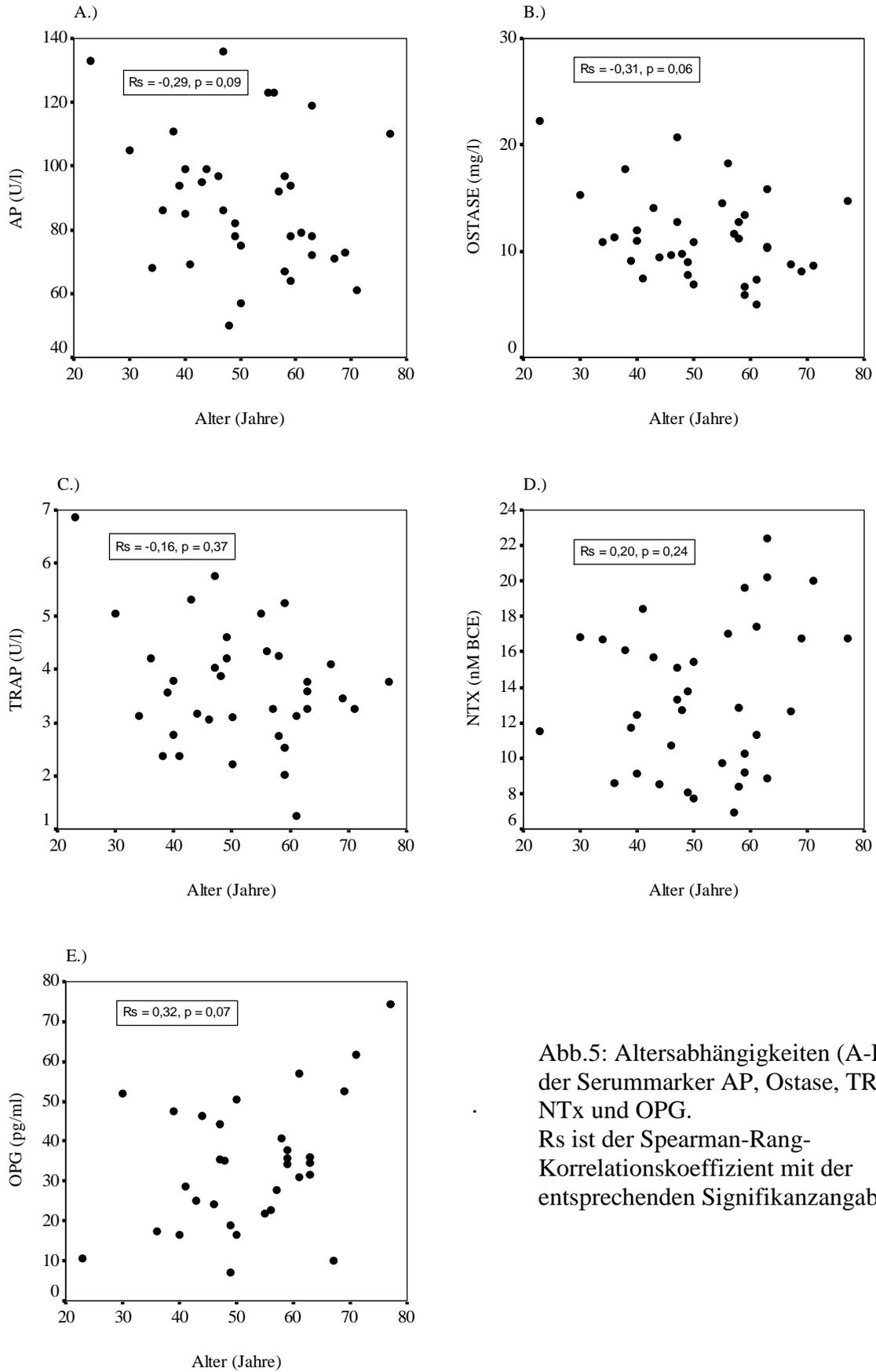


Abb.5: Altersabhängigkeiten (A-E) der Serummarker AP, Ostase, TRAP, NTx und OPG. R_s ist der Spearman-Rang-Korrelationskoeffizient mit der entsprechenden Signifikanzangabe.

4.2.2 Verteilungsprüfung der Markerkonzentrationen

Zur Errechnung von Referenzgrenzen ist nach den Empfehlungen der IFCC eine Verteilungsprüfung der ermittelten Werte in der Referenzpopulation vorzunehmen (96). Ich habe hierzu die Häufigkeitsverteilungen für die jeweiligen Marker ermittelt. In Abbildung 6 sind die Verteilungen zusammengestellt. Zur Verteilungsprüfung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Die Serumkonzentrationen aller Marker waren in der Gruppe der gesunden Männer normalverteilt.

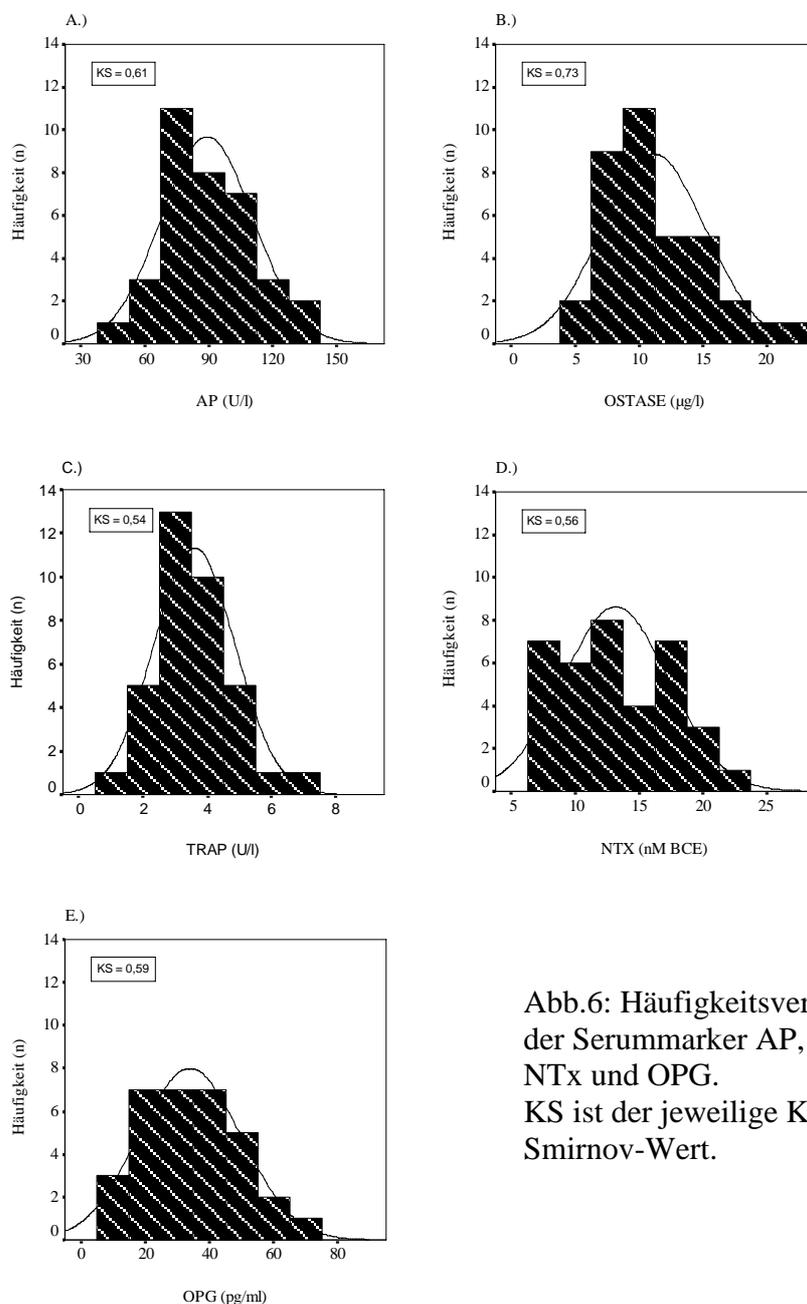


Abb.6: Häufigkeitsverteilungen (A – E) der Serummarker AP, Ostase, TRAP, NTx und OPG. KS ist der jeweilige Kolmogorov-Smirnov-Wert.

4.2.3 Berechnung der Referenzgrenzen

In Tabelle 3 ist eine deskriptive Statistik als Übersicht über die gemessenen Konzentrationen der 5 Marker zusammengestellt. Die gute Übereinstimmung zwischen den Mittelwerten und den Medianen verdeutlicht noch einmal, wie bereits im vorhergehenden Kapitel anhand der Verteilungsprüfungen aufgeführt, dass die Werte in der Kontrollgruppe jeweils normalverteilt sind.

Tab.3: Deskriptive Statistik der Konzentrationen von AP, Ostase, TRAP, NTx und OPG in der Kontrollgruppe.

Parameter	AP (U/l)	Ostase ($\mu\text{g/l}$)	TRAP (U/l)	NTx (nM BCE)	OPG (pg/ml)
Mittelwert	88,7	11,4	3,7	13,4	33,9
Stand.abw.	21,6	4,0	1,1	4,2	15,9
Median	86,0	10,9	3,6	12,8	34,3
Maximum	136,0	22,2	6,9	22,4	74,4
Minimum	50,0	5,0	1,2	6,9	7,1
Obere Quartile	99,0	13,9	4,3	16,8	45,9
Untere Quartile	72,0	8,7	3,1	9,3	22,2

Da eine Altersabhängigkeit der Werte weitgehend ausgeschlossen wurde und für alle Marker eine Normalverteilung der Werte vorlag, habe ich entsprechend den Empfehlungen der IFCC das 95%-Referenzintervall errechnet. Dieses ergibt sich aus dem Mittelwert $\pm 1,96 s$ (Standardabweichung). Der obere Wert des Intervalls ist die 97,5%-, der untere Wert entsprechend die 2,5%-Referenzgrenze. Von Interesse für alle Marker ist in Bezug auf die vorliegende Fragestellung nur die obere 97,5%-Referenzgrenze.

In der Tabelle 4 ist für den jeweiligen Marker das 95%-Referenzintervall mit seinen oberen und unteren Grenzen eingetragen. Weiterhin sind die Referenzgrenzen aus den Gebrauchsanleitungen der verwendeten Testkombinationen aufgeführt, für die AP die Grenze entsprechend der Mitteilung des Zentrallabors genannt. Ein Vergleich zeigt, dass zwar eine hinlänglich gute

Übereinstimmung der Referenzgrenzen besteht, dass aber meine Entscheidung, zusätzlich eine Kontrollgruppe zur diagnostischen Validitätsprüfung mitzuführen, richtig war.

Tab.4: Referenzgrenzen von AP, Ostase, TRAP, NTx und OPG in der Kontrollgruppe sowie die Referenzgrenzen entsprechend den Herstellerangaben.

Parameter	95% Referenzintervall (2,5% - bis 97,5%-Grenze)	Referenzgrenzen nach Herstellerangaben
AP (U/l)	46,4 - 131,1	200 (= 97,5%-Perzentile)
Ostase (µg/l)	3,5 - 19,3	20,1 (= 95%-Perzentile f. Männer)
TRAP (U/l)	1,5 - 5,9	3,4 +/- 0,8 (f. prämenop. Frauen) 4,6 +/- 1,1 (f. postmenop. Frauen) keine Angaben für Männer
NTx (nM BCE)	5,3 - 21,6	8,1 - 24,8 (f. Männer)
OPG (pg/ml)	2,7 - 65,2	nicht vorhanden

4.3 Werteverteilung der Parameter im Serum der Patientengruppen

In den Abbildungen 7 - 11 sind die Serum-Konzentrationen aller 5 Knochenmarker der Kontrollen, der BPH- und PCa-Patienten in Streudiagrammen dargestellt. Die Mediane der jeweiligen Gruppen wurden als horizontale Linien eingezeichnet. Die punktierte Linie verdeutlicht die obere Grenze des Referenzintervalls, also die 97,5%-Perzentile, wie ich sie für den jeweiligen Parameter im vorigen Abschnitt beschrieben habe. Die Signifikanzberechnungen für die verschiedenen Marker zwischen den Gruppen erfolgte mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test, da die Werte in den einzelnen Patientengruppen nicht der Gauß-Verteilung unterlagen. Die signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sowie weitere Besonderheiten sind jeweils in den Legenden der Abbildungen angegeben.

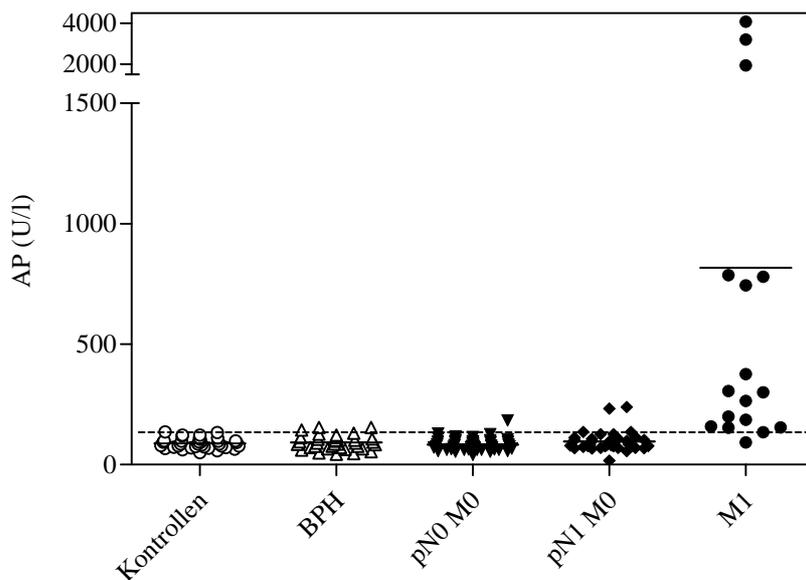


Abb.7: Konzentration der AP in den untersuchten Gruppen.

Signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis, nichtparametrischer ANOVA, Dunn's Post-Test; $p < 0,001$) fanden sich zwischen den PCa-Patienten mit Knochenmetastasen (M1) und den Kontrollen, den BPH-Patienten und den PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen (pN0/M0, pN1/M0); kein Unterschied existierte zwischen den Kontrollen, den BPH-Patienten und den PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen ($p > 0,05$).

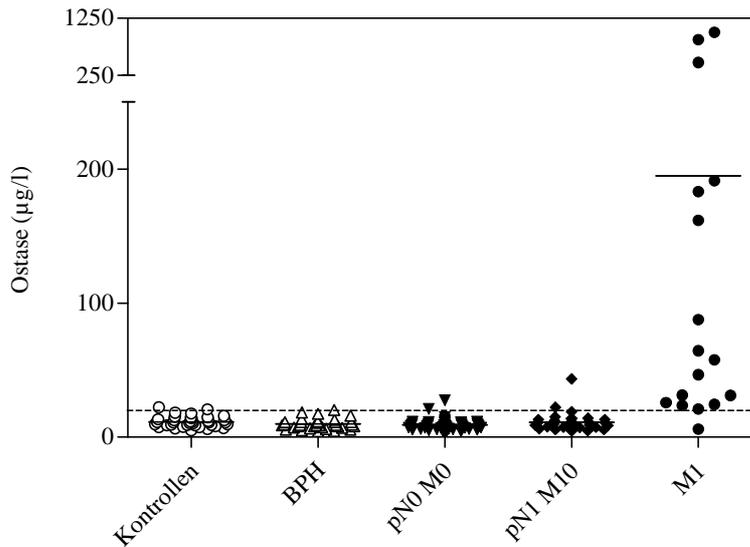


Abb.8: Konzentration der Ostase in den untersuchten Gruppen.

Signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis, nichtparametrischer ANOVA, Dunn's Post-Test; $p < 0,001$) fanden sich zwischen den PCa-Patienten mit Knochenmetastasen (M1) und den Kontrollen, den BPH-Patienten und den PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen (pN0/M0, pN1/M0); kein Unterschied existierte zwischen den Kontrollen, den BPH-Patienten und den PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen ($p > 0,05$).

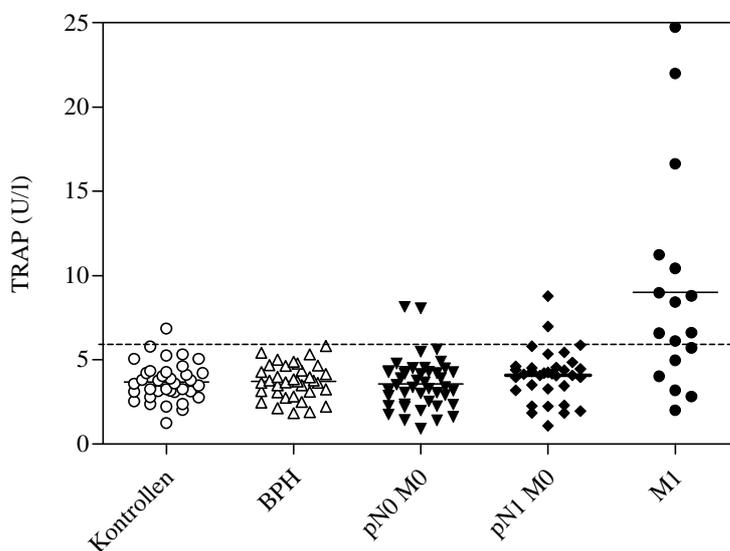


Abb.9: Konzentration der TRAP in den untersuchten Gruppen.

Signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis, nichtparametrischer ANOVA, Dunn's Post-Test; $p < 0,001$) fanden sich zwischen den PCa-Patienten mit Knochenmetastasen (M1) und den Kontrollen, den BPH-Patienten und den PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen (pN0/M0, pN1/M0); kein Unterschied existierte zwischen den Kontrollen, den BPH-Patienten und den PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen ($p > 0,05$).

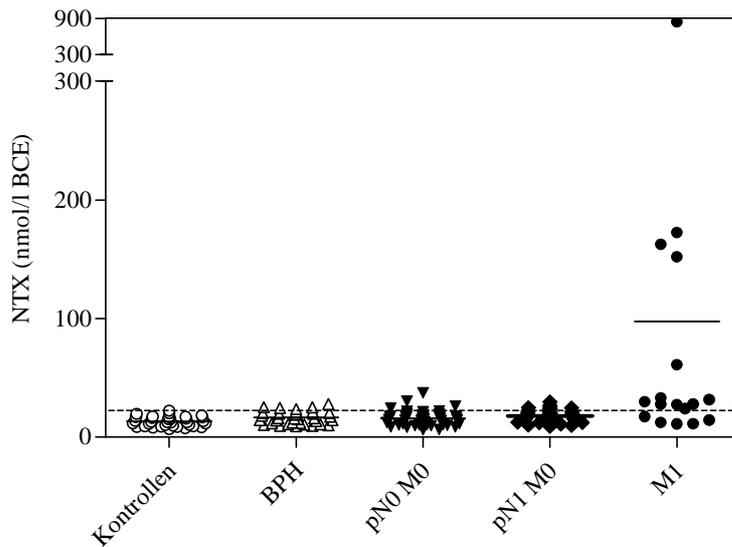


Abb.10: Konzentration von NTx in den untersuchten Gruppen.

Signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis, nichtparametrischer ANOVA, Dunn's Post-Test; $p < 0,001$) fanden sich zwischen den PCa-Patienten mit Knochenmetastasen (M1) und den Kontrollen, den BPH-Patienten und den PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen (pN0/M0, pN1/M0); kein Unterschied existierte zwischen den Kontrollen, den BPH-Patienten und den PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen ($p > 0,05$).

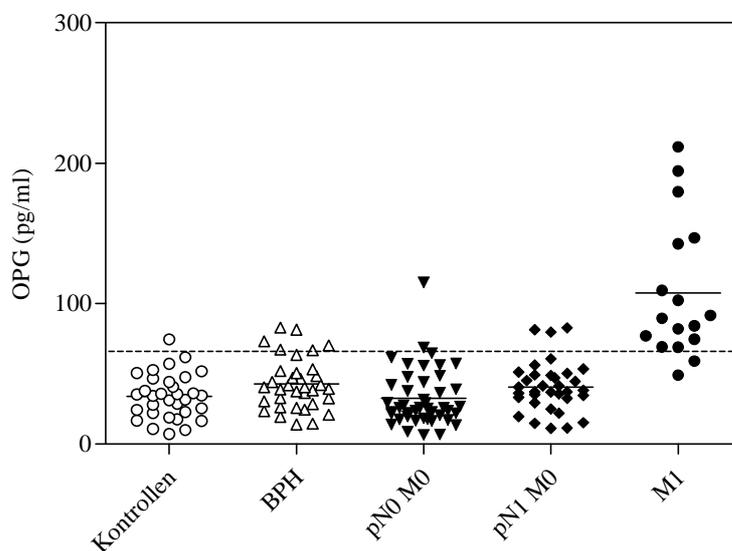


Abb.11: Konzentration von OPG in den untersuchten Gruppen.

Signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis, nichtparametrischer ANOVA, Dunn's Post-Test; $p < 0,001$) fanden sich zwischen den PCa-Patienten mit Knochenmetastasen (M1) und den Kontrollen, den BPH-Patienten und den PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen (pN0/M0, pN1/M0); kein Unterschied existierte zwischen den Kontrollen, den BPH-Patienten und den PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen ($p > 0,05$).

Fasst man dieses Ergebnis zusammen, so finden sich also signifikante Konzentrationserhöhungen bei allen Knochenmarkern ausschließlich in der Gruppe der PCa-Patienten mit Knochenmetastasen. Bei einzelnen, über der oberen Referenzgrenze liegenden Werten in einer der anderen Gruppen, z.B. in der Gruppe der PCa-Patienten mit Lymphknotenmetastasen ohne Knochenmetastasen, gab es zum Zeitpunkt der Probanden-Rekrutierung für diese Studie keinen Hinweis auf Knochenmetastasen. Jedoch ist nicht sicher auszuschliessen, dass eine Knochenmetastasierung zu diesem Zeitpunkt schon vorlag. Die erhöhten Werte könnten somit im Sinne einer bereits erfolgten Metastasierung erklärt werden. Näher werde ich darauf in der Diskussion eingehen.

4.4 Korrelationen zwischen den Markern und klinischen Daten

4.4.1 Korrelationen der Marker untereinander in den Patientengruppen

Berechnet wurden die nicht-parametrischen Spearman-Korrelationskoeffizienten zwischen den verschiedenen Knochenmarkern. Für die Korrelationsberechnungen wurden die Kontrollen, BPH-Patienten und PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen zu einer Gruppe zusammengefasst, da diese Probanden sich hinsichtlich der Knochenmarker-Konzentrationen nicht unterschieden, wie dies in den vorhergehenden Abbildungen dargestellt wurde. Aufgrund des grundsätzlich unterschiedlichen Verhaltens der Knochenmarker bei den metastasierten PCa-Patienten ist eine separate Korrelationsberechnung in dieser Gruppe erforderlich. Zusätzlich wurde die Korrelation der Knochenmarker zum jeweiligen PSA-Wert errechnet, da dieser ein Leitparameter in der PCa-Diagnostik ist. Die Daten sind in den Tabelle 5 und 6 zusammengestellt.

Tab.5: Spearman-Korrelationskoeffizienten zwischen den Knochenmarkern AP, Ostase, TRAP, NTx und OPG sowie dem PSA in der zusammengefassten Gruppe Kontrollpersonen, BPH-Patienten und PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen (n= 149). In Klammern unterhalb des Korrelationskoeffizienten sind die p-Werte angegeben. Der besseren Übersichtlichkeit wegen sind alle Korrelationskoeffizienten mit $p < 0.05$ fett gedruckt und nur mit 2 Nachkommastellen angegeben.

Parameter	AP	Ostase	TRAP	NTx	OPG
Ostase	0,58 ($<0,0001$)	-	-	-	-
TRAP	0,26 (0,001)	0,44 ($<0,0001$)	-	-	-
NTx	0,09 (0,298)	0,16 (0,045)	0,20 (0,013)	-	-
OPG	-0,03 (0,689)	-0,03 (0,715)	-0,07 (0,410)	0,03 (0,697)	-
PSA	0,08 (0,383)	-0,02 (0,845)	0,03 (0,784)	-0,08 (0,436)	-0,03 (0,736)

Tab.6: Spearman-Korrelationskoeffizienten zwischen den Knochenmarkern AP, Ostase, TRAP, NTx und OPG sowie in der Gruppe der knochenmetastasierten PCa-Patienten (n=17). Auch hier sind unterhalb des Korrelationskoeffizienten die p-Werte angegeben und nur die signifikanten Koeffizienten ($p < 0.05$) fett gedruckt.

Parameter	AP	Ostase	TRAP	NTx	OPG
Ostase	0,96 ($<0,0001$)	-	-	-	-
TRAP	0,52 (0,027)	0,47 (0,047)	-	-	-
NTx	0,60 (0,008)	0,58 (0,012)	0,86 ($<0,0001$)	-	-
OPG	0,27 (0,291)	0,30 (0,240)	-0,07 (0,786)	-0,15 (0,580)	-
PSA	0,49 (0,039)	0,48 (0,042)	0,05 (0,842)	0,08 (0,760)	0,70 (0,002)

Folgende Konstellationen bei der Bewertung der Korrelationskoeffizienten fallen auf:

- OPG als der Osteoklastogenese-Marker korreliert nicht mit den eigentlichen Knochenmarkern AP, Ostase, TRAP und NTx. Dies ist unabhängig vom Status der Knochenmetastasierung.
- Die Marker AP, Ostase, TRAP und NTx korrelieren in der Gruppe der zusammengefassten Gruppe ohne Knochenmetastasen miteinander, während NTx nur mit der TRAP und der Ostase korreliert.
- Im Gegensatz dazu korrelieren die vier Marker AP, Ostase, NTx und TRAP bei den Patienten mit Knochenmetastasen alle miteinander. Zum Teil können hier sehr hohe Korrelationskoeffizienten beobachtet werden.
- PSA korreliert in der Gruppe der metastasierten Patienten mit den Formations-Knochenmarkern AP und Ostase sowie mit OPG, nicht jedoch mit den Abbaumarkern NTx und TRAP. Bemerkenswert ist, dass keinerlei Korrelationen zwischen den PSA-Werten und den Knochenmarkern in der vereinigten Gruppe aus Kontrollpersonen, BPH- und PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen bestehen.

4.4.2 Korrelationen zwischen den Markern und dem Tumorstadium/ -grad

Untersucht wurden hier in der Gruppe der nicht-knochenmetastasierten PCa-Patienten, ob die 5 Knochenmarker AP, Ostase, TRAP, NTx und OPG eine Korrelation mit dem Tumorstadium bzw mit dem WHO-Grad eines Tumors zeigen. Die folgende Tabelle 7 zeigt den Überblick.

Tab.7: Spearman-Korrelationskoeffizienten der Marker zum Tumorstadium und dem WHO-Grad bei Patienten ohne Knochenmetastasen. Unter den Korrelationskoeffizienten sind in Klammern wieder die p-Werte angegeben. Die Werte beruhen auf den Angaben von 78 Patienten.

