

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar der
Technischen Universität München
(Direktor: Univ. - Prof. Dr. D. Neumeier)

**Diagnostische Effizienz von Knochenstoffwechselfparametern bei Patienten
mit Prostatakarzinom und Knochenmetastasen**

Josef Friedenberger

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ. - Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. P. B. Lupp
2. Univ. – Prof. Dr. R. Hartung
(schriftl. Beurteilung)
2. Univ. – Prof. Dr. J. E. Gschwend
(mündl. Prüfung)

Die Dissertation wurde am 01.06.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 27.09.2006 angenommen.

Für meine Mama

Gliederung

1. Einleitung

- 1.1. Definition und Klassifizierung des Prostatakarzinoms
- 1.2. Aufbau und Bestandteile des Knochens
- 1.3. Knochenumbauprozess
 - 1.3.1 Die Osteoblasten
 - 1.3.2 Die Osteoklasten
 - 1.3.3 Molekulare Steuerung des Knochenremodellings
- 1.4. Uncoupling und Remodelling-Imbalance bei Tumorinfiltration
- 1.5. Kollagenmetabolismus
- 1.6. Biochemische Marker des Knochenumbaus
 - 1.6.1 Marker der Knochenformation
 - Osteocalcin
 - Knochenspezifische alkalische Phosphatase
 - Carboxy- / Aminotermine Kollagen Typ I – Propeptide
 - 1.6.2 Marker des Knochenabbaus
 - Pyridinium Crosslinks
 - Carboxyterminale und Aminotermine Kollagen Typ I – Telopeptide
 - Tartrat-resistente saure Phosphatase
 - Knochen-Sialoprotein

2. Zielsetzung

3. Material und Methoden

- 3.1. Probanden
- 3.2. Studienbegleitende Untersuchungen und Dokumentation
- 3.3. Messung der Knochenstoffwechselfparameter im Serum
 - Osteocalcin
 - Knochenspezifische Alkalische Phosphatase
 - β -CrossLaps im Serum
 - Tartrat-resistente saure Phosphatase
 - Prostataspezifisches Antigen
- 3.4. Datenmanagement und statistische Auswertung

4. Resultate

- 4.1. Probandencharakteristika und Studienverlauf
- 4.2. Mittelwerte der biochemischen Knochenstoffwechselfparameter im Verlauf der Therapie
- 4.3. Mittelwerte der Knochenstoffwechselfparameter im Vergleich zum Metastasentyp
- 4.4. Mittelwerte der Knochenstoffwechselfparameter im Vergleich zum Verlauf der Skelettmetastasierung
- 4.5. Mittelwerte der Knochenstoffwechselfparameter im Vergleich zum Schmerzverhalten
- 4.6. Korrelation der Metastasenanzahl mit den Ausgangswerten der Serumparameter OC, BAP, CTx, TRAcP und PSA

5. Diskussion

- 5.1. Diagnostische Effizienz von Knochenstoffwechselfparametern in aktuellen Studien aus der internationalen Literatur
- 5.2. Diskussion verschiedener Parameter als Kriterium zur Begründung bzw. zum Monitoring einer palliativen Therapie mit Bisphosphonaten
- 5.3. Diskussion der diagnostischen Effizienz der untersuchten biochemischen Parameter
- 5.4. Basalbestimmungen von PSA und BAP als geeignete Möglichkeit zur individuellen klinischen Verlaufskontrolle

6. Zusammenfassung

7. Anhang

Literaturverzeichnis

Abkürzungen

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

Tumorpatienten versterben üblicherweise nicht als Resultat des primären Krebsleidens, sondern in Folge des metastasierenden Prozesses, der sich für gewöhnlich entwickelt. Derlei Absiedlungen können, je nach Lokalisation des Primärherdes und dessen Lagebeziehung zu angrenzenden Strukturen, Lymph- und Blutgefäßen etwa in Leber, Lunge und Gehirn auftreten. Ein Drittel der Tumorpatienten entwickelt Metastasen insbesondere im Skelettsystem. Den höchsten Anteil darunter bilden Patienten mit Karzinomen der Brust mit einem Anteil von 73%, der Lunge von 36% und nicht zuletzt der Prostata von 68% [Demers 1999, S. 1131].

1.1. Definition und Klassifizierung des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom, bei dem es sich zu 97% um ein Adenokarzinom handelt [Riede et al. 1998, S. 374], ist der am häufigsten auftretende maligne Tumor des älteren Mannes [Garnero 2001, S. 187] und nach dem Bronchialkarzinom die zweithäufigste Ursache des Krebstodes beim Mann überhaupt [Wymenga et al. 2001, S. 231]. Die Prostata ist eine nur beim männlichen Geschlecht vorkommende Drüse, die morphologisch aus drei Anteilen besteht [Mikuz et al. 2001, S. 834].

Die Außendrüse ist es nun, wo sich, ganz im Gegensatz zur benignen Prostatahyperplasie, die in der Innendrüse entsteht, die entdifferenzierten Zellen beim Adenokarzinom der Prostata bilden und vermehren. Weil Frühbeschwerden wegen der erst sehr späten periurethralen Ausbreitung und darauf folgenden Harnwegsobstruktion sehr selten sind, infiltriert das tumoröse Gewebe während seiner Ausbreitung zunehmend bisher gesunde Nachbarstrukturen und findet dabei auch Anschluss an perfundierende Systeme wie Blut- oder Lymphgefäße [Riede et al. 1998, S. 374]. Diesen Gesichtspunkt der Expansion des Tumors nutzt auch die sogenannte pTNM - Klassifikation, worunter das Prostatakarzinom versucht wurde einzuordnen, um zu einer einheitlichen internationalen Richtlinie zu gelangen (Tabelle 1). Da sich die frühzeitige Diagnose mit der Möglichkeit einer kurativen Lokaltherapie wegen der oben erwähnten Beschwerdefreiheit als große Schwierigkeit erweist, kommt es bei einem hohen Prozentsatz der betroffenen Patienten zu einer regionalen oder systemischen Absiedlung onkologischer Zellen. Neben einer frühzeitigen Ausbreitung in die Beckenlymphknoten kommt es bevorzugt auch zu einer hämatogenen Metastasierung in Leber und Lunge, in besonderem Maße aber in das Skelettsystem. Dabei beträgt der Anteil derer, die bereits bei Erstvorstellung in der Klinik Knochenmetastasen

aufweisen, 30% [Paul et al. 2000, S. 43] -40% [Miyamoto et al. 1994, S. 909], bei Patienten, die am Prostatakarzinom versterben, gar 80% [Westerhuis et al. 1997, S. 89]. Im Gegensatz zu skelettalen Absiedlungen von Tumoren anderer Herkunft sind diese meist osteoblastischer Natur [Brown et al. 2001, S. 2978, 2981] [de la Piedra et al. 2003, S. 46].