Korrelationskoeffizienten aller Marker zum Tumorstadium und zum WHO-Grad					
Parameter	AP	Ostase	TRAP	OPG	NTx
Tumorstadium	0,035 (0,764)	0,010 (0,928)	-0,127 (0,271)	0,005 (0,966)	0,107 (0,356)
WHO-Grad	0,088 (0,455)	0,098 (0,401)	-0,027 (0,820)	0,677 (0,512)	0,205 (0,078)

Anhand der p-Werte kann man erkennen, dass keinerlei Korrelation zwischen den Serummarkern und dem Tumorstadium bzw. -grad besteht.

4.4.3 Einfluss der antiandrogenen Hormonbehandlung auf die Markerkonzentrationen

Der mögliche Einfluss einer antiandrogenen Hormonbehandlung auf die Konzentration der 5 Knochenmarker wurde in den Gruppen pN1M0 und M1 untersucht. Nur in diesen beiden Gruppen gab es Patienten mit und ohne Hormonbehandlung. In der pN1M0-Gruppe waren 12 von 34 Patienten behandelt, in der M1-Gruppe waren es hingegen 3 von 17.

Die Konzentrationen der Marker AP, Ostase, NTX und OPG in der pN1M0-Gruppe unterschieden sich nicht bei Patienten mit und ohne Hormonbehandlung (Abb. 12; Mann-Whitney U-Test, $p = 0,235 - 0,640$). Dagegen waren die TRAP-Werte der behandelten Patienten geringfügig, aber signifikant höher als die der unbehandelten Patienten (Median, 4,44 vs. 3,71 U/l, Mann-Whitney U-Test, $p = 0,025$). In der M1-Gruppe wurden bei allen Markern keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Patienten beobachtet (Mann-Whitney U-Test, $p = 0,025$). Es muss jedoch betont werden, dass die Zahl der unbehandelten Patienten sehr klein war, sodass auf die Darstellung in Form einer Abbildung verzichtet wurde.

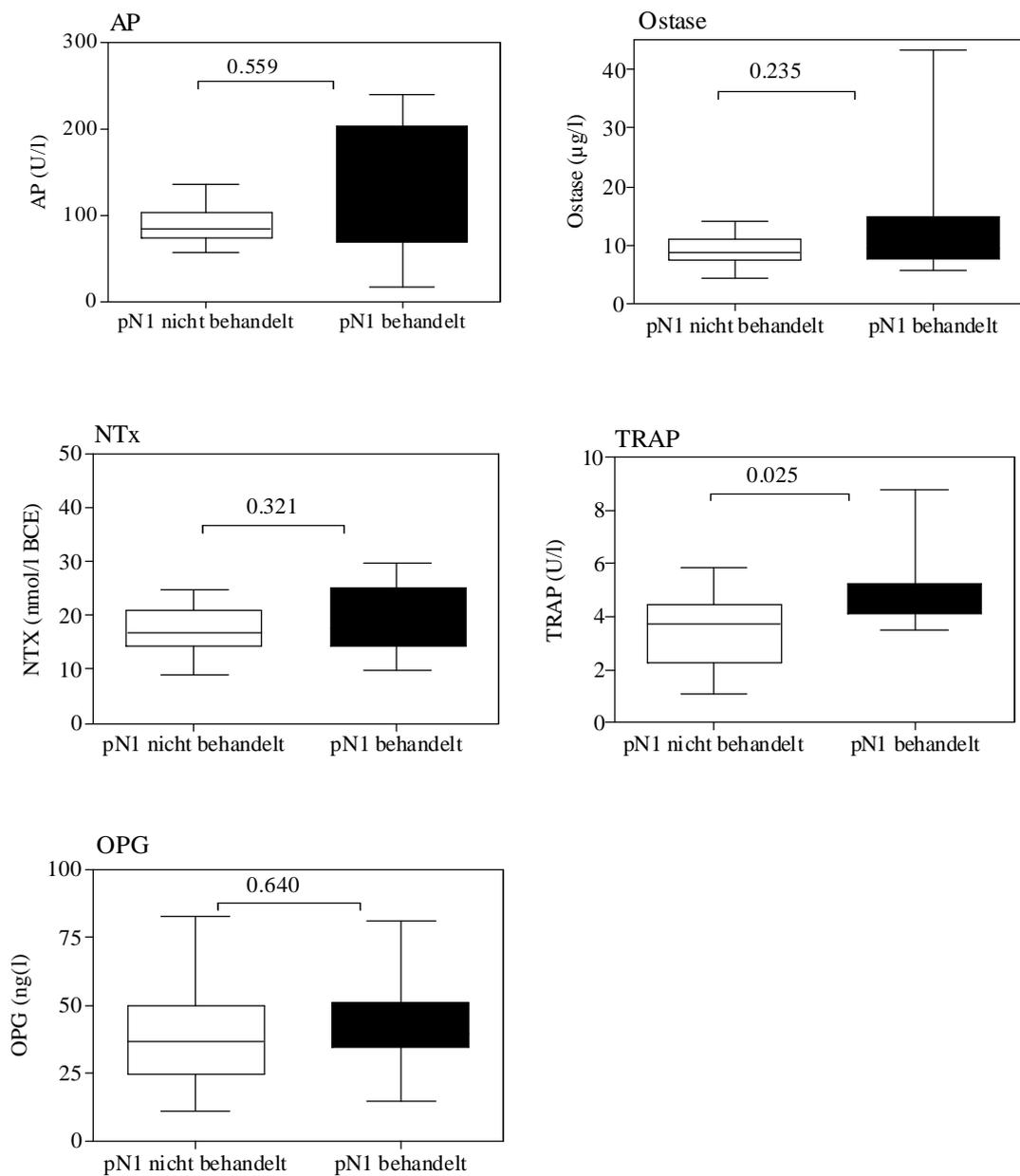


Abb.12: Box-und-Whisker-Diagramme der Konzentrationen der AP, Ostase, NTx, OPG und TRAP in der pN1M0- Gruppe mit und ohne Hormonbehandlung. Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Patienten wurden mit dem Mann-Whitney U-Test berechnet. Die Box-und Whisker-Diagramme stellen die 25-75-Perzentile (Box) und die 5- bzw. 95-Perzentilen (Whisker) in den Untersuchungsgruppen dar.

4.5 Bewertung der diagnostischen Validität

Die erhöhten Konzentrationen der Marker in der metastasierten Gruppe lassen, wie dargelegt, vermuten, dass damit die Möglichkeit gegeben ist, Patienten mit Knochenmetastasen von denjenigen ohne Metastasen abzugrenzen.

Um dies besser bewerten und darüber hinaus die Parameter miteinander vergleichen zu können, habe ich ROC-Analysen für alle 5 Knochenmarker durchgeführt. Dazu wurden die Probanden der Kontrollgruppe sowie die BPH- und die PCa-Patienten ohne Knochenmetastasen zu einer neuen Gruppe zusammengefasst und mit der Gruppe der PCa-Patienten mit Knochenmetastasen für alle Knochenmarker verglichen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 13 zusammengestellt.

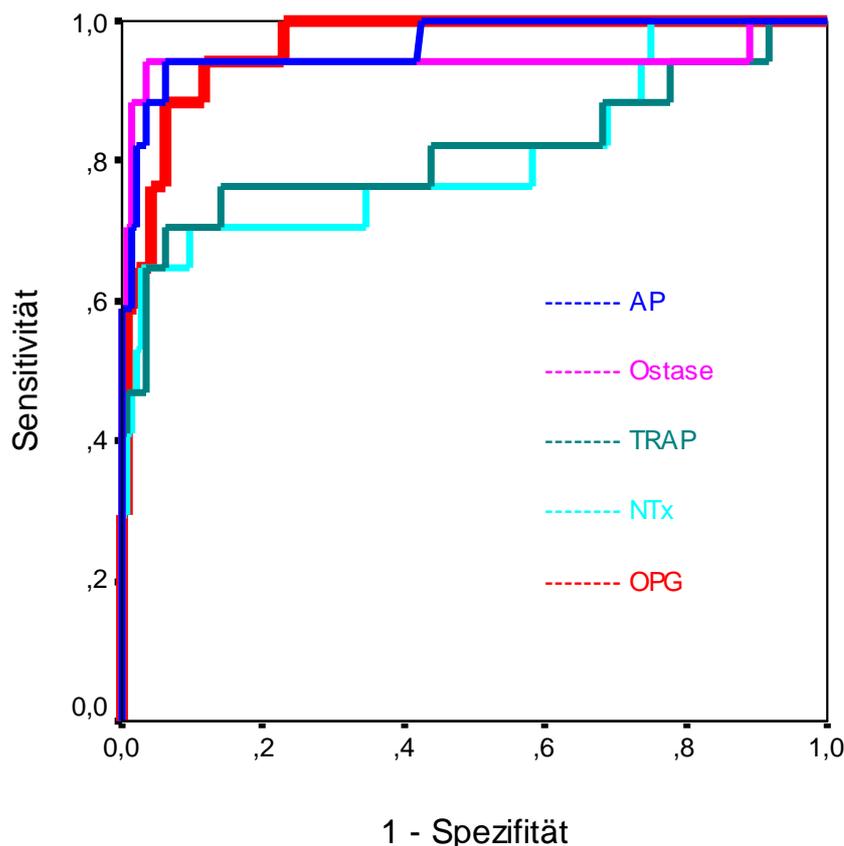


Abb.13: ROC-Kurven aller 5 Knochenmarker

Die Flächen unter den Kurven zeigen für die untersuchten Marker folgende Werte: AP 0,965 ± 0,024; Ostase 0,942 ± 0,051; TRAP 0,816 ± 0,074; NTx 0,806 ± 0,071; OPG 0,964 ± 0,016.

Aufgrund der Flächengrößen unter den ROC-Kurven ergibt sich hinsichtlich des damit verbundenen Diskriminierungsvermögens von Patienten mit und ohne Knochenmetastasen folgende Rangordnung: AP > OPG > Ostase > TRAP > NTx.

Dabei existiert kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Flächenwerten der Marker AP, Ostase und OPG. Diese Marker sind danach aufgrund der ROC-Analyse als gleichwertig anzusehen. Es zeigt sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den Flächenwerten der Parameter NTx und TRAP, beide weisen signifikant niedrigere Flächenwerte auf ($p < 0.05$).

Die Fläche unter der ROC-Kurve lässt lediglich eine globale Beurteilung der diagnostischen Validität eines Markers zu. Wichtig ist jedoch, welche Werte die diagnostischen Sensitivitäten und Spezifitäten an den zur Diagnostik herangezogenen Referenzgrenzen aufweisen. Werden die im Kapitel aufgeführten orientierenden 97,5%-Referenzgrenzen verwendet, die ich in der Kontrollgruppe ermittelt habe, ergeben sich die in der Tabelle 8 zusammengestellten Werte. In der jeweils zweiten Spalte habe ich die Sensitivitäten und Spezifitäten aufgeführt, die sich aus den Referenzgrenzen entsprechend den Herstellerangaben errechnen lassen.

Tab.8: Übersicht über die ermittelten diagnostischen Sensitivitäten und Spezifitäten der Knochenmarker. Die Berechnungen erfolgten auf der Basis der oberen Referenzgrenzen (97,5%-Perzentilen), die in der Studienkontrollgruppe ermittelt wurden (Spalte: „Eigene Referenzgrenzen“: AP 131,1 U/l; Ostase 19,3 µg/l; TRAP 5,9 U/l; NTx 21,6 nmol/l BCE; OPG 65,2 pg/ml;) sowie anhand der Angaben der Hersteller der Testkits (Spalte: „Referenzgrenzen der Hersteller“: AP 200 U/l; Ostase 20,1 µg/l; TRAP 4,6 ± 1,1 U/l - für postmenopausale Frauen; NTx 24,8 nmol/l BCE; für OPG nicht vorhanden). In Klammern sind die 95%-Konfidenzintervalle der jeweiligen Sensitivitäten und Spezifitäten angegeben. In Klammern unterhalb dieser Angaben sind als Bruch jeweils die richtig positiv bzw. richtig negativ erkannten Probanden zur Gesamtzahl der Probanden der Untersuchungsgruppe aufgeführt.

	Sensitivität (%)		Spezifität (%)	
	Eigene Referenzgrenzen	Referenzgrenzen der Hersteller	Eigene Referenzgrenzen	Referenzgrenzen der Hersteller
AP (U/l)	94 (71 - 99) (16/17)	65 (41 - 83)	94 (81 - 99) (34/36)	100 (88 - 100)
Ostase (µg/l)	94 (71 - 99) (16/17)	94 (71 - 99)	94 (81 - 99) (34/36)	94 (81 - 99)
TRAP (U/l)	65 (41 - 83) (11/17)	77 (f. postmenop Frauen)	97 (85 - 99) (35/36)	87 (f. postmenop Frauen)
NTx (nM BCE)	71 (47 - 87) (12/17)	65 (41 - 83)	97 (85 - 99) (35/36)	100 (87 - 100)
OPG (pg/ml)	88 (41 - 100) (15/17)	nicht vorhanden	97 (83 - 99) (35/36)	nicht vorhanden

Hierbei lässt sich feststellen, dass die Sensitivität der AP anhand der Herstellerangaben weitaus schlechter ausfällt als die Sensitivität, die ich mit den aus der Kontrollgruppe ermittelten Referenzgrenzen berechnet habe. Dies ist sicherlich nicht verwunderlich, da die AP in ihrer Gesamtaktivität wenig spezifisch ist und sich dies bei der Angabe der Referenzgrenze in einem höheren Wert reflektiert. Abgesehen davon gibt es relativ gute Übereinstimmungen.

Die Daten dieser Pilotstudie verdeutlichen, dass OPG ein guter Marker zur Erkennung einer Knochenmetastasierung bei PCa-Patienten ist. Auf eine verbesserte diagnostische Aussage durch Kombination verschiedener Marker habe ich bewusst verzichtet, da die relativ geringe Anzahl der metastasierten Patienten weitere zuverlässige statistische Aussagen kaum erwarten ließ.