TNM-Klassifikation des Prostata-Karzinoms	
Stadium	Ausbreitung
T1	Klinisch nicht nachweisbarer Tumor
T1a	Ausdehnung des Tumors auf bis zu 5% des resezierten Gewebes
T1b	Ausdehnung des Tumors mehr als 5% des resezierten Gewebes
T1c	Tumor bei Nadelbiopsie entdeckt
T2	Tumor auf Prostata begrenzt
T2a	Tumor auf die Hälfte eines Lappens begrenzt
T2b	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens
T2c	Tumor befällt beide Lappen
T3	Tumor hat die Prostatakapsel durchbrochen/Invasion der Samenblase(n)
T4	Tumor infiltriert Nachbarstrukturen oder -organe z. B. Blasenhal, Sphincter externus, M. levator, Beckenwand
N0	Lymphknoten frei
N1	Befall eines Lymphknotens
N2	Befall mehrerer regionärer Lymphknoten
N3	Fixation befallener regionärer Lymphknoten
N4	Befall entfernter Lymphknoten
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 1: Bühling et al., Allgemeine und spezielle Pathologie, 1988, S. 330

1.2. Aufbau und Bestandteile des Knochens

Der Knochen als einer der Bestandteile des Stütz- und Bewegungsapparates muss bestimmten Anforderungen gerecht werden. Er soll bei einem Minimum an Matrixmaterial maximale Festigkeit bieten, um dem Körper ein Höchstmaß an Flexibilität bei größtmöglicher Stabilität zu ermöglichen. Um diesen Anspruch zu

erfüllen, bildet der Knochen eine spezielle Gerüststruktur aus: Sie wird verwirklicht durch die Kortikalis, die 80% der Knochenmasse ausbildet [Rosenbrock et al. 2002, S. 143], und die Spongiosa. Der Verlauf der Spongiosablöcher entspricht größtenteils den sogenannten Hauptspannungslinien, die sich gemäß den Kraftvektoren der am jeweiligen Knochen wirkenden höchsten Belastung derart ausrichten, dass sie dem Knochen höchste Festigkeit verleihen [Kanis 1994, S. 368].

Diese besondere Festigkeit ist aber auch durch den Aufbau der Extrazellulärsubstanz bedingt: Die Trockensubstanz des ausdifferenzierten Knochens besteht zu etwa 35 % aus organischer Matrix und zu 65% aus anorganischen Mineralien: Dabei setzen sich die organischen Bestandteile zu ungefähr 90% aus Kollagenfasern Typ 1 zusammen. Bei dem Rest handelt es sich um diverse nicht-kollagene Proteine, wie Proteoglykane, Glycosaminoglykane, Osteopontin, Osteocalcin und Fibronectin [Schiebler 1996, S. 195]. Diese Glykoproteine und Proteoglykane weisen durch ihren anionischen Charakter eine hohe Bindungsaffinität für Calcium auf, was für die Kalzifizierung des Knochens von wesentlicher Bedeutung ist. Nun können kollagene Fibrillen nämlich die anorganischen Bestandteile binden, die mit ihren Hauptbestandteilen Kalzium und Phosphat vor allem in Form hexagonaler Hydroxylapatitkristalle (85%) organisiert sind und zusammen mit Calciumcarbonat (6 - 10%) einerseits für die Härte des Knochens sorgen und andererseits den Knochen in die Lage versetzen, als Speicherorgan für den Calcium- und Phosphathaushalt zu fungieren [Beck 2003, S. 2f].

1.3. Knochenumbauprozess

Knochengewebe ist eine dynamische Struktur, die, von metabolischen Vorgängen gesteuert, konstanten Umwandlungs- und Umstrukturierungsprozessen unterworfen ist, wodurch im Zeitraum eines Jahres etwa 3 - 10% der Knochenmasse eines Menschen erneuert werden kann [Rosenbrock et al. 2002, S. 143]. Es unterliegt einer ständigen Anpassung an die mechanische Belastung und reagiert in einem Vorgang, der als „bone remodelling“ bezeichnet wird, auf die gestellten Anforderungen. Vermittelt wird dieser Knochenumbau zum Einen durch Osteoblasten, die im Sinne des Knochenaufbaus für die Synthese sowohl der organischen als auch der anorganischen Bestandteile der Knochengrundsubstanz verantwortlich sind, zum Anderen durch Osteoklasten, die durch diverse lysisch-enzymatische Prozesse für die Knochenresorption sorgen [de la Piedra 2003, S. 46]. Wichtig zu erwähnen ist, dass beide Zelltypen einen unterschiedlichen Gewebsursprung haben: Während sich die Osteoblasten aus dem pluripotenten embryonalen Mesenchym differenzieren, gehen die Osteoklasten aus

Zellen der körpereigenen Abwehr, den Monozyten, hervor, die aus dem Knochenmark über den Blutweg in den Knochen einwandern und sich dort umwandeln.

1.3.1. Die Osteoblasten

Die basophilen Osteoblasten sind als Zellen mit reichhaltiger Proteinbiosynthese dicht angefüllt mit retikulärem endoplasmatischem Retikulum und einem gut entwickelten Golgi-Apparat. Ihre Differenzierung unterliegt komplexen Steuerungsmechanismen, wobei der core binding factor alpha (Cbfa1) als Transkriptionsfaktor in Versuchen an humanen Zellkulturen eine wichtige Stellung in der Proliferation einnimmt [Lee et al. 1999, S. 121ff] [Wang et al. 1999, S. 888ff]. Eine Beteiligung an der Differenzierung zum Osteoblasten ist bisher bei osteotropen Hormonen, wie Parathormon oder Vitamin D-Hormon, aber auch bestimmten Wachstumsfaktoren nachgewiesen worden [Logothetis et al. 2005, S. 22ff].

Im aktiven Zustand sind sie in Form sogenannter „lining cells“ kettenförmig und durch feine Zytoplasmafortsätze verbunden an der Oberfläche von Knochenbälkchen aufgereiht und durch ihren polaren Aufbau in der Lage, ihre Hauptsyntheseprodukte Kollagen Typ I, nicht-kollagene Proteine, aber auch Mineralien direkt an den wachsenden Knochen anzulagern [Schiebler et al. 1996, S. 191]. Die anorganischen Bestandteile werden dabei als Inhalt von Matrixvesikeln abgegeben, der sich auf den Kollagenfasern ablagert und auskristallisiert. Dabei bilden sich zunächst nadelförmige, intrafibrilläre Kristalle aus, die sich später durch interfibrilläre Vernetzung überwiegend zu Hydroxylapatit ausbilden, dem endgültigen mineralischen Bestandteil des Knochens [Ducy et al. 2000, S. 1502] [Schiebler et al. 1996, S. 195].

1.3.2. Die Osteoklasten

Ausdifferenzierte Osteoklasten sind große, stark verzweigte, mehrkernige Riesenzellen und besitzen als Gegenspieler der Osteoblasten offenbar die Fähigkeit, Knochengrundsubstanz abzubauen. Ihre Bildung wird gefördert durch Parathormon [Liu et al. 1998, S. 1960f], Prostaglandin E₂ [Sakuma et al. 2000, S. 225] oder Vitamin D-Hormon [Takeda et al. 1999, S. 1007]. Zur Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten ist jedoch ein interzellulärer Kontakt zwischen Osteoblasten und Präosteoklasten nötig, da an den Osteoklasten selbst keine PTH- oder Calcitriolrezeptoren vorhanden zu sein scheinen [Liu et al. 1998, S. 1960f] [Okada et al. 2002, S. 492].

Zur Erfüllung ihrer Aufgabe liegen sie meist in Knochenvertiefungen, den Howship-Lakunen, wobei ihre Oberfläche durch zahlreiche Fältelungen und Einbuchtungen der Zellmembran auf der dem Knochen zugewandten Seite („ruffled boarders“) stark vergrößert ist [Schiebler 1996, S. 193] [Teitelbaum 2000, S. 1506].