5. Diskussion

Die bereits in der Einleitung aufgeworfenen Fragen sollen hier näher diskutiert bzw. die in Kapitel 4 gewonnenen Ergebnisse in die Gesamthematik einer verbesserten, frühzeitigen Diagnostik von Knochenmetastasen eingeordnet werden.

5.1 Problem und klinische Relevanz der Diagnostik von Knochenmetastasen

Der Nachweis von Knochenmetastasen bei PCa-Patienten ist entscheidend sowohl für die individuelle Prognose als auch für das therapeutische Konzept. Ähnlich vielen anderen Tumoren kann das PCa sehr lange asymptomatisch bleiben und dadurch unbemerkt proliferieren und metastasieren. Das diagnostische Bemühen zielt daher auf ein frühzeitiges Erkennen des Tumors, da nach allen Erkenntnissen nur Patienten in den klinischen Stadien T1 und T2 ohne Fernmetastasen durch eine radikale Tumorresektion und eine eventuelle Strahlentherapie gute Heilungschancen haben.

Sobald die Krebszellen in den Knochen metastasiert sind, werden die Patienten im Allgemeinen nur noch palliativ mit einer antiandrogenen Hormontherapie behandelt (97). Die klinische Relevanz der sicheren und frühzeitigen Erkennung von Knochenmetastasen liegt daher einerseits darin, der damit verbundenen Symptomatik, v.a. den meist ausgeprägten Knochenschmerzen, durch eine Hormonbehandlung schneller entgegenwirken zu können. Zum anderen gilt es, eine radikale Prostatektomie zu vermeiden, für die sich der Arzt im Allgemeinen bei Unkenntnis einer Fernmetastasierung in der Absicht einer Kurativbehandlung entscheiden würde. Hierbei zöge der Patient keinen Nutzen aus der Operation, hätte jedoch zu den Symptomen einer Knochenmetastasierung zusätzlich die Nebenwirkungen des Eingriffs zu erwarten.

Wie bereits im theoretischen Teil ausgeführt, sind anhand von PSA-Bestimmung und Bildgebung individuelle Vorhersagen über das Krankheitsstadium, einschließlich einer Knochenmetastasierung, nicht sicher möglich. Studien, die diesbezüglich die PSA-Werte mit Befunden des Szintigramms verglichen, belegen, dass das PSA der Bildgebung zwar überlegen ist, sie empfehlen jedoch die Szintigraphie weiterhin v.a. für das initiale Staging, nicht so sehr aber für die Verlaufskontrolle und die Diagnostik von Mikrometastasen (98).

Hinsichtlich der Kostenfrage, der Strahlenbelastung sowie der Abhängigkeit von apparativer Ausrüstung erklärt dies das enorme Interesse an einem Serummarker bzw. einer Kombination von Serummarkern zum einfachen und sicheren Nachweis einer Knochenmetastasierung.

Diesbezüglich will ich also, ausgehend von meinen Ergebnissen, die diagnostische Validität der 5 untersuchten Marker (AP, Ostase, TRAP, NTx und OPG) im Vergleich mit dem Schwerpunkt auf OPG besprechen. Zusätzlich werde ich neben den diagnostischen Aspekten das mögliche Potential dieser Marker als prognostische Indikatoren diskutieren.

5.2 Beurteilung der Methodik und Analytik

An insgesamt 166 Männern (36 Kontrollen; 35 Patienten mit BPH; 44 PCa-Patienten ohne Metastasen; 34 Prostatakarzinom-Patienten mit Lymphknotenmetastasen ohne Knochenmetastasen; 17 Prostatakarzinom-Patienten mit Knochenmetastasen) wurde die diagnostische Validität der Marker AP, Ostase, TRAP, NTx und OPG im Serum im Vergleich zur Erfassung von Knochenmetastasen beim Prostatakarzinom evaluiert.

Zahlreiche Untersuchungen von verschiedenen Markern wurden bisher im Serum oder Urin bzw. in beiden Probenarten vorgenommen. Wir haben uns bei der Aufstellung des Studienplans jedoch darauf konzentriert, ausschließlich Bestimmungen im Serum vorzunehmen. Dies hat, neben rein logistischen Gründen der Probensammlung, sowohl präanalytische als auch analytische Ursachen.

Urinproben lassen sich weniger zuverlässig sammeln als Blutproben. Dies gilt zumindest für das Patientenkontingent, welches in der vorliegenden Studie untersucht wurde. Außerdem ist bekannt, dass die sehr variierenden Bedingungen im Urin (pH-Wert, unterschiedliche Osmolarität usw.) die Stabilität der verschiedenen Marker nachteilig beeinflussen können (74;99;100). Um diurese-bedingte Fehler bei der quantitativen Bewertung von Ausscheidungsgrößen im Harn zu vermeiden, werden Urinmarker durch Bezug auf Kreatinin normiert. Allein dadurch ergeben sich zusätzliche Fehlermöglichkeiten. Da aber außerdem inzwischen die meisten Marker zur Erfassung der Knochenformation und –resorption auch als kommerziell erhältliche Bestimmungsverfahren im Serum vorliegen, war es nicht notwendig, auf Urintests zurückzugreifen.

Mögliche Fehler durch die Studiengestaltung betrafen den Einfluss des Alters bzw. den einer antiandrogenen Behandlung auf die Konzentration der Knochenmarker. Diese Fehlermöglichkeiten konnten durch Vergleiche weitgehend ausgeschlossen werden. Darauf gehe ich später noch ein.

5.2.1 Beurteilung der Analytik anhand der intra- und interseriellen Präzision

Die Ergebnisse der intraseriellen und interseriellen Präzision in Tabelle 1 zeigen, dass alle Bestimmungen mit guter analytischer Zuverlässigkeit durchgeführt wurden. Diese Präzisionsdaten entsprechen Resultaten, wie sie bei ELISA-Bestimmungen üblich sind.

Lediglich die NTx-Bestimmungen wiesen mit einem Variationskoeffizienten von 13,1% einen Wert über 10% auf. Leider war es nicht möglich, diesem Problem weiter nachzugehen, da zur Zeit der Durchführung meiner Experimente die Herstellerfirma keine weiteren Tests zur Verfügung stellen konnte. Später hat sich herausgestellt, dass die Fa. Ostex International, Inc. als Hersteller des NTx-Osteomark-Testes von der Inverness Inc. aufgekauft wurde. Deshalb wurde die Produktion der ELISA-Teste zeitweise von der Fa. Wampole Lab. übernommen, wobei ganz offensichtlich anfangs Schwierigkeiten aufgetreten sind. Die NTx-Ergebnisse sind jedoch ausreichend zuverlässig, um die nachfolgenden Schlussfolgerungen ziehen zu können.

5.2.2 Referenzgrenzen in den eigenen Kontrollgruppen im Vergleich zu den Angaben der Hersteller

Von wesentlicher Bedeutung hinsichtlich der Einordnung klinischer Befunde in „pathologisch“ bzw. „nicht-pathologisch“ sind Referenzgrenzen. Sie sind häufig geschlechts- und altersabhängig, werden aber auch von anderen Faktoren, wie Ernährung und chronobiologischem Rhythmus, ganz entscheidend beeinflusst. Referenzgrenzen werden entsprechend der Empfehlung der IFCC nach Verteilungsprüfung der Daten in der Regel als obere (97,5%) und untere (2,5%) Perzentile des 95%-Referenzintervalls angegeben (96). Da in unserer Studie nur die jeweils erhöhten Werte von praktischer Bedeutung waren, beziehen sich die von mir gemachten Angaben zu den Referenzgrenzen immer auf das obere Limit. Bei vier der in dieser Studie untersuchten Knochenmarkern, der AP, Ostase, TRAP und NTx, lagen vom Hersteller der Testkombinationen bzw. vom Zentrallabor Angaben zu

Referenzgrenzen vor. Die Herstellerangaben waren jedoch lediglich als orientierend zu verwenden, wie in den beiliegenden Informationsmaterialien vermerkt war. Für OPG gab es keinerlei Angaben. In der Durchführungsbestimmung war nur der wenig hilfreiche Hinweis zu finden, dass man einen eigenen Normbereich bestimmen solle.

Auf Grund dieser uneinheitlichen Werte legten wir anhand unseres Kontrollkollektivs nach den IFCC-Richtlinien eigene neue Referenzgrenzen fest. Das IFCC empfiehlt Gruppenstärken von etwa 120 Probanden, damit auch bei Nicht-Normalverteilungen die o.g. Perzentilen mit geringen Fehlern behaftet sind. Eine zu kostenaufwändige Testdurchführung wird jedoch als Grund akzeptiert, geringere Probandenzahlen für eine Auswertung einzusetzen. Dazu wird in dem Abschnitt „intuitive assessment“ der IFCC-Richtlinie Stellung genommen, wobei auf den vorläufigen Charakter der unter diesen Bedingungen ermittelten Intervalle hingewiesen werden sollte (101). Dies ist also auch für die hier vorgestellte Studie der Fall, die deshalb ja auch ausdrücklich als Pilotstudie angesehen wurde.

Ganz bewusst wurde aber in der vorliegenden Studie Wert darauf gelegt, wie bereits in der Einleitung und im Studiendesign beschrieben, nicht nur Referenzgrenzen entsprechend den Angaben der Hersteller der ELISAs zu verwenden, um die diagnostische Validität einschätzen zu können. Trotz aller Limitierungen, in erster Linie aufgrund der relativ kleinen Kontrollgruppen, war es besonders wichtig, nicht nur für das OPG Referenzgrenzen zu ermitteln, sondern dies auch für die anderen Analyte vorzunehmen. Da aber entsprechend den in Tabelle 4 angeführten Vergleichen zwischen den von den Herstellern angegebenen Referenzgrenzen und den selbst ermittelten eine ausreichende Übereinstimmung besteht, schließe ich Bewertungsfehler bezüglich der diagnostischen Aussagekraft der Marker auf der Basis unzulässiger Referenzgrenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit aus. Wie in den Ergebnissen ausführlich dargelegt, wurden die oberen Referenzgrenzen im parametrischen Verfahren (Mittelwert + 1,96 SD) ermittelt, nachdem für die untersuchten Analyte im Kolmogorov-Smirnov-Test Normalverteilungen nachgewiesen wurden.

Für OPG wurden in Fortführung der hier beschriebenen Messungen auch noch weitere Bestimmungen an 82 Frauen vorgenommen (102). Dabei zeigte sich, dass eine

Geschlechtsabhängigkeit der OPG-Konzentrationen im Serum nicht vorliegt und sowohl bei Männern als auch bei Frauen die Werte einer Normalverteilung unterliegen.

5.3 Eignung der untersuchten Marker als diagnostische Indikatoren einer Knochenmetastasierung

Der Schwerpunkt meiner Arbeit war es, die diagnostische Validität des OPGs als möglichen Indikator der Metastasierung des Prostatakarzinoms in die Knochen einzuschätzen. Als ich die Untersuchungen durchführte, gab es dazu noch keine Literaturangaben. Die Rolle des OPGs als integrale Komponente in der Osteoklastogenese war, wie ich in der Einleitung dargelegt habe, jedoch inzwischen weitgehend geklärt (87;103).

Da die Knochenmetastasen beim Prostatakarzinom sich vor allem durch osteoblastische Reaktionen auszeichnen, war zu vermuten, dass das OPG als Osteoklastogenese-Komponente bei der Knochenmetastasierung verändert ist und sich dies durch Freisetzung im Blut widerspiegeln könnte. Die diagnostische Eignung einer neuen Kenngröße sollte jedoch stets im Vergleich mit bisher etablierten Markern erfolgen. Aus diesem Grund wurden parallel dazu die eingeführten Knochenmarker AP, Ostase als knochenspezifische AP, NTx und TRAP bestimmt. Zu den einzelnen Markern und ihrer Eignung, speziell beim PCa Knochenmetastasen zu erkennen, werde ich im Folgenden einige Ausführungen machen.

5.3.1 Marker des Knochenaufbaus: AP und Ostase

Da osteoblastische Reaktionen typisch sind für Knochenmetastasen in PCa-Patienten, sind natürlich Marker von besonderer Bedeutung, die diese osteoblastische Proliferation, wie die alkalische Phosphatase mit ihrer knochenspezifischen Isoform, widerspiegeln (104).

Wie im Ergebnisteil dargelegt, erbrachten meine Messungen einen signifikanten Anstieg sowohl der gesamten alkalischen Phosphatase als auch der Ostase im Serum von knochenmetastasierten PCa-Patienten. Dabei lagen die AP- und Ostase-Werte über der Referenzgrenze und unterschieden sich von der Kontrollgruppe auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

Studien zum Zusammenhang zwischen der AP und der Ostase im Serum sowie dem Metastasierungsgrad im Knochen zeigen des öfteren eine enge Beziehung zwischen den

jeweiligen Konzentrationen im Serum und dem Ausmaß der Metastasierung. So wiesen Tamada et al. (8) eine signifikante Korrelation zwischen der Ostase und anderen Serummarkern des Knochenstoffwechsels (Osteocalcin, PICP, ICTP, CTx, NTx, T-Pyr., T-D-Pyr. und F-D-Pyr) und dem Metastasenstatus in PCa-Patienten nach. Alle Marker, außer Osteocalcin und CTx, zeigten eine deutliche Korrelation mit der EOD in der Knochenszintigraphie. Die Ostase war hier der sensitivste und spezifischste Marker, um zwischen Patienten mit und ohne Knochenmetastasen unabhängig von einer eventuellen antiandrogenen Behandlung zu unterscheiden.

Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe Desoize et al. (105). Die Autoren schlussfolgerten, dass sich die Ostase sehr gut als diagnostischer Marker zur Erstdiagnose und Verlaufskontrolle von Knochenmetastasen eignet. Die Ostase wurde zusammen mit der TRAP an einem Patientenkollektiv aus Prostata- und Brustkrebserkrankten mit und ohne Knochenmetastasen bestimmt. Parallel dazu wurden die Ergebnisse durch Röntgenuntersuchungen und Knochenszintigraphien objektiviert sowie mit PSA-Werten verglichen. Die Knochenmarker korrelierten mit der Bildgebung. Jedoch konnte keine signifikante Beziehung zum PSA-Wert festgestellt werden.

Der Schwachpunkt der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase besteht nach Diaz-Martin et al. (106) darin, dass sie eine Kreuzreaktivität mit ihrem Leber-Isoenzym aufweist. Trotz dieses angeblichen Nachteils besaßen sowohl die Ostase als auch PINP ein deutliches Unterscheidungspotential hinsichtlich einer Knochenmetastasierung in Prostatakarzinompatienten (Sensitivität 90%, Spezifität 82%). Auch hier fand sich keine Korrelation zu den PSA-Werten.

Auch Wirtz et al. (54) konnten zwischen der PSA-Konzentration und der Serumkonzentration der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase keine signifikante Korrelation finden. Die in PCa-Patienten verschiedener Stadien bestimmte Ostase zeigte ein weitaus größeres Diskriminierungsvermögen und Vorhersagepotential (Sensitivität und Spezifität für die Ostase 71% und 100%, für PSA 71% und 81%) für Knochenmetastasen als das PSA.

In meinen Untersuchungsergebnissen wiesen sowohl die AP als auch die Ostase, wie übrigens auch die anderen drei Marker, keinerlei Korrelation zum PSA bei Patienten ohne

Knochenmetastasen auf (Tab. 5). Dies ist auch nicht verwunderlich, da hierzu die molekularbiologische Grundlage einer Korrelation fehlt.

Dagegen bestand eine Korrelation bei Patienten mit Knochenmetastasen (Tab. 6). Diese ging jedoch verloren, wenn die Berechnungen mit allen Patienten, also nichtmetastasierten und metastasierten, vorgenommen wurde. Da aber ein PSA-Anstieg nach radikaler Prostatektomie nicht nur durch eine Metastasierung, sondern auch durch ein lokales Rezidiv hervorgerufen werden kann, ist ein PSA-Anstieg primär kein Indikator einer Metastasierung. Ein PSA-Anstieg bedeutet vielmehr für den behandelnden Arzt, die Ursache des Anstiegs aufzuklären.

Da das Prostatakarzinom bevorzugt in den Knochen metastasiert, kann mithilfe einer Knochenszintigraphie bzw. der Bestimmung von Knochenmarkern eine Differenzierung beider Prozesse erreicht werden. Hinzu kommt, dass häufig bei Patienten nach einem PSA-Anstieg eine antiandrogene Therapie eingeleitet wird und damit PSA-Erniedrigungen erfolgen, ohne dass der eigentliche Metastasierungsprozess dadurch beeinflusst wird (107).

Die unterschiedlichen Literaturangaben im Verhalten von PSA zu Knochenmarkern ergeben sich z.T. somit auch dadurch, dass die Korrelationsberechnungen zu sehr unterschiedlichen Zeitpunkten vorgenommen wurden.

5.3.2 Marker des Knochenabbaus: TRAP und NTx

TRAP

Wie bereits im theoretischen Teil erwähnt, handelt es sich bei der in dieser Arbeit als TRAP bezeichneten tartrat-resistenten sauren Phosphatase um ihre knochenspezifische Isoform, die TRAP 5b. Die TRAP schnitt neben NTx mit einem signifikant niedrigeren Flächenwert als die Marker AP, Ostase und OPG in der ROC-Analyse als zweitschlechtesten Marker ab. Die Sensitivität lag nach unseren Berechnungen bei 65%, die Spezifität bei 97%. Die Referenzangaben des Herstellers bezogen sich auf postmenopausale Frauen und waren somit nur unter Vorbehalt zum Vergleich heranzuziehen.

Demgegenüber jedoch konnten viele unterschiedliche Studien zeigen, daß die TRAP 5b, nicht aber die TRAP 5a, bei verschiedensten Knochenerkrankungen eine erhöhte Aktivität und gute Unterscheidungskraft bezüglich Patienten mit und ohne Knochenmetastasen besitzt.

Capeller et al. (108) z.B. beobachteten, dass die TRAP 5b bei Brustkrebserkrankten mit Knochenmetastasen gegenüber Patientinnen ohne Knochenmetastasen deutlich erhöht ist. Außerdem zeigten sich signifikante Unterschiede in Abhängigkeit von der Hormonbehandlung. Die Autoren empfahlen daher die TRAP 5b als Serummarker, insbesondere auch als Verlaufskontrolle unter einer Biphosphonattherapie. Andere Autoren zeigten ebenfalls, dass die TRAP 5b bei Brust- und Prostatakrebskranken mit Knochenmetastasen in ihrer Aktivität deutlich erhöht ist und nach antiresorptiver Therapie sinkt (56;109;110).

Halleen et. al. (70) wiesen bei Brustkrebspatienten mit Knochenmetastasen und Patienten mit Osteoporose mehrfach nach, dass die TRAP 5b die Knochenresorptionsrate sensitiv widerspiegelt und sehr gut mit herkömmlichen Knochenmarkern wie z.B. den aminoterminalen Propeptiden CTX und NTx korreliert. An einem Patientenkollektiv bestehend aus postmenopausalen Frauen mit und ohne Hormonbehandlung bestimmte die gleiche Forschergruppe in dem eigens entwickelten Immunoassay die TRAP bei einem pH von 6,1, bei dem die TRAP 5b aktiv, die TRAP 5a jedoch größtenteils inaktiviert vorliegt. Zusätzlich wurde die Gesamt-TRAP ermittelt, um in der Relation einen Konzentrationsunterschied beurteilen zu können. Nach 6 Monaten Hormontherapie sank die TRAP 5b signifikant in der Gruppe der hormonbehandelten Frauen, die Gesamt-TRAP jedoch blieb in beiden Gruppen in ihrer Aktivität weitgehend unverändert (63).

Ein weiterer Vorteil der TRAP liegt darin, dass bewiesen werden konnte, dass sie bei renalem oder hepatischem Versagen im Serum nicht kumuliert (111;112). In einer Übersicht von Mose et al. (113;114) wurde als Kernaussage zusammengefasst, dass die TRAP 5b eine höhere Sensitivität als die meisten anderen Knochenmarker zu besitzen scheint, was die Erkennung von Knochenmetastasen bei Krebspatienten angeht. Sie soll sich außerdem durch eine nur geringe biologische und analytische Variabilität auszeichnen.

Diese Aussagen können in meiner Studie, wie oben bereits erwähnt, nicht bestätigt werden. Die schlechtere diagnostische Validität erklärt sich wahrscheinlich daher, dass die Alterationen durch die Knochenmetastasen beim Prostatakarzinom vorwiegend osteoblastischer Natur sind und deshalb auch deutlicher die Knochenformationsmarker, wie die alkalische Phosphatase, als die Knochenresorptionsmarker betroffen sind. Andererseits zeigen aber auch die erhöhten TRAP-Konzentrationen bei den metastasierten PCa-Patienten die gleichzeitig auftretenden osteolytischen Veränderungen. Bereits frühe Studien belegen anhand biochemischer und histologischer Untersuchungen am Knochen, dass

bei diesen Patienten neben den osteoblastischen Reaktionen auch Resorptionsvorgänge in verstärktem Maße ablaufen (115;116).

NTx

Im Abbauprozess von Kollagen Typ I entstehen Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD), die entweder frei oder an Peptide gebunden in die Zirkulation abgegeben werden. Annäherungsweise 60 – 65% dieser Cross-links, die im Urin nachzuweisen sind, sind an Peptide gebunden (117).

Über die Bestimmung von NTx, dem aminoterminalen Propeptid des Typ I Kollagens, im Urin, wie sie in den meisten Studien hinsichtlich einer Testung von NTx als potentieller Knochenmarker vorgenommen wird, besteht eine geteilte Meinung. Wie bereits unter „Beurteilung der Methodik und Analytik“ erwähnt, nahmen wir die Messungen des NTx ausschließlich im Serum vor, um Fehler durch die Instabilität der Marker im Urin und durch eine unzureichende Probensammlung bei älteren Patienten zu vermeiden (75;99;118). Aufgrund der erheblichen zirkadianen Schwankungen der NTx-Ausscheidung, aber auch angesichts der Veränderungen, die bei Nieren- und Lebererkrankungen vorkommen, wird dem NTx eine nur eingeschränkte klinische Validität gegenüber anderen Knochenmarkern, wie z.B. der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase, bei der Erkennung und Verlaufskontrolle von Knochenmetastasen eingeräumt (99).

Dennoch haben z.B. Costa et al. (117) bei Krebspatienten mit Knochenmetastasen bezüglich der Bestimmung des NTx Vorteile im Vergleich zur knochenspezifischen alkalischen Phosphatase beschrieben, die sich besonders als Verlaufskontrollparameter bei der Biphosphonattherapie zeigten. Erst kürzlich wurden in einer großen multizentrischen Studie die knochenspezifische alkalische Phosphatase und NTx im Serum von Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom bestimmt (119). Hohe Serumwerte beider Marker waren dabei signifikant mit einer insgesamt kürzeren Überlebenszeit assoziiert.

Eine andere Studie an Patienten mit Knochenmetastasen bei Prostata- und anderen Krebsarten, die therapeutisch Biphosphonate erhielten, zeigte, dass Patienten mit einer hohen NTx-Urinexkretion ein erhöhtes Risiko für das Fortschreiten der Knochenläsionen und damit für klinische Komplikationen hatten (120). Ebenso berichten weitere Studien, dass der NTx-Wert mit der Ausdehnung der betroffenen Knochenanteile, der EOD und der Knochenszintigraphie korreliert (8;121).

Diese Ergebnisse und Daten über NTx sind ermutigend (122;122). Trotzdem zeigen unsere Daten aus der vorliegenden sowie aus einer anschließenden Studie, in der wir 10 verschiedene Knochenmarker evaluierten (6), eine eher schlechte diagnostische Validität des NTx im Vergleich zu dem Knochenresorptionsmarker TRAP, zu den Knochenformationsmarkern AP und Ostase und dem OPG. NTx wies von allen Markern die niedrigste analytische Leistung mit einer Fläche von nur 0,806 unter der ROC-Kurve auf. Die mithilfe der Referenzgrenzen unserer Kontrollgruppe errechnete Sensitivität bzw. Spezifität entsprach den entsprechenden Kenngrößen der Sensitivität unter Anwendung der vom Hersteller angegebenen Referenzgrenzen (71% vs. 65% bzw. 97% vs. 100%).

Es sollte mitberücksichtigt werden, dass in den erwähnten Studien verschiedene Knochenmetastasen (lytische und blastische) untersucht wurden und die Patientenzahlen begrenzt waren. Weitere Analysen, welche die NTx-Konzentration simultan in Urin und Serum ermitteln, sind sicherlich erforderlich, um die diagnostische Validität von NTx für Knochenmetastasen vollständig abzuklären.

5.3.3 Marker der Osteoklastogenese: Osteoprotegerin

Da die Osteoklastogenese das Verbindungsstück zwischen Knochenformation und Knochenresorption darstellt, waren die Bestimmung der neu entdeckten Osteoklastogenese-Marker OPG, RANK und RANKL in den letzten Jahren von besonderem Interesse.

Verschiedene Arbeiten belegen, dass OPG, RANK und RANKL von humanen osteoblastären Zellsystemen exprimiert werden (123;124) und dass das von Osteoblasten sezernierte OPG biologisch aktiv und somit imstande ist, die Osteoklastogenese zu modulieren (125;126). Ich konzentriere mich im Folgenden auf das OPG, da die anderen Marker nicht Bestandteil dieser Arbeit sind.

In zahlreichen Studien wurden bereits Störungen des OPG/RANK/RANKL-Systems bei einer Reihe von Knochenkrankheiten beschrieben, die mit einer gesteigerten Osteoblastenaktivität und Knochenresorption assoziiert sind (127;128).

Die drei Glykoproteine sind, wie im theoretischen Teil bereits bemerkt, involviert in die Pathogenese von postmenopausaler Osteoporose, rheumatoider Arthritis, M. Paget,

Peridontose, gutartigen und bösartigen Knochentumoren, Knochenmetastasen und maligner Hypercalcämie (103).

Die biochemischen Mechanismen sind in den Abbildungen 3 und 4 schematisch dargelegt. Ich habe bereits darauf hingewiesen (siehe bei TRAP), dass Knochenmetastasen beim Prostatakarzinom in den bildgebenden Verfahren vorwiegend als osteoblastische Läsionen auftreten, jedoch histomorphologische Daten auch eine bedeutsame osteoklastische Komponente in der Entstehung dieser Läsionen belegen (129;130). Da nachweislich OPG in Knochenmetastasen von PCa-Patienten vermehrt exprimiert wird und es ein sezerniertes Protein ist, ist anzunehmen, dass das OPG die Knochenumbaurate widerspiegeln kann (94). Derartige Expressionsveränderungen wurden auch für RANK und RANKL bei Prostatakarzinompatienten gefunden (94;95;131).