Bei der Auflösung der Knochen kommt vor allem Enzymen, insbesondere sauren Hydrolasen, Metalloproteinasen, Kathepsin K und tartratesistenter saurer Phosphatase (TRACP) spezielle Bedeutung zu: Nach deren Synthese werden sie im Golgi-Apparat in primäre Lysosomen verpackt und exocytotisch in den extrazellulären Raum abgegeben. Dort liegt zudem ein saures Mikromilieu vor, das durch HCl – gebildet von H⁺ - Ionen der in Osteoklasten vorliegenden Carboanhydrase und Cl⁻ – erzeugt wird und für die Lösung der Mineralstoffe aus dem Knochen sorgt. Die Matrixabbauprodukte werden schließlich durch Endocytose über die sogenannten „ruffled borders“, unregelmäßige, der Oberflächenvergrößerung dienende Auffaltungen in die Zelle eingeschleust, zur weiteren Degradation mit sekundären Lysosomen fusioniert und über die basolaterale Membran sezerniert [de la Piedra 2003, S. 52] [Teitelbaum 2000, S. 1506] [Schiebler et al. 1996, S. 194].

1.3.3. Molekulare Steuerung des Knochenremodellings

Die Mechanismen dieser nebeneinander ablaufenden Umbauprozesse sind durch wechselseitige Hormon- und Zytokininteraktionen eng miteinander gekoppelt (coupling). Das Remodelling verläuft zyklisch, wobei sich die genannten korrespondierenden Zellen in Form der sogenannten basic multicellular unit (BMU) zu einer Stoffwechseleinheit zusammenfinden. Induziert wird der Prozess durch die Rekrutierung neuer beziehungsweise die Aktivierung reifer Osteoklasten. Unter dem Einfluss von osteoblastärer GM-CSF entwickeln sich aus dem hämatopoetischen Kompartiment stammende pluripotente Vorläuferzellen über verschiedene Präosteoklastenformen zum reifen Osteoklasten. Darüber hinaus scheint auch RANK (Receptor Activator of NF-κB), ein transmembranöser Rezeptor aus der TNF-Familie, eine wichtige Rolle sowohl bei der Ausdifferenzierung und Fusionierung von Präosteoklasten, als auch der Aktivierung reifer Osteoklasten zu haben. RANK wird, unter anderem durch die Induktion von GM-CSF, auf der Oberfläche von Osteoklastenvorläufern, sein entsprechender Ligand RANKL demgegenüber auf Präosteoblasten exprimiert, um hierdurch die Osteoklastenaktivität modulieren zu können. Kommt es nämlich nun zu einer Bindung von RANKL an seinen Rezeptor RANK, führt dies über die Aktivierung spezieller intrazellulärer enzymatischer Prozesse zur Stimulation der Osteoclastogenese.

Daneben ist als weitere Komponente noch das ebenfalls von Osteoblasten gebildete Osteoprotegerin (OPG), ein Glykoprotein mit inhibitorischer Wirkung auf Osteoklasten, in die Regulation des Knochenremodellings involviert. OPG blockiert in seiner Eigenschaft als löslicher „Decoy“-Rezeptor die Interaktion der beiden Moleküle RANK und RANKL und neutralisiert hierdurch deren biologische Wirkung [Keck et al. 2003, S. 8ff] [Schoppet et al. 2002, S. 549f] [Brown et al. 2001, S. 2977ff].

Ist nun eine bestimmte Knochenmenge resorbiert worden, müssen die Osteoblasten mit der Neusynthese von Knochen antworten, um den vorangehenden Substanzverlust auszugleichen [Edelson et al. 1998, S. 96]. Dies erfordert die Kopplung der Osteoneogenese an den Knochenabbau, die über Faktoren verwirklicht wird, die die entsprechende Information von den Osteoklasten auf die Osteoblasten übertragen. Dabei kommen unter anderem TGF β (transforming growth factor), IGF1 (insulin-like growth 1), PDGF (platelet derived growth factor) oder etwa VEGF (vascular endothelial growth factor) in Betracht [Logothetis et al. 2005, S. 22f]. Außerdem nehmen auch einige systemisch wirkende Faktoren - darunter beispielsweise Parathormon, Vitamin D, Somatostatin, Calcitonin und Östrogene - Einfluss auf den Knochenstoffwechsel.

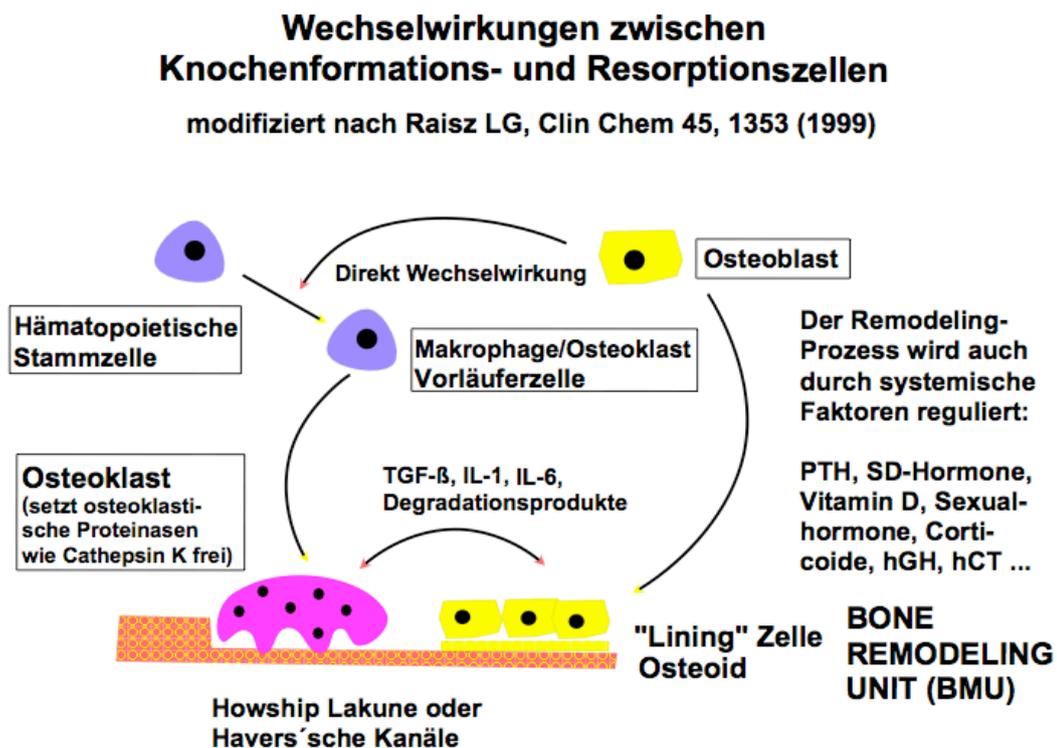


Abb. 1.3.3. Wechselwirkungen und Einflussfaktoren beim Knochenremodeling (nach Raisz, L. G., Clin Chem 45 (1999) 1353)

1.4. Uncoupling und Remodelling-Imbalance bei Tumorinfiltration

Im gesunden Knochen befinden sich diese Abläufe in einem stabilen Gleichgewicht, um unter dem Einfluss von kontinuierlich wirkenden Biege- und Druckbeanspruchungen eine maximale Belastbarkeit erreichen zu können. In pathologischen Situationen hingegen, bei knöchernen Metastasen eines Prostatakarzinoms etwa, kann eine Störung dieser Balance resultieren und, wenn der Abbau gegenüber dem Aufbau überwiegt, ein Verlust an Knochensubstanz [de la Piedra 2003, S. 46] [Wymenga et al. 2001, S. 231].