In-vitro-Studien haben gezeigt, dass PCa-Zellen Osteoblasten stimulieren können. Daraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass OPG, unabhängig von der vermehrten Expression, in den metastatisch abgesiedelten Tumorzellen unter anderem auch durch die stimulierte Osteoblastenaktivität in Gegenwart der PCa-Zellen erhöht ist (132;133). Außerdem wird OPG unter anderem die Funktion zugeschrieben, durch Verhinderung einer TRAIL-vermittelten Apoptose eine Überlebenshilfe für PCa-Zellen darzustellen (134;135). Damit ergibt sich eine mehrfache Interaktion zwischen Tumorzellen und den Wirtszellen am Absiedlungsort. Eine erhöhte OPG-Konzentration im Serum bei Knochenmetastasen könnte daher eine Kumulation aus diesen verschiedenen Gründen sein.

Zhang et. al. (95) zeigten in einem Mausmodell, dass PCa-Zellen eine lösliche Form von RANKL produzieren, das für die Stimulation der Osteoklastogenese verantwortlich ist. Die Autoren injizierten PCa-Zellen intratibial und subkutan und applizierten OPG. Dieses verhinderte in der Gruppe der OPG-behandelten Mäuse komplett die Entstehung von osteoblastischen und osteolytischen Knochenmetastasen (knochenhistomorphogenetisch gemessen). Im Gegensatz dazu wurde das subkutane Tumorwachstum nicht beeinflusst, was sich auch anhand der unveränderten PCa-Zell-Proliferation und Apoptoserate nachweisen ließ. Diese Beobachtung zeigt, dass die Osteoklastenaktivität im Zusammenhang mit dem OPG eine wesentliche Rolle in der Entstehung von osteoblastischen PCa-Metastasen spielt. Interessanterweise wiesen die OPG-Konzentrationen in meinen Untersuchungen bei Patienten mit lokalisiertem Prostatakrebs eine Tendenz zu niedrigeren Werten als in BPH-Patienten auf.

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit Daten von Brown et. al. (131). Die Autoren zeigten durch immunhistochemische Untersuchung, dass, obwohl normale prostatistische Zellen OPG exprimieren, diese Expression zu einem Großteil in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad wieder abnehmen kann (94).

Zu teilweise anderen Ergebnissen kamen Hoken et. al. (134). Diese Autoren stellten fest, dass PCa-Zellen in vitro – unter der Kenntnis, dass OPG die TRAIL-vermittelte Apoptose dieser Zellen blockiert (136) – selbst OPG produzieren, um so ihr eigenes Überleben zu sichern. Hormoninsensitive Zellen produzierten tatsächlich hohe OPG-Konzentrationen, hormonsensitive Zellen unter gleichen Bedingungen jedoch nur etwa ein 20stel der Menge. Direkt negativ korrelierten hier eine hohe OPG-Expression und die Fähigkeit von TRAIL, eine Apoptose in diesen OPG-exprimierenden Zellen zu induzieren. Der antiapoptotische Effekt von OPG war außerdem abhängig von der Anwesenheit von RANKL. RANKL allein hatte keinen Effekt auf den Apoptosegrad der Zellen. OPG könnte demzufolge pathologische Aspekte des fortgeschrittenen PCas sowohl verursachen als auch reflektieren. Auch andere Arbeitsgruppen zeigten, dass OPG das Überleben von endothelialen Zellen fördert, die dann ihrerseits in der Folge ein Wachstum der Prostatakarzinomzellen unterstützen können (137).

Die erhöhten OPG-Konzentrationen im Serum bei PCa-Patienten mit Knochenmetastasen können somit, im Zusammenhang mit den erhöhten Knochenformations- und auch -resorptionsmarkern im Blut als Nachweis einer erhöhten Knochenumbaurate interpretiert werden. Diese erhöhte Umbaurate betrifft sowohl den Abbau als auch den Aufbau des Knochens.

Meine Daten in der vorliegenden Arbeit lassen diesen Schluss zu. Die Ergebnisse wurden nach ihrer Veröffentlichung (138) bereits von anderen Autoren bestätigt. Auch nachfolgende Studien unserer Arbeitsgruppe, teils im Zusammenhang mit anderen Fragestellungen, untermauern dieses Resultat (6). Dabei wurden insgesamt 10 Knochenmarker untersucht, wobei sich OPG nach Berechnungen mit der logistischen Regression als ein entscheidender Parameter in der Diagnostik der Knochenmetastasen herausstellte.

Die gute differentialdiagnostische Eigenschaft von OPG, zwischen Patienten mit und ohne Knochenmetastasen zu unterscheiden, ist bemerkenswert. Es muss aber darauf aufmerksam gemacht werden, dass veränderte OPG-Konzentrationen auch bei anderen Erkrankungen, z.B.

bei Gefäßbeteiligungen oder rheumatoider Arthritis, auftreten (139-141). Dies ist nicht verwunderlich, da bei diesen Erkrankungen in den jeweiligen Geweben Überexpressionen gefunden wurden, die sich dann durch Sekretion des OPG im Blut widerspiegeln. Daraus könnte eine geringere diagnostische Spezifität resultieren. Diese mögliche Limitierung der diagnostischen Validität des OPG als Metastasierungsmarker ist in der vorliegenden Studie nicht zu beurteilen, da durch entsprechende Ausschlusskriterien Patienten mit solchen Begleiterkrankungen nicht in die Studie aufgenommen wurden.

Die OPG-Konzentration in unserer Studie war nicht beeinflusst durch eine antiandrogene Hormonbehandlung, wie die OPG-Konzentrationen in der pN1M0-Gruppe zeigten. Eine positive Korrelation zwischen der OPG-Konzentration und dem Testosteron-Index im Serum wurde zwar in der Gruppe der 19 - 85jährigen Männern beobachtet, verlor sich jedoch, wenn nur die Untergruppe der 55 – 85jährigen Männer berücksichtigt wurde (142). Eine positive Korrelation zwischen der OPG-Serumkonzentration und dem Östrogenspiegel wurde ebenfalls beschrieben (143;144). Wahrscheinlich steigert das 17 β -Östradiol die OPG-Produktion durch Aktivierung des Östrogenrezeptors ER- α (145). Eine endgültige Klärung der Situation, ob die OPG-Konzentration bei älteren Männern von der Testosteron-Konzentration abhängig ist, kann zur Zeit nicht erfolgen und bleibt einer separaten Studie mit einer größeren Fallzahl zur Beantwortung offen.

Während für die anderen untersuchten Knochenmarker bei PCa-Patienten mit Knochenmetastasen bereits Daten über deren Einsatz bei der Verlaufskontrolle nach Behandlung mit verschiedenen Bisphosphonaten vorliegen, ist dies beim Osteoprotegerin nicht der Fall. Verschiedene Versuche mit Tiermodellen, in denen eine enge Korrelation zwischen bildgebenden Daten und der OPG-Konzentration unter der Behandlung mit Bisphosphonaten nachgewiesen wurde (146), lassen aber vermuten, dass OPG ein brauchbarer Marker zur Effektivitätskontrolle einer Bisphosphonat-Therapie sein könnte. Brown et al. (131) beobachteten zwar bei Patienten unter Behandlung mit verschiedenen Bisphosphonaten im Vergleich zu Patienten ohne Behandlung niedrigere Werte.

Die Ergebnisse mit zwei verschiedenen OPG-Testen waren jedoch uneinheitlich, sodass zuverlässige Schlussfolgerungen aus Patientendaten dazu bisher nicht möglich sind.

Hofbauer et al. (81) haben gezeigt, dass das Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und -formation direkt vom RANKL-OPG-Quotienten abhängt. Sie haben dies bei primären und sekundären Knochenveränderungen u.a. anhand von Knochenmetastasen im Tiermodell nachgewiesen. Basierend auf dieser Erkenntnis und dem Wissen um die Funktion von OPG und RANKL im Knochenstoffwechsel, könnte man annehmen, dass der RANKL-OPG-Quotient die Diagnose von Knochenmetastasen erleichtern würde. Dies trifft aber wahrscheinlich nicht für alle Formen von Knochenmetastasen zu. In einer Studie von Jung et al. (6) fand sich keine signifikante Korrelation zwischen dem Metastasenstatus bei Prostatakarzinompatienten und der Konzentration von RANKL bzw. dem RANKL-OPG-Quotienten. Eine Mitbestimmung von RANKL erwies sich für die Erkennung der Knochenmetastasen bei diesen Patienten als wertlos. Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Alvarez et al. (147) bei Patienten mit Morbus Paget.

5.4 Osteoprotegerin als Prognosemarker beim Prostatakarzinom

Das Ausmaß einer Knochenmetastasierung, das durch die Knochenszintigraphie verlaufskontrolliert wird, ist ein starker prognostischer Faktor für das Überleben von PCa-Patienten (148;149). Für verschiedene Knochenmarker wurde dies bereits belegt (119).

Meine Untersuchungen waren primär nicht dafür ausgelegt, eine Antwort auf die Frage hinsichtlich einer prognostischen Aussagekraft des OPG zu geben, zumal für Überlebenskurven die Anzahl der untersuchten Probanden zu klein war. Die fortführenden Untersuchungen in der Arbeitsgruppe haben jedoch gezeigt, dass die Serumkonzentration von OPG ein entscheidender Prognostikator des Überlebens von Prostatakarzinompatienten ist (6). Patienten mit OPG-Konzentrationen oberhalb der 95%-Perzentile wiesen eine signifikant geringere Überlebenszeit auf als Patienten mit Werten unterhalb dieses Grenzwertes. In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse erwies sich OPG gemeinsam mit dem Bone-Sialo-Protein als signifikant unabhängige Variable für das Überleben von Prostatakarzinompatienten. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass OPG nicht nur ein diagnostischer, sondern auch ein wertvoller prognostischer Indikator ist.

5.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Pilotstudie verdeutlichen die Rolle des Osteoprotegerins bei der Entwicklung von Knochenmetastasen bei Prostatakarzinom-Patienten.

Osteoprotegerin eignet sich als diagnostischer Metastasenmarker und wurde inzwischen auch als Prognosemarker hinsichtlich des Patientenüberlebens identifiziert.

6. Zusammenfassung

Osteoprotegerin (OPG) ist neben RANK und RANKL Bestandteil eines neuen Zytokinsystems, das essentiell die Differenzierung, Fusion, Aktivierung und Apoptose von Osteoklasten reguliert und damit maßgeblich den gesamten Knochenumbau kontrolliert. OPG wird innerhalb des Knochenkompartments vor allem von Osteoblasten und stromalen Zellen gebildet. Verschiedene osteotrope Faktoren (Zytokine, Vitamine, Peptid- und Steroidhormone, Medikamente) dirigieren die Expression des Glykoproteins, die - wie bei sezernierten, löslichen Proteinen häufig der Fall - im Serum reflektiert wird.

Darauf basierend existieren bereits Studienergebnisse, welche die Rolle des OPG im Knochenstoffwechsel beschreiben. Zum Zeitpunkt des Beginns meiner Untersuchungen gab es noch keine Angaben über OPG als Marker im Serum zur Erkennung von Knochenmetastasen beim Prostatakarzinom (PCa). Untersuchungen im Vergleich zu anderen Knochenmarkern hinsichtlich des diagnostischen Potentials fehlten.

Als Ziel meiner Studie galt es daher, die diagnostische Validität des OPG als Knochenmarker für das metastasierte PCa insbesondere in Gegenüberstellung zu anderen, herkömmlichen Knochenmarkern zu evaluieren. Zum Vergleich wurden Marker wie die alkalische Phosphatase (AP) und ihr knochenspezifisches Isoenzym, die Ostase, sowie die tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) und das aminoterminaler Telopeptid des Kollagen Typ I (NTx) herangezogen. Mit Ausnahme der AP, die als Aktivitätsbestimmung vorgenommen wurde, wurden die anderen Marker mit ELISA-Testen bestimmt. Die intra- und interserielle Präzisionskontrollen der Tests wiesen sehr gute analytische Zuverlässigkeiten auf. Das Patientenklientel umfasste 17 knochenmetastasierte PCa-Patienten gegenüber 78 nicht-knochenmetastasierten PCa-Patienten (pN1M0 + pN0M0). Die Kontrollgruppe bildeten 36 gesunde Männer bzw. 35 Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH). Die Konzentrationen der Marker in der Kontrollgruppe waren normalverteilt. Es bestand keine Altersabhängigkeit.

Die Messungen in dieser Studie ergaben deutlich erhöhte Serumwerte aller Parameter in der Gruppe der PCa-Patienten mit Knochenmetastasen gegenüber den nicht-metastasierten

Patienten. In einer ROC-Analyse zeigte das OPG zusammen mit der AP und der Ostase das höchste Diskriminierungspotential bezüglich der Unterscheidung zwischen PCa-Patienten mit und ohne Knochenmetastasen. Die TRAP und NTx schnitten hier mit einer signifikant kleineren ROC-Fläche unter der Kurve schlechter ab. Die Marker zeigten alle keinerlei Korrelation untereinander bzw. zum Tumorstadium/ - grad oder den PSA-Werten. Mit Ausnahme der TRAP in der nicht-metastasierten PCa-Gruppe fand sich auch keine Assoziation zwischen den Markerwerten und einer Hormonbehandlung.

Diese und die bislang von anderen Autoren vorliegenden Ergebnisse demonstrieren eindeutig das hohe Potential von OPG als diagnostischer Knochenmarker für das metastasierte PCa. Andere Studien bestätigten inzwischen die hier vorgestellten und bereits publizierten Daten und wiesen für die OPG-Konzentration im Serum überdies die Eigenschaft als prognostischen Marker nach. Derzeit laufende Studien evaluieren den Stellenwert der Bestimmung der OPG-Konzentration zur Risikostratifizierung, zur Einschätzung von Krankheitsaktivität und -stadium sowie zur Beurteilung des Ansprechens auf eine medikamentöse Therapie.