Günstige Faktoren, wie etwa die ausgezeichnete Durchblutung des Knochenmarkraumes, die Fenestrierung des Endothels und die fehlende Basalmembran in den Sinusoiden des Knochenmarks, erleichtern es gewebefremden Tumorzellen, in die Knochensubstanz einzudringen [Keck et al. 2003, S. 8]. Dort angekommen ist es ihnen möglich, durch lokale Freisetzung diverser Zytokine, Interleukine und Wachstumsfaktoren mit den dort ansässigen normalen Knochenzellen in Wechselwirkung zu treten [de la Piedra 2003, S. 46]. Dabei destruieren sie Knochensubstanz nicht direkt, vielmehr scheinen die neoplastischen Absiedlungen über die Sekretion bestimmter Metaboliten dieselben Prozesse in Gang zu setzen wie beim physiologischen Knochenumbau. Solide Tumoren und Myelomzellen etwa fördern die Expression von RANKL durch die Freisetzung von PTHrP (parathyroid hormone related peptide), IL-1, IL-6 und TNF- β und deren Interaktion mit Osteoblasten. Durch die nachfolgende Stimulierung der Osteoklastenaktivität kommt es zur Osteolyse [Guise 2000, S. 2895] [Keck et al. 2003, S. 9f] [Logothetis et al. 2005, S. 24] [Orr et al. 2000, S. 2913]. Beim Prostatakarzinom hingegen wird vermehrt TGF- β und Endothelin-1 ausgeschüttet, was über eine vermehrte Produktion von OPG eher die Bildung osteoblastischer Knochenläsionen zur Folge hat [Keck et al. 2003, S. 9f]. Den gleichen Effekt scheinen weitere von Tumorzellen produzierte Moleküle zu haben, die einerseits stimulierenden (IGF, PDGF, VEGF, BMP (bone morphogenetic protein)), andererseits - durch Modifizierung der Hormonpräsenz - aber auch regulierenden Einfluss (PSA) auf die Osteoblastenfunktion haben können [Logothetis et al. 2005, S. 23f] [Orr et al. 2000, S. 2914].

Diese Entkoppelung von Knochenresorption und -neubildung durch ein Ungleichgewicht osteoprotektiver und osteodestruktiver Faktoren, der sogenannten „Remodelling-Imbalance“, wird als „uncoupling“ bezeichnet [Keck et al. 2003, S. 8].

1.5. Kollagenmetabolismus

Kollagen ist mit einem Anteil von 30% das häufigste Protein des menschlichen Körpers, wobei gegenwärtig knapp 20 verschiedene Arten differenziert werden. Deren Fasern, die unverzweigt vorliegen, haben einen Durchmesser von 1 – 20 μm und setzen sich aus Kollagenfibrillen (Durchmesser 0,3 – 0,5 μm) zusammen. Die Mikrofibrillen, die nur noch elektronenmikroskopisch erkennbare nächstkleinere Baueinheit, bestehen schließlich aus Tropokollagen – gestreckten Molekülen mit einer durchschnittlichen Länge von 300 nm [Schiebler 1996, S. 154]. Bei Kollagen Typ I, der im Körper am häufigsten vorkommenden und der im Knochen fast ausschließlich vorliegenden Kollagenart, ist jedes Tropokollagenmolekül aus drei helixartig umeinander gewundenen Polypeptidketten aufgebaut, zwei gleichartigen α_1 - und einer α_2 -Kette mit anderer Aminosäuresequenz [Diegelmann 2001, S. 177] [Mallinak et al. 1998, S. 111]. Außer den helikalen Anteilen weisen Tropokollagene auch nichthelikal angeordnete „Telo peptide“ auf, 16 – 25 Aminosäuren lange Abschnitte sowohl am N- (NTX) als auch am C-terminalen Ende (CTX bzw. ICTP). Die wichtigsten Aminosäuren des Kollagens sind Glycin, Prolin und Hydroxyprolin.

Bei der Fibrillogenese, die sich zunächst intrazellulär unter anderem in Osteoblasten abspielt, werden an den Ribosomen des rER Polypeptid- α -Ketten (Pro- α -Ketten) mit spezifischer Aminosäuresequenz gebildet. Dieses Prokollagen enthält an beiden Enden neben den Telo peptiden sogenannte Registerpeptide, die als „C- bzw. N-terminal collagen-type-I propeptides“ (PICP bzw. PINP) bezeichnet werden. Es handelt sich hierbei um nicht-helikale Proteine, die die Aufgabe haben, das Molekül in Lösung zu halten, um zum Einen dessen intrazelluläre Transportierfähigkeit zu den verschiedenen Zellstrukturen zu erhalten und zum Anderen ihre vorzeitige Präzipitation zu verhindern. Nach diversen Hydroxylierungen der Prolyl- und Lysylreste und darauffolgender Glykosylierung sorgen sie außerdem für eine regelrechte Anordnung der α -Ketten bei deren Verdrillung zu einer Tripelhelix. Nach der exocytotischen Ausschleusung des Prokollagens werden diese Registerpeptide extrazellulär durch eine Prokollagenpeptidase unter Bildung von Tropokollagen abgespalten. Daraufhin können sich im nächsten Schritt, dem sogenannten „Crosslinking“, die nun unlöslich gewordenen Moleküle durch kovalente Quervernetzung und parallele Aggregation zu Mikrofibrillen zusammenfinden und dem Kollagen dadurch zu seiner Zugfestigkeit verhelfen. Möglich wird diese Formierung der Fibrillen aber erst dadurch, dass bei enzymatischer Desaminierung von Lysin- und Hydroxylysinresten durch die Lysyloxidase Ladungsschwerpunkte entstehen, deren Polarität sowohl die intra- und als auch die interfibrilläre Verknüpfung stabilisiert [Diegelmann 2001, S. 179f] [Pedersen et al. 1998, S. 119f] [Schiebler 1996, 156f]. Das

dabei wirkende Element, der Crosslink, wird ausgebildet von Verbindungen mit einer Pyrrol- oder Pyridiniumstruktur, wobei vor allem Letztere in Form von Deoxypyridinolin (DPD) und Pyridinolin (PYD) bei der Messung des Kollagenumsatzes größere Bedeutung erlangt haben.

CROSS-LINKING PATHWAYS IN BONE COLLAGEN

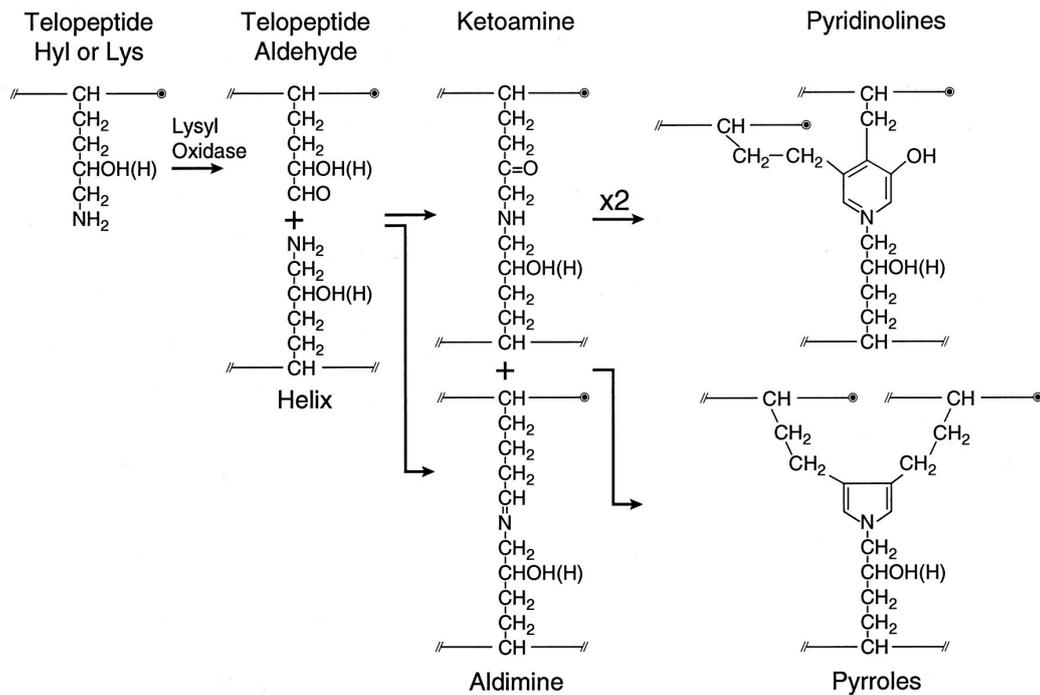


Abb. 1.5. Die mechanische Festigkeit von Kollagen Typ I Fibrillen wird durch intermolekulare Crosslinks gewährleistet (Hanson and Eyre, J Biol Chem 271 (1996) 26508)

Im Knochen werden die Kollagenfasern schließlich entsprechend der auf ihn einwirkenden Hauptbelastung ausgerichtet und in eine mineralische Grundsubstanz eingebettet, die sich hauptsächlich aus Hydroxylapatit zusammensetzt.

1.6. Biochemische Marker des Knochenbaus

Durch die ständigen Umbauvorgänge am und im Knochen werden als Knochenmarker bezeichnete Substanzen freigesetzt, die in Serum und Urin nachweisbar sind. Knochenmarker sind vor allem Enzyme und Moleküle der am Skelettstoffwechsel

beteiligten Zellen und Matrixbestandteile, die während des Remodellings in den Blutkreislauf abgegeben werden [Price 1998, S. 163].

Differenziert wird dabei in Marker, die charakteristisch sind für den Knochenaufbau, sogenannte Formationsmarker, und Marker des Knochenabbaus, die als Resorptionsmarker bezeichnet werden.

In der Klinik wird zur Veranschaulichung pathologischer Umbauvorgänge im Knochen ein zunehmend größeres Augenmerk auf Resorptionsmarker gelegt. Es ist erwiesen, dass der Prozess des Knochenmetabolismus in der Aktivierung von Osteoklasten seinen Anfang nimmt und erst im Anschluss daran die Knochenformation initiiert wird. Dazwischen liegt jedoch eine Verzögerungsphase von 3-6 Monaten, innerhalb derer nur resorptive Knochenparameter in Serum und Urin freigesetzt werden und deshalb eine frühere Indikation zur Quantifizierung überschießenden Remodellings darstellen. [Mallinak et al. 1998, S. 111].

1.6.1. Marker des Knochenformation

Osteocalcin

Osteocalcin, auch Knochen-GLA-Protein genannt, ist ein kleines nicht-kollagenes Protein der Knochenmatrix, das aus 49 Aminosäurenresten aufgebaut ist und ein Molekulargewicht von 5000 Dalton besitzt. Die Bildung von Osteocalcin durch Osteoblasten wird durch 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol kontrolliert, seine posttranslationale Modifikation ist Vitamin K-abhängig [Woitge et al. 2001, S. 687]. Osteocalcin vermag nach Modifizierung durch γ -Carboxyglutaminsäure an bis zu drei Stellen Hydroxylapatit in der extrazellulären Matrix zu binden, wodurch ihm eine wichtige Rolle bei der Mineralisation des Knochens zukommt [Gundberg 1998, S. 128] [Ureña et al. 1998, S. 162] [Woitge et al. 2001, S. 687].

Die Synthese von Osteocalcin erfolgt ausschließlich durch Osteoblasten, weshalb es als spezifischer Marker für die osteoblastische Aktivität bei Störungen der Ossifikation dient. Das neu synthetisierte Osteocalcin wird zu etwa 80% sofort nach der Freisetzung in den Knochen eingebaut, während der verbleibende Rest in die Blutzirkulation gelangt und dort mittels Immunoassay nachgewiesen werden kann. Das intakte Molekül repräsentiert dabei einen Anteil von annähernd einem Drittel des beim Erwachsenen zu findenden Plasmaspiegels. Ein Drittel liegt in Form kleinerer Bruchstücke vor und ein weiteres als große, bis zu 43 Aminosäuren bestehende N-terminale Midmoleküle. Zudem unterliegt intaktes Osteocalcin im Blut einer proteolytischen Spaltung unter Bildung eben dieser N-terminalen Fragmente, so dass

die dortige Halbwertszeit bei Raumtemperatur relativ kurz ist [Ureña et al. 1998, S. 162] [Fontana et al. 2000, S. 2953f].

Da mittlerweile ein Immunoassay zur Verfügung steht, der zwei monoklonale Antikörper verwendet, die gegen Epitope auf dem N-Mid Fragment und dem N-terminalen Ende des Moleküls gerichtet sind, ist die Osteocalcinbestimmung gegenwärtig unabhängig vom instabilen C-terminalen Fragment und gewährleistet dadurch konstante und objektivierbare Messergebnisse. Histomorphometrische Untersuchungen haben gezeigt, dass der Serum-Osteocalcin Spiegel mit steigender Mineralisierung der Knochensubstanz und zunehmendem Grad der Osteoblastendifferenzierung in enger Korrelation steht [Gundberg 1998, S. 132].

Knochenspezifische alkalische Phosphatase

Alkalische Phosphatase ist ein ubiquitär im Körper vorkommendes Enzym, das jedoch zu über 95% aus Leberzellen und Osteoblasten stammt. Deshalb ist dieses ins Serum freigesetzte Protein bei Personen mit gesunder Leberfunktion auch ein äußerst nützlicher Marker, um die Aktivität der Knochenbildung darzustellen [Woitge et al. 2001, S. 687]. In den letzten Jahren hat sich durch die Entwicklung von Assays, die sich auf monoklonale Antikörper stützen, jedoch gezeigt, dass die knochenspezifische Isoform der alkalischen Phosphatase (BAP) eine weit höhere Spezifität in der Bestimmung osteoblastärer Zellaktivität aufweist [Akimoto et al. 1998, S. 100, 102f]. BAP ist ein tetrameres Protein mit einer Halbwertszeit von 1-2 Tagen, das über einen carboxy-terminalen Glykan-Phosphatidyl-Inositol Anker an die äußere Zellmembran von Osteoblasten assoziiert ist und sich von den anderen Isoformen aus Dünndarm und Leber nur durch posttranslationale Modifikationen unterscheidet [Demers et al. 2000, S. 2921] [Kress 1998, S. 140] [Sokoll et al. 1997, S. 625]. Trotz dieser Ähnlichkeit wird den neuen Ostase-Immunoassays in zahlreichen Studien eine mit 15-20% nur geringe Kreuzreaktivität mit den anderen, demselben Genprodukt entstammenden, Phosphataseformen zugesprochen [Fontana et al. 2000, S. 2953]. Aus diesem Grund hat die BAP möglicherweise zukünftig eine größere Rolle bei der Veranschaulichung knochenspezifischer Prozesse oder des therapeutischen Fortschritts palliativer Methoden der Tumorbekämpfung.