7. Literaturverzeichnis

1. Lange PH, Vessella RL. Mechanisms, hypotheses and questions regarding prostate cancer micrometastases to bone. *Cancer Metastasis Rev* 1998;17:331-6.
 2. Peterson JJ, Kransdorf MJ, O'Connor MI. Diagnosis of occult bone metastases: positron emission tomography. *Clin Orthop Relat Res* 2003;S120-S128.
 3. Scutellari PN, Antinolfi G, Galeotti R, Giganti M. Metastatic bone disease. Strategies for imaging. *Minerva Med* 2003;94:77-90.
 4. Alivizatos G, Skolarikos A. Incontinence and erectile dysfunction following radical prostatectomy: a review. *ScientificWorldJournal* 2005;5:747-58.
 5. Sullivan PW, Mulani PM, Fishman M, Sleep D. Quality of life findings from a multicenter, multinational, observational study of patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer. *Qual Life Res* 2007;16:571-5.
 6. Jung K, Lein M, Stephan C, v Hößlin K, Semjonow A, Sinha P et al. Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications. *Int J Cancer* 2004;111:783-91.
 7. de la PC, Castro-Errecaborde NA, Traba ML, Mendez-Davila C, Garcia-Moreno C, Rodriguez dA, Rodriguez-Molina J. Bone remodeling markers in the detection of bone metastases in prostate cancer. *Clin Chim Acta* 2003;331:45-53.
 8. Tamada T, Sone T, Tomomitsu T, Jo Y, Tanaka H, Fukunaga M. Biochemical markers for the detection of bone metastasis in patients with prostate cancer: diagnostic efficacy and the effect of hormonal therapy. *J Bone Miner Metab* 2001;19:45-51.
 9. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19.
 10. Krebs in Deutschland; Häufigkeiten und Trends. 1-4-2006. Saarbrücken; 4. überarbeitete aktualisierte Ausgabe, Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch-Institut.
 11. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55:74-108.
 12. Altwein JE. Prostata-Epidemiologie, Ätiologie, Pathologie, Diagnostik, prognostische Faktoren. In: Rübber H, editor. *Uroonkologie*, 2ed. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Budapest, Hongkong, London, Mailand, Paris, Santa Clara, Singapur, Tokio: Springer, 1997:233-93.
 13. Sivalingam S, Oxley J, Probert JL, Stolzenburg JU, Schwaibold H. Role of pelvic lymphadenectomy in prostate cancer management. *Urology* 2007;69:203-9.
-

14. Berglund RK, Sadetsky N, DuChane J, Carroll PR, Klein EA. Limited pelvic lymph node dissection at the time of radical prostatectomy does not affect 5-year failure rates for low, intermediate and high risk prostate cancer: results from CaPSURE. *J Urol* 2007;177:526-9.
15. Catalona WJ, Richie JP, Ahmann FR, Hudson MA, Scardino PT, Flanigan RC et al. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *J Urol* 1994;151:1283-90.
16. Kirkels WJ, Schröder FH. Suche nach dem Prostatakarzinom -Verbessert die Kombination aus DRE, TRUS und PSA die Effizienz des Sceenings? In: Faul P, Altwein JE, editors. *Screening des Prostatakarzinoms*. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hongkong, Barcelona, Budapest: Springer, 1995:199-206.
17. Pinthus JH, Pacik D, Ramon J. Diagnosis of prostate cancer. Recent Results. *Cancer Res* 2007;175:83-99.
18. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. 1979. *J Urol* 2002;167:960-4.
19. Papsidero LD, Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. A prostate antigen in sera of prostatic cancer patients. *Cancer Res* 1980;40:2428-32.
20. Luboldt HJ, Altwein JE, Bichler KH, Czaja D, Husing J, Fornara P et al. [Early recognition of prostate carcinoma. Initial results of a prospective multicenter study in Germany. Project Group for Early Detection DGU-BDU Laboratory diagnosis Professional Circle]. *Urologe A* 1999;38:114-23.
21. Tenke P, Horti J, Balint P, Kovacs B. Prostate cancer screening. Recent Results *Cancer Res* 2007;175:65-81.
22. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 1999;49:8-31.
23. Guise TA, Mohammad KS, Clines G, Stebbins EG, Wong DH, Higgins LS et al. Basic mechanisms responsible for osteolytic and osteoblastic bone metastases. *Clin Cancer Res* 2006;12:6213s-6s.
24. Mundy GR. Metastasis to bone: causes, consequences and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2002;2:584-93.
25. Rubin MA, Bassily N, Sanda M, Montie J, Strawderman MS, Wojno K. Relationship and significance of greatest percentage of tumor and perineural invasion on needle biopsy in prostatic adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2000;24:183-9.
26. Barnhill RL, Lugassy C. Angiotropic malignant melanoma and extravascular migratory metastasis: description of 36 cases with emphasis on a new mechanism of tumour spread. *Pathology* 2004;36:485-90.

27. Lugassy C, Vernon SE, Warner JW, Le CQ, Manyak M, Patierno SR, Barnhill RL. Angiotropism of human prostate cancer cells: implications for extravascular migratory metastasis. *BJU Int* 2005;95:1099-103.
28. Possinger K, Schmid P. Supportivbehandlung von Knochenmetastasen, UNI-MED Verlag AG/Science, Bremen, London, Boston. 2002.
29. O'Sullivan JM, Cook GJ. A review of the efficacy of bone scanning in prostate and breast cancer. *Q J Nucl Med* 2002;46:152-9.
30. Abuzallouf S, Dayes I, Lukka H. Baseline staging of newly diagnosed prostate cancer: a summary of the literature. *J Urol* 2004;171:2122-7.
31. Klatte T, Klatte D, Bohm M, Allhoff EP. [Radionuclide bone scan in patients with newly diagnosed prostate cancer. Clinical aspects and cost analysis]. *Urologe A* 2006;45:1293-9.
32. Hricak H, Choyke PL, Eberhardt SC, Leibel SA, Scardino PT. Imaging prostate cancer: a multidisciplinary perspective. *Radiology* 2007;243:28-53.
33. Cook GJ, Fogelman I. The role of nuclear medicine in monitoring treatment in skeletal malignancy. *Semin Nucl Med* 2001;31:206-11.
34. Body JJ. Metastatic bone disease: clinical and therapeutic aspects. *Bone* 1992;13 Suppl 1:S57-S62.
35. Gold RI, Seeger LL, Bassett LW, Steckel RJ. An integrated approach to the evaluation of metastatic bone disease. *Radiol Clin North Am* 1990;28:471-83.
36. Even-Sapir E, Metser U, Mishani E, Lievshitz G, Lerman H, Leibovitch I. The detection of bone metastases in patients with high-risk prostate cancer: ^{99m}Tc-MDP Planar bone scintigraphy, single- and multi-field-of-view SPECT, ¹⁸F-fluoride PET, and ¹⁸F-fluoride PET/CT. *J Nucl Med* 2006;47:287-97.
37. Rydh A, Lundblad M, Ahlstrom KR, Tavelin B, Stattin P. MRI of the skeleton in prostate cancer staging. *Scand J Urol Nephrol* 2003;37:222-5.
38. Rosenthal DI. Radiologic diagnosis of bone metastases. *Cancer* 1997;80:1595-607.
39. Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001;12:9-18.
40. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;21:115-37.
41. Phan TC, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol Histopathol* 2004;19:1325-44.

-
42. Lein M, Wirth M, Miller K, Eickenberg HU, Weissbach L, Schmidt K et al. Serial markers of bone turnover in men with metastatic prostate cancer treated with zoledronic acid for detection of bone metastases progression. 10.1016/j.eururo.2007.02.033
 43. ROLAND SI. Calcium studies in ten cases of osteoblastic prostatic metastasis. *J Urol* 1958;79:339-42.
 44. Pollard M, Luckert PH. Effects of dichloromethylene diphosphonate on the osteolytic and osteoplastic effects of rat prostate adenocarcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1985;75:949-54.
 45. Suda T, Udagawa N, Nakamura I, Miyaura C, Takahashi N. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* 1995;17:87S-91S.
 46. Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996;17:308-32.
 47. Reddy SV, Roodman GD. Control of osteoclast differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1998;8:1-17.
 48. Lipton A. Pathophysiology of bone metastases: how this knowledge may lead to therapeutic intervention. *J Support Oncol* 2004;2:205-13.
 49. Halleen JM, Raisanen S, Salo JJ, Reddy SV, Roodman GD, Hentunen TA et al. Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J Biol Chem* 1999;274:22907-10.
 50. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289:1504-8.
 51. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000;289:1508-14.
 52. Horney BS, Farmer AJ, MacKensie A, Honor DJ, Buczkowski S. Alkaline phosphatase isoenzymes in feline serum using an agarose gel alkaline phosphatase kit method. *Can J Vet Res* 1992;56:373-5.
 53. Salminen EK, Kallioinen MJ, la-Houhala MA, Vihinen PP, Tiitinen SL, Varpula M, Vahlberg TJ. Survival markers related to bone metastases in prostate cancer. *Anticancer Res* 2006;26:4879-84.
 54. Wirtz DC, Wolff JM, Ittel TH, Jakse G, Niethard FU. [Is skeletal alkaline phosphatase a valid staging marker in detection of osteoblastic skeletal metastases of prostate carcinoma?]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1998;136:255-9.
 55. Akimoto S, Furuya Y, Akakura K, Ito H. Comparison of markers of bone formation and resorption in prostate cancer patients to predict bone metastasis. *Endocr J* 1998;45:97-104.
-

-
56. Hegele A, Wahl HG, Varga Z, Sevinc S, Koliva L, Schrader AJ et al. Biochemical markers of bone turnover in patients with localized and metastasized prostate cancer. *BJU Int* 2007;99:330-4.
 57. Salo J, Lehenkari P, Mulari M, Metsikko K, Vaananen HK. Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. *Science* 1997;276:270-3.
 58. Lam KW, Li CY, Yam LT, Desnick RJ. Comparison of the tartrate-resistant acid phosphatase in Gaucher's disease and leukemic reticuloendotheliosis. *Clin Biochem* 1981;14:177-81.
 59. Lam WK, Eastlund DT, Li CY, Yam LT. Biochemical properties of tartrate-resistant acid phosphatase in serum of adults and children. *Clin Chem* 1978;24:1105-8.
 60. Stepan JJ, Lau KH, Mohan S, Kraenzlin M, Baylink DJ. Purification and N-terminal sequence of two tartrate-resistant acid phosphatases type-5 from the hairy cell leukemia spleen. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;165:1027-34.
 61. Janckila AJ, Woodford TA, Lam KW, Li CY, Yam LT. Protein-tyrosine phosphatase activity of hairy cell tartrate-resistant acid phosphatase. *Leukemia* 1992;6:199-203.
 62. Kaija H, Jia J, Lindqvist Y, Andersson G, Vihko P. Tartrate-resistant bone acid phosphatase: large-scale production and purification of the recombinant enzyme, characterization, and crystallization. *J Bone Miner Res* 1999;14:424-30.
 63. Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Vaananen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* 2000;15:1337-45.
 64. Halleen JM, Hentunen TA, Karp M, Kakonen SM, Pettersson K, Vaananen HK. Characterization of serum tartrate-resistant acid phosphatase and development of a direct two-site immunoassay. *J Bone Miner Res* 1998;13:683-7.
 65. Janckila AJ, Takahashi K, Sun SZ, Yam LT. Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clin Chem* 2001;47:74-80.
 66. Janckila AJ, Parthasarathy RN, Parthasarathy LK, Seelan RS, Hsueh YC, Rissanen J et al. Properties and expression of human tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5a by monocyte-derived cells. *J Leukoc Biol* 2005;77:209-18.
 67. Scheven BA, Milne JS, Robins SP. A novel culture system to generate osteoclasts and bone resorption using porcine bone marrow cells: role of M-CSF. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:231-5.
 68. Halleen J, Hentunen TA, Hellman J, Vaananen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase from human bone: purification and development of an immunoassay. *J Bone Miner Res* 1996;11:1444-52.
-

-
69. Chamberlain P, Compston J, Cox TM, Hayman AR, Imrie RC, Reynolds K, Holmes SD. Generation and characterization of monoclonal antibodies to human type-5 tartrate-resistant acid phosphatase: development of a specific immunoassay of the isoenzyme in serum. *Clin Chem* 1995;41:1495-9.
 70. Halleen JM, Ylipahkala H, Alatalo SL, Janckila AJ, Heikkinen JE, Suominen H et al. Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b, but not 5a, correlates with other markers of bone turnover and bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 2002;71:20-5.
 71. Brubaker KD, Vessella RL, True LD, Thomas R, Corey E. Cathepsin K mRNA and protein expression in prostate cancer progression. *J Bone Miner Res* 2003;18:222-30.
 72. Clemens JD, Herrick MV, Singer FR, Eyre DR. Evidence that serum NTx (collagen-type I N-telopeptides) can act as an immunochemical marker of bone resorption. *Clin Chem* 1997;43:2058-63.
 73. Leeming DJ, Koizumi M, Byrjalsen I, Li B, Qvist P, Tanko LB. The relative use of eight collagenous and noncollagenous markers for diagnosis of skeletal metastases in breast, prostate, or lung cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006;15:32-8.
 74. Hannon R, Eastell R. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int* 2000;11 Suppl 6:S30-S44.
 75. Woitge HW, Pecherstorfer M, Li Y, Keck AV, Horn E, Ziegler R, Seibel MJ. Novel serum markers of bone resorption: clinical assessment and comparison with established urinary indices. *J Bone Miner Res* 1999;14:792-801.
 76. Hofbauer LC, Heufelder AE. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2355-63.
 77. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999;20:345-57.
 78. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76.
 79. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology* 1998;139:1329-37.
 80. Hofbauer LC, Kuhne CA, Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004;4:268-75.
 81. Hofbauer LC, Neubauer A, Heufelder AE. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin: potential implications for the pathogenesis and treatment of malignant bone diseases. *Cancer* 2001;92:460-70.
-

-
82. Bolon B, Carter C, Daris M, Morony S, Capparelli C, Hsieh A et al. Adenoviral delivery of osteoprotegerin ameliorates bone resorption in a mouse ovariectomy model of osteoporosis. *Mol Ther* 2001;3:197-205.
 83. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12:1260-8.
 84. Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T et al. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;247:610-5.
 85. Tomoyasu A, Goto M, Fujise N, Mochizuki S, Yasuda H, Morinaga T et al. Characterization of monomeric and homodimeric forms of osteoclastogenesis inhibitory factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245:382-7.
 86. Merewether LA, Le J, Jones MD, Lee R, Shimamoto G, Lu HS. Development of disulfide peptide mapping and determination of disulfide structure of recombinant human osteoprotegerin chimera produced in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 2000;375:101-10.
 87. Hofbauer L.C. and Heufelder A.E. "Osteoprotegerin: A novel local player in bone metabolism" ; *European Journal of Endocrinology* 1997,137 345-346.
 88. Tabas JA, Zasloff M, Wasmuth JJ, Emanuel BS, Altherr MR, McPherson JD et al. Bone morphogenetic protein: chromosomal localization of human genes for BMP1, BMP2A, and BMP3. *Genomics* 1991;9:283-9.
 89. Rani CS, MacDougall M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000;3:145-52.
 90. Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Ohta K, Sugai M et al. Expression of osteoprotegerin (osteoclastogenesis inhibitory factor) in cultures of human dental mesenchymal cells and epithelial cells. *J Bone Miner Res* 1999;14:1486-92.
 91. Hofbauer LC, Kluger S, Kuhne CA, Dunstan CR, Burchert A, Schoppet M et al. Detection and characterization of RANK ligand and osteoprotegerin in the thyroid gland. *J Cell Biochem* 2002;86:642-50.
 92. Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today* 2000;21:495-502.
 93. Wong BR, Josien R, Choi Y. TRANCE is a TNF family member that regulates dendritic cell and osteoclast function. *J Leukoc Biol* 1999;65:715-24.
 94. Brown JM, Corey E, Lee ZD, True LD, Yun TJ, Tondravi M, Vessella RL. Osteoprotegerin and rank ligand expression in prostate cancer. *Urology* 2001;57:611-6.
-

-
95. Zhang J, Dai J, Qi Y, Lin DL, Smith P, Strayhorn C et al. Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone. *J Clin Invest* 2001;107:1235-44.
 96. Solberg HE. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:710-4.
 97. Gee WF, Holtgrewe HL, Albertsen PC, Litwin MS, Manyak MJ, O'Leary MP, Painter MR. Practice trends in the diagnosis and management of prostate cancer in the United States. *J Urol* 1995;154:207-8.
 98. Miller PD, Eardley I, Kirby RS. Prostate specific antigen and bone scan correlation in the staging and monitoring of patients with prostatic cancer. *Br J Urol* 1992;70:295-8.
 99. Schober EA, Breusch SJ, Schneider U. Instability and variability of urinary telopeptides and free crosslinks. *Clin Chim Acta* 2002;324:73-9.
 100. Plebani M, Bernardi D, Meneghetti MF, Ujka F, Zaninotto M. Biological variability in assessing the clinical value of biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta* 2000;299:77-86.
 101. Solberg HE, PetitClerc C. Approved recommendation (1988) on the theory of reference values. Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values. *Clin Chim Acta* 1988;177:S3-11.
 102. Jung K, Lein M, Hosslin K, Grosse A, Roth S, Possinger K, Luftner D. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL) in the serum of healthy adults. *Int J Biol Markers* 2002;17:177-81.
 103. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med* 2001;79:243-53.
 104. Koizumi M, Yonese J, Fukui I, Ogata E. The serum level of the amino-terminal propeptide of type I procollagen is a sensitive marker for prostate cancer metastasis to bone. *BJU Int* 2001;87:348-51.
 105. Desoize B, Pourny C, Amico S, Larbre H, Jardillier JC. [Evaluation of two serum isoenzyme phosphatases as bone metastasis markers]. *Bull Cancer* 1990;77:1211-21.
 106. az-Martin MA, Traba ML, de la PC, Guerrero R, Mendez-Davila C, De La Pena EG. Aminoterminal propeptide of type I collagen and bone alkaline phosphatase in the study of bone metastases associated with prostatic carcinoma. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:125-32.
 107. Yahara J, Noguchi M, Noda S. Quantitative evaluation of bone metastases in patients with advanced prostate cancer during systemic treatment. *BJU Int* 2003;92:379-83.
 108. Capeller B, Caffier H, Sutterlin MW, Dietl J. Evaluation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 5b as serum marker of bone metastases in human breast cancer. *Anticancer Res* 2003;23:1011-5.
-

-
109. Chao TY, Yu JC, Ku CH, Chen MM, Lee SH, Janckila AJ, Yam LT. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a useful serum marker for extensive bone metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2005;11:544-50.
 110. Lyubimova NV, Pashkov MV, Tyulyandin SA, Gol'dberg VE, Kushlinskii NE. Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of bone metastases in patients with breast cancer and prostate cancer. *Bull Exp Biol Med* 2004;138:77-9.
 111. Halleen JM. Tartrate-resistant acid phosphatase 5B is a specific and sensitive marker of bone resorption. *Anticancer Res* 2003;23:1027-9.
 112. Janckila AJ, Nakasato YR, Neustadt DH, Yam LT. Disease-specific expression of tartrate-resistant acid phosphatase isoforms. *J Bone Miner Res* 2003;18:1916-9.
 113. Mose S, Menzel C, Kurth AA, Obert K, Breidert I, Borowsky K, Bottcher HD. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b as serum marker of bone metabolism in cancer patients. *Anticancer Res* 2003;23:2783-8.
 114. Mose S, Menzel C, Kurth AA, Obert K, Ramm U, Eberlein K et al. Evaluation of tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP) 5b as bone resorption marker in irradiated bone metastases. *Anticancer Res* 2005;25:4639-45.
 115. Percival RC, Urwin GH, Harris S, Yates AJ, Williams JL, Beneton M, Kanis JA. Biochemical and histological evidence that carcinoma of the prostate is associated with increased bone resorption. *Eur J Surg Oncol* 1987;13:41-9.
 116. Urwin GH, Percival RC, Harris S, Beneton MN, Williams JL, Kanis JA. Generalised increase in bone resorption in carcinoma of the prostate. *Br J Urol* 1985;57:721-3.
 117. Costa L, Demers LM, Gouveia-Oliveira A, Schaller J, Costa EB, de Moura MC, Lipton A. Prospective evaluation of the peptide-bound collagen type I cross-links N-telopeptide and C-telopeptide in predicting bone metastases status. *J Clin Oncol* 2002;20:850-6.
 118. Christenson RH. Biochemical markers of bone metabolism: an overview. *Clin Biochem* 1997;30:573-93.
 119. Cook RJ, Coleman R, Brown J, Lipton A, Major P, Hei YJ et al. Markers of bone metabolism and survival in men with hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:3361-7.
 120. Coleman RE, Major P, Lipton A, Brown JE, Lee KA, Smith M et al. Predictive value of bone resorption and formation markers in cancer patients with bone metastases receiving the bisphosphonate zoledronic acid. *J Clin Oncol* 2005;23:4925-35.
 121. Pectasides D, Nikolaou M, Farmakis D, Kanakis I, Gaglia A, Kountourakis P et al. Clinical value of bone remodelling markers in patients with bone metastases treated with zoledronic acid. *Anticancer Res* 2005;25:1457-63.
-

-
122. Brown JE, Cook RJ, Major P, Lipton A, Saad F, Smith M et al. Bone turnover markers as predictors of skeletal complications in prostate cancer, lung cancer, and other solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 2005;97:59-69.
 123. Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Osteoprotegerin production by human osteoblast lineage cells is stimulated by vitamin D, bone morphogenetic protein-2, and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;250:776-81.
 124. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* 1999;25:255-9.
 125. Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S, Riggs BL. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromal-osteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 2000;141:4768-76.
 126. Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 1999;140:4382-9.
 127. Hofbauer LC, Heufelder AE. Clinical review 114: hot topic. The role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in the pathogenesis and treatment of metabolic bone diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2355-63.
 128. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA* 2004;292:490-5.
 129. Keller ET. The role of osteoclastic activity in prostate cancer skeletal metastases. *Drugs Today (Barc)* 2002;38:91-102.
 130. Goltzman D. Mechanisms of the development of osteoblastic metastases. *Cancer* 1997;80:1581-7.
 131. Brown JM, Vessella RL, Kostenuik PJ, Dunstan CR, Lange PH, Corey E. Serum osteoprotegerin levels are increased in patients with advanced prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:2977-83.
 132. Perkel VS, Mohan S, Herring SJ, Baylink DJ, Linkhart TA. Human prostatic cancer cells, PC3, elaborate mitogenic activity which selectively stimulates human bone cells. *Cancer Res* 1990;50:6902-7.
 133. Ulsperger E, Hamilton G, Raderer M, Baumgartner G, Hejna M, Hoffmann O, Mallinger R. Resveratrol pretreatment desensitizes AHTO-7 human osteoblasts to growth stimulation in response to carcinoma cell supernatants. *Int J Oncol* 1999;15:955-9.
-

-
134. Holen I, Croucher PI, Hamdy FC, Eaton CL. Osteoprotegerin (OPG) is a survival factor for human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:1619-23.
 135. Fizazi K, Yang J, Peleg S, Sikes CR, Kreimann EL, Daliani D et al. Prostate cancer cells-osteoblast interaction shifts expression of growth/survival-related genes in prostate cancer and reduces expression of osteoprotegerin in osteoblasts. *Clin Cancer Res* 2003;9:2587-97.
 136. Shipman CM, Croucher PI. Osteoprotegerin is a soluble decoy receptor for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand and can function as a paracrine survival factor for human myeloma cells. *Cancer Res* 2003;63:912-6.
 137. Malyankar UM, Scatena M, Suchland KL, Yun TJ, Clark EA, Giachelli CM. Osteoprotegerin is an alpha vbeta 3-induced, NF-kappa B-dependent survival factor for endothelial cells. *J Biol Chem* 2000;275:20959-62.
 138. Jung K, Lein M, Von Hosslin K, Brux B, Schnorr D, Loening SA, Sinha P. Osteoprotegerin in serum as a novel marker of bone metastatic spread in prostate cancer. *Clin Chem* 2001;47:2061-3.
 139. Hofbauer LC, Schoppet M. Serum measurement of osteoprotegerin--clinical relevance and potential applications. *Eur J Endocrinol* 2001;145:681-3.
 140. Feuerherm AJ, Borset M, Seidel C, Sundan A, Leistad L, Ostensen M, Faxvaag A. Elevated levels of osteoprotegerin (OPG) and hepatocyte growth factor (HGF) in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2001;30:229-34.
 141. Browner WS, Lui LY, Cummings SR. Associations of serum osteoprotegerin levels with diabetes, stroke, bone density, fractures, and mortality in elderly women. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:631-7.
 142. Jung K, Stephan C, Semjonow A, Lein M, Schnorr D, Loening SA. Serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand as indicators of disturbed osteoclastogenesis in patients with prostate cancer. *J Urol* 2003;170:2302-5.
 143. Szulc P, Hofbauer LC, Heufelder AE, Roth S, Delmas PD. Osteoprotegerin serum levels in men: correlation with age, estrogen, and testosterone status. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:3162-5.
 144. Khosla S, Arrighi HM, Melton LJ, III, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Dunstan C, Riggs BL. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporos Int* 2002;13:394-9.
 145. Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology* 2001;142:2205-12.
 146. Yang M, Burton DW, Geller J, Hillemonds DJ, Hastings RH, Deftos LJ, Hoffman RM. The bisphosphonate olpadronate inhibits skeletal prostate cancer progression in a green fluorescent protein nude mouse model. *Clin Cancer Res* 2006;12:2602-6.
-

147. Alvarez L, Peris P, Guanabens N, Vidal S, Ros I, Pons F et al. Serum osteoprotegerin and its ligand in Paget's disease of bone: relationship to disease activity and effect of treatment with bisphosphonates. *Arthritis Rheum* 2003;48:824-8.
148. Soloway MS, Hardeman SW, Hickey D, Raymond J, Todd B, Soloway S, Moinuddin M. Stratification of patients with metastatic prostate cancer based on extent of disease on initial bone scan. *Cancer* 1988;61:195-202.
149. Ernst DS, Hanson J, Venner PM. Analysis of prognostic factors in men with metastatic prostate cancer. Uro-Oncology Group of Northern Alberta. *J Urol* 1991;146:372-6.

8. Anhang

8.1 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Katharina von Hößlin, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Osteoprotegerin im Serum als Indikator der Knochenmetastasierung beim Prostatakarzinom - ein Vergleich der diagnostischen Validität mit konventionellen Knochenmarkern" selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Hamburg, im August 2007

Katharina von Hößlin

8.3 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Klaus Jung für die Ermöglichung dieser Dissertation durch seine stetige Unterstützung und seine außerordentliche Hilfsbereitschaft und Geduld. Durch seine immerwährend freundliche und konstruktive Beratung hat er sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Seine Arbeitseinstellung und Kompetenz werden mir stets ein Vorbild sein.

Dank auch an Herrn Dr. med. Michael Lein für die Betreuung während des experimentellen Teils dieser Arbeit.

Frau Silke Klotzek danke ich für ihre Hilfe bei der Erlernung der Methoden und ihre fortwährende Unterstützung am Computer. Auch allen anderen Mitarbeiterinnen der urologischen Forschungsabteilung möchte ich meinen Dank aussprechen.

Bei meiner ganzen Familie bedanke ich mich von ganzem Herzen für ihre liebevolle und geduldige Unterstützung in dieser Zeit.