Carboxy-/Aminoterninale Kollagen Typ I-Propeptide

Kollagen Typ I ist die hauptsächlich im Knochen vorkommende Eiweißart. Es wird, wie in Kapitel 1.5. beschrieben, zunächst intrazellulär als Vorläuferprotein mit großen C- und N-terminalen Propeptidregionen synthetisiert, die in die Verknüpfung beziehungsweise Trimerisierung der Kollagenmoleküle involviert sind. Erst im Extrazellulärraum werden diese Propeptide nach Prozessierung im Golgi-Apparat proteolytisch abgespalten, wodurch die spezifische Zusammenlagerung der Kollagenfibrillen untereinander in ihre endgültige Form schließlich erfolgen kann [Caulfield 1998, S. 151f]. Weil hierbei sowohl PICP (Carboxy-terminales Kollagen Typ I-Propeptid) als auch PINP (Amino-terminales Kollagen Typ I-Propeptid) in die Zirkulation freigesetzt werden, sind beide Parameter im Blut von Patienten mit verstärktem Knochenumsatz über das normale Maß hinaus erhöht und über Immunoassays quantifizierbar [Demers et al. 2000, S. 2921] [Withold et al. 1995, S. 479f]. Dabei ist PICP bei einem Molekulargewicht von 100 kDa mit über Disulfidbrücken verbundenen trimeren Glykoproteinen assoziiert und wird, wie auch das kleinere, in Anteilen als Tripelhelix vorliegende PINP (65 kDa), nach einer kurzen Halbwertszeit von nur wenigen Minuten durch die Leber metabolisiert [Caulfield 1998, S. 152] [Demers et al. 2000, S. 2921]. Da sie bei der Darstellung knochenspezifischer Prozesse jedoch über eine geringere Sensitivität als BAP oder OC verfügen, sind sie für eine diesbezügliche diagnostische Anwendung wenig geeignet.

1.6.2. Marker des Knochenabbaus

Pyridinium Crosslinks

Neu geformte Kollagenmoleküle aggregieren im Extrazellulärraum in Rahmen einer speziellen Ordnung zu Fibrillen, die durch intra- und intermolekulare Crosslinks zwischen den jeweiligen α -Ketten gefestigt werden. Diese Crosslinks resultieren aus der oxidativen Desaminierung von gewissen Lysyl- und Hydroxylysylresten der Tropokollagene durch das Enzym Lysyloxidase im Rahmen der posttranslationalen Modifizierung. Auf diese Weise können die entstehenden Aldehyde stufenweise mit anderen (Hydroxy-)Lysinresiduen oder Aldehyden aus benachbarten Kollagenmolekülen aggregieren, um dadurch eine Vielzahl von bi- bis tetrafunktionalen Crosslinks zu schaffen. Die in quantitativer Hinsicht wichtigsten Parameter sind dabei trisubstituierte Pyrrole, die sogenannten Ehrlich-Chromogene, und Pyridinium-Crosslinks – Pyridinolin (PYR) und Deoxypyridinolin (DPD) [Demers et al. 2000, S.

2920] [Mallinek et al. 1998, S. 111f] [Pedersen et al. 1998, S. 119f] [Wymenga et al. 2001, S. 231]. PYR findet man im Knochen, Knorpel und vielen Weichteilgeweben, während DPD hauptsächlich im Knochenkollagen vorliegt [Pecherstorfer et al. 1995] [Fraser 1998, S. 103]. Im erwachsenen Knochen beträgt die PYR:DPD-Ratio im Gegensatz zu anderen Geweben 3,5:1 [Mallinak et al. 1998, S. 112].

Wenn nun Kollagen Typ I durch Osteoklasten degradiert wird, werden auch diese Crosslinks abgebaut und in die Zirkulation freigesetzt. Da sie dort keiner weiteren Metabolisierung mehr unterliegen, sondern sowohl frei vorliegend (40%) als auch an Peptide gebunden (60%) in der Niere filtriert und ausgeschieden werden, können sie in Serum und Urin mittels HPLC oder Enzymimmunoassay nachgewiesen werden. Insbesondere DPD wegen seiner größeren Spezifität, kann hiermit den dynamischen Prozess des Knochenabbaus im Rahmen des Knochenremodellings darstellen [Demers et al. 2000, S. 2920] [Pedersen et al. 1998, S. 119f] [Wymenga et al. 2001, S. 232].

Carboxyterminale (CTx) und Aminoternale (NTx) Kollagen Typ I Telopeptide

Das Grundelement von Kollagen Typ I enthält zu großen Teilen Aminosäuren, die in Form von drei nebeneinander vorliegenden α -Ketten miteinander zu einer Tripelhelix verdrillt sind. Daneben finden sich aber sowohl am C-terminalen (CTx) als auch am N-terminalen Ende (NTx) dieser Peptidketten nichthelikale Residuen, die sogenannten Telopeptide. Die C-Telopeptide etwa bestehen jeweils aus einer Sequenz von circa 26 Aminosäuren und favorisieren die α_1 -Kette, während sich N-terminale Reste bevorzugt in α_2 -Ketten integrieren [Pedersen et al. 1998, S. 119f] [Mallinak et al. 1998, S. 112]. An diese Peptidregionen, insbesondere an die darin integrierten Hydroxylysine, werden nun die oben beschriebenen Pyridinium-Crosslinks gebunden, wodurch benachbarte Mikrofibrillen untereinander vernetzt werden können [Fontana et al. 2000, S. 2955] [Pedersen et al. 1998, S. 119f]. Dabei äußert sich die intermolekulare Bindung dergestalt, dass die Seitenarme der Pyridinoline jeweils das N- oder C-terminale Telopeptid einer α -Kette mit der Helixdomäne einer anderen verknüpft [Mallinak et al. 1998, S. 112]. Die DPD-Crosslinks sind dabei zu zwei Dritteln an die N-terminalen Telopeptide assoziiert und nur zu einem an C-terminale Sequenzen [Mallinak et al. 1998, S. 112]. Wird Kollagen nun während erhöhter Knochenresorption verstärkt destruiert, kommt es neben der Degradation freier Telopeptide auch zu einer vermehrten Freisetzung der Crosslinks in freier und in an die noch peptidgebundene Form. [Fontana et al. 2000, S. 2954] [Ureña 1998, S. 165]. Ein Beispiel für Letztere ist ICTP, eine Struktur, die aus zwei C-terminalen Telopeptiden und einem dritten Peptid

besteht, das eine helikale Domäne eines anderen Kollagen Typ I-Molekül bindet [Risteli 1993, S. 638f].

Zur Bestimmung der Aktivität des Knochenabbaus scheint aber die carboxy-terminale Form, ein Abbauprodukt aus einer Abfolge von acht Aminosäuren, besonderes Interesse auf sich zu ziehen [de la Piedra 2003, S. 48]. Der gegenwärtig empfohlene Test, der β -CrossLaps-Assay, greift auf die Messung von β -CTx im Serum zurück: Bei der Alterung des Knochens wird die in C-terminalen Telopeptiden vorkommende α -Asparaginsäure auf Höhe einer Asp-Gly Sequenz in die entsprechende β -Isoform umgewandelt und kann bei Degradation von Knochensubstanz im Serum quantitativ erfasst werden [Pedersen 1998, S. 120].

Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAcP)

Saure Phosphatasen sind lysosomale Enzyme, die von Osteoklasten, der Prostata, dem Uterus und den blutbildenden Organen gebildet werden. Dabei wird das knochenspezifische Isoenzym 5b der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase, das außerdem noch von Tumorzellen bei der Haarzelleukämie freigesetzt wird, als ein potentieller Marker beschrieben, um den Grad der Knochenresorption bei unterernährten Kindern, primärem Hyperparathyreoidismus, postmenopausalen osteoporotischen Frauen und Patienten mit tumorassozierten Knochenmetastasen darzustellen [Caulfield 1998, S. 151] [Ureña 1998, S. 164f]. Seine physiologische Rolle beim Knochenabbau ist noch nicht vollständig verstanden. Man geht jedoch davon aus, dass die von HCl und Proteasen aufgeschlossenen Matrixabbauprodukte nach endocytotischer Aufnahme aus dem Extrazellulärraum mit Vesikeln fusioniert werden, die TRAcP 5b enthalten. An dieser Stelle kann TRAcP nun vermehrt reaktive Sauerstoffradikale bilden, um für eine weitere Demineralisierung der Matrixresiduen und Kollagene zu sorgen [Halleen 1999, S. 22908f]. TRAcP dephosphoryliert dabei eine Vielfalt an Proteinen, wie etwa Osteopontin und das Sialopontin [Ureña 1998, S. 165]. Während dieser Vorgänge werden messbare Portionen dieser Phosphatase auch ans Serum abgegeben [Caulfield 1998, S. 151], weshalb im Rahmen eines ELISA Antikörper gegen TRAcP 5b entwickelt werden konnten, die imstande sind, erhöhte Werte bei knochenresorptiven Prozessen quantitativ erfassen [Ureña 1998, S. 165].

Knochen-Sialoprotein (BSP)

Sialoprotein, ein nicht-kollagenes Protein, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle im Mineralisierungsprozess des Knochens und weist im Serum bei Krankheiten mit hohem Knochenumsatz wie Hyperparathyreoidismus und Osteoporose erhöhte Werte auf [Fontana et al. 2000]. Mit seiner Molekülgröße von 70-80 kDa hat dieses phosphorylierte Glykoprotein einen Anteil von 5-10% an der nicht-kollagenen extrazellulären Knochenmatrix. Das von Osteoblasten gebildete saure BSP enthält eine Integrin-bindende Arg-Gly-Asp Sequenz, wodurch es von einem spezifischen, durch Osteoklasten exprimierten Vitronectin-Rezeptor, erkannt werden kann. Daher wird davon ausgegangen, dass es eine Rolle spielt bei der Adhäsion von knochenresorbierenden Zellen an die Extrazellulärmatrix [Caulfield et al. 1998, S. 152] [Woitge et al. 2001, S. 344]. Da die Synthese von Sialoprotein, im Gegensatz zu anderen Glykoproteinen wie Osteonectin, relativ auf den Knochen beschränkt ist, wird es in mehreren Studien als ein spezifischer Marker zur Objektivierung einer pathologisch gesteigerten Knochenresorption angesehen [Caulfield et al. 1998, S. 152] [Woitge et al. 2001, S. 344] [Fontana et al. 2000, S. 2955]. Zur Zeit existieren aber keine verlässlichen Immunoassays zur Messung dieses Knochenmarkers.

Schließlich sind mit den schon in Kapitel 1.3. beschriebenen Parametern RANKL und Osteoprotegerin noch zwei weitere Marker in klinischer Erprobung, deren Serumwerte möglicherweise zukünftig bei der quantitativen Bestimmung der Aktivität pathologischer Knochendestruktion eine Rolle spielen könnte.

2. Zielsetzung

Knochenmetastasen treten beim Prostatakarzinom bei über 75 % der betroffenen Patienten auf [Coleman 1997, S. 1591]. Die schnelle Erkennung dieser Absiedlungen ist von großer Wichtigkeit, da sie die Ursache von Frakturen sein können oder ein hohes Krankheitsgefühl in Form von schweren Knochenschmerzen verursachen, die dringend einer möglichst schnellen therapeutischen Intervention bedürfen [Garnero 2001, S. 187].

Um die Metastasen bei der Diagnostik zu verifizieren, ihr Ausmaß einzuschätzen und ihre Entwicklung unter Therapie zu verfolgen, wird bisher auf die Knochenszintigraphie zurückgegriffen, eine Technik, die zwar eine hohe Sensitivität, aber eine niedrige Spezifität aufweist [Cook 2000, S. 131] [de la Pieda 2003, S. 45]. Außerdem stellt sie eine zeitaufwändige und kostenintensive Methode dar, die die Schnelligkeit der skelettalen Reaktion nach Therapie nicht adäquat widerspiegeln kann [Garnero 2001, S. 187]. Aufgrund dieser diagnostischen Trägheit ist es auch sehr schwierig, in geeigneter Weise und vor allem rechtzeitig auf etwaige Änderungen dieser Knochenumbauprozesse zu reagieren. Daher werden zukünftig andere nicht-invasive Parameter benötigt, um das Vorliegen von Knochenmetastasen und deren Entwicklung schneller objektivieren zu können.

Gegenwärtig ist PSA immer noch der verbreitetste [de la Pieda 2003, S. 46] und sensitivste biochemische Marker [Garnero 2000, S. 858], um sowohl den Verlauf des Prostatakarzinoms darzustellen als auch dabei auftretende Knochenmetastasen zu objektivieren [Partin 1994, S. 1363ff] [Garnero 2001, S. 188]. Darüber hinaus ist PSA jedoch nicht imstande, die Effekte palliativer Therapiemethoden zu reflektieren, beispielsweise nach Behandlung hormonrefraktärer Patienten mit Bisphosphonaten [Garnero 2000, S. 858].

Vom Prostatakarzinom stammende Knochenmetastasen sind zumeist osteoblastischer Natur, was sich in einem signifikanten Ansteigen der bei der Knochenformation freigesetzten biochemischen Parameter äußern sollte [Garnero 2001, S. 188] [Pecherstorfer 1995, S. 100ff]. Durch den oben beschriebenen Mechanismus des Coupling beim Knochenumbau bedingt, konnte bei histomorphologischen Analysen aber wiederholt auch ein klarer Beweis für das Vorliegen knochenresorptiver Prozesse erbracht werden [Urwin 1985, S. 722] [Clarke 1991, S. 78].

In dieser erhöhten Knochenresorption liegt die Begründung für die therapeutische Nutzung von Bisphosphonaten. Als potente Inhibitoren der Osteoklastenfunktion sind sie in der Lage, metastatischen Knochenschmerz, bei einer deutlichen Verbesserung

der Lebensqualität, zu reduzieren [Coleman 1996, S. 43ff][Pelger 1998, S. 405ff] und überdies das Skelett vor neuen Läsionen zu bewahren [Garnero 2001, S. 190].

Obwohl in mehreren Studien signifikant erhöhte Werte bei sämtlichen Knochenstoffwechselfparametern im Rahmen metastatischer Knochenumbauprozesse gefunden wurden [Garnero 2000, S. 859][de la Piedra 2003, S. 52], weisen alle eine nur geringe Sensitivität auf [Garnero 2000, S. 859ff]. Dadurch ist ihre Verwendung bei der Diagnostik sekundärer Knochenmetastasierung nach Prostatakarzinom einerseits zwar limitiert, andererseits könnten sie sich möglicherweise zu einem nützlichen Instrument zur Veranschaulichung der Behandlung mit Bisphosphonaten und zur Individualisierung des Therapieschemas entwickeln.

Zielsetzung dieser Arbeit war es daher, Aufschluss über die diagnostische Effizienz von Knochenstoffwechselmarkern bei Patienten mit Prostatakarzinom und Knochenmetastasen zu gewinnen. Die dazu verwendeten Seren und Urine wurden aus dem Patientengut einer Chemotherapiestudie der Urologischen Klinik im Hause rekrutiert. Anhand des Verlaufes von PSA, der Knochenformationsmarker Osteocalcin und BAP und der Resorptionsmarker CTx und TRAcP dieser unter Chemotherapie mit einem Taxotere-Präparat stehenden Patienten, sollte untersucht werden, inwieweit das Verhalten des pathologischen Knochenumbaus mit der Freisetzung der Knochenparameter korreliert. Hierzu wurden sie mit Faktoren wie Therapieerfolg, Metastasentyp, Metastasenanzahl, dem Metastasen- und Schmerzverlauf in Bezug gesetzt, um eine Möglichkeit zu definieren, den Krankheitsverlauf im Hinblick auf eine individuelle und optimierte Therapieentscheidung besser objektivieren zu können.

3. Material und Methoden

3.1. Probanden

Für die vorliegende Studie wurden Teilnehmer einer prospektiven, randomisierten Multicenter - Phase III – Studie der Firma Aventis mit der Studiennummer RP56976V-327 untersucht. Die Studie wurde im Zeitraum zwischen 2000 und 2004 durchgeführt. Darin sollte bei Patienten, die unter einem in die Knochen metastasierten Prostataadenokarzinom leiden, die Schemata einer drei- beziehungsweise einwöchigen Docetaxel-Gabe dem einer Chemotherapie mit Mitoxantrone gegenübergestellt werden. Einschlusskriterien, die zum Mitwirken berechtigten, waren unter anderem das histologisch bewiesene Vorhandensein eines Adenokarzinoms der Prostata, die Refraktärität gegenüber jeglicher Art von Hormontherapie, ansteigende PSA-Werte, sowie einen Karnofsky-Index ≥ 60 . Die Patienten sollten bei Studienbeginn, bei, in Form eines PSA-Anstiegs dokumentierter Krankheitsprogression, eine Lebenserwartung von noch mindestens 3 Monaten aufweisen. Außerdem sollten sie sich zum Zeitpunkt der Randomisierung in einem über sieben Tage währenden stabilen Schmerzzustand befinden; die Herzfunktion, gemessen anhand der LVEF, sollte sich über dem niedrigsten unteren Limit der jeweiligen Klinik befinden, das Blutbild, die Nieren- und Leberfunktionsparameter sollten ebenfalls im Normalbereich liegen. Vorhergegangene Radiotherapie an weniger als 25% des Knochenmarks und chirurgische Versuche waren keine Ausschlussgründe, sofern seit Beendigung der jeweiligen Maßnahme mindestens 4 Wochen vergangen waren.

Kriterien, die eine Teilnahme an dieser Studie ausschlossen, waren systemische Erkrankungen, wie etwa Diabetes mellitus, Krankheiten aus dem rheumatischen Formenkreis, sowie Beschwerden kardialer Genese. Symptomatische Polyneuropathien \geq Grad 2 und Erkrankungen mit cerebraler und leptomeningealer Beteiligung waren ebenso Ausschlussfaktoren, wie auch Malignome, mit Ausnahme von adäquat therapierten spezifischen Hauttumoren, sofern der Patient seit mindestens 5 Jahren beschwerdefrei war.

Nicht erlaubt waren zudem gleichzeitige Behandlungen mit anderen experimentiell angewandten Medikamenten, Antiandrogenen, Bisphosphonaten oder eine vorausgegangene Chemotherapie mit Ausnahme von Estramustinen.

Die Erhebungen für diese Untersuchung fanden in über 100 Zentren weltweit statt, unter anderem auch in der urologischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TU München, woraus das Patientengut für diese experimentelle Studie stammt: 15 Männer, die zum Zeitpunkt ihrer jeweiligen Randomisierung ein Alter zwischen 58 bis 85 Jahren aufwiesen.

3.2. Studienbegleitende Untersuchungen und Dokumentation

Der Studienplan sah für die Probanden eine Blutentnahme jeweils unmittelbar vor ihrer erneuten Docetaxelgabe vor. Dieses Blut wurde daraufhin nach Zentrifugieren in Form von Serum bei einer Temperatur von ca. -20°C eingefroren und ohne Additive bis zur Bestimmung aufbewahrt. Die Blutentnahmen, deren Anzahl je nach Dauer der Therapie beziehungsweise entsprechend der Intervalllänge zwischen den Einzelgaben des oben genannten Chemotherapeutikums von Patient zu Patient erheblich variierte, erfolgten in einem Zeitraum vom März 2001 bis August 2002.

Zur Einordnung der gesammelten Blutwerte und deren Vergleich mit dem klinisch erhobenen Krankheitsfortschritt der Karzinompatienten war des weiteren die Begutachtung der Patientenakten mit den gesammelten Befunden wichtig, insbesondere der Knochenszintigraphie im Hinblick auf die Metastasenanzahl, klinisch-chemischen Werten, Schmerzparametern und verabreichten Antibiosen, sowie die in den Studienprotokollen zeitgleich zu den Blutentnahmen verzeichneten Verläufe. Schmerz wurde jeweils täglich im Verlauf einer Woche vor den Therapiekontrollen beurteilt: Zunächst alle drei Wochen bis zum Studienende und danach jedes weitere Monat im Follow-up wurde die „Present Pain Intensity“ (PPI) nach McGill-Melzack täglich vom Patienten selbst eingeschätzt und dann über die Woche gemittelt. Die Skala bewertet den Schmerz in fünf Stufen von 0 = schmerzfrei bis 5 = vernichtend.

Zu denselben Zeiten wurde auch der genaue Analgetikaverbrauch des Patienten in Form des „Analgetic Score“ (AS) ermittelt. Dieser klassifiziert die Schmerzmittel je nach Substanzklasse und benötigter Dosis mit verschiedenen Punktwerten, um Vergleichbarkeit zu schaffen und den Schmerzverlauf objektivierbar zu machen. So entsprechen beispielsweise 10 mg Morphin 2 Punkten, 325 mg Aspirin einem Punkt. Spricht nun eine Therapie an, indem sie die Schmerzen des Patienten verringert, wird dies als Schmerzantwort bezeichnet. Sie äußert sich durch einen Abfall des PPI beziehungsweise eine Verringerung des AS, wobei definitionsgemäß nur ein Abfall des PPI um mindestens 2 Punkte oder eine Reduktion des AS um 50%, gemessen am Ausgangswert, bei gleich bleibender Schmerzintensität berücksichtigt wird. Schmerzprogression dagegen bezeichnet eine Erhöhung der PPI-Skala um einen Punkt und von AS um 25 %, wiederum gemessen an der Ausgangssituation.

3.3. Messung der Knochenstoffwechselfparameter im Serum

Osteocalcin

Die quantitative Bestimmung von N-MID Osteocalcin im Serum erfolgte anhand eines Elektrochemolumineszenz Immunoassays (ECLIA). Dieser Sandwichimmunoassay ist zur Durchführung an den Roche® Analysenautomaten Elecsys® 1010/2010 und am MODULAR ANALYTICS E170 vorgesehen. Am Klinikum rechts der Isar/München wird routinemäßig der Elecsys® verwendet.

Dabei bilden der Analyt in der Serumprobe, ein biotinylierter monoklonaler N-MID spezifischer Antikörper und ein mit Ruthenium-Komplex markierter monoklonaler N-MID Osteocalcin-spezifischer Antikörper einen Sandwich-Komplex, der über Streptavidin-beschichtete Mikropartikel an die Festphase gebunden wird. Nach Überführung des Testansatzes in die Messzelle wird die ungebundene Substanz entfernt und nach Anlegen einer Spannung die Chemilumineszenz-Emission mit dem Photomultiplier gemessen. Das resultierende Signal ist der Konzentration von Osteocalcin im Serum direkt proportional.

Die Ergebnisse werden anhand einer Kalibrationskurve ermittelt.

Die Referenzbereiche dieses Tests für N-MID Osteocalcin bewegen sich zwischen 14-42 ng/ml bei gesunden Männern im Alter von 30-50 Jahren und zwischen 14-46 ng/ml bei gesunden Männern in der Altersgruppe größer als 50 Jahre (jeweils 5.-95. Percentile).

Die Leistungsmerkmale des Tests wurden, wie folgt, ermittelt:

A. Präzision: Die Intraassayvarianz des Tests beträgt < 4,0% bei 15,5 ng/ml

Die Interassayvarianz des Tests beträgt < 6,5% bei 15,5 ng/ml

B. Wiederfindung: Die Wiederfindung von N-MID Osteocalcin im Serum wurde mit 90-110% des Serumwertes ermittelt.

Die Durchführung und Auswertung des Tests erfolgt gemäß den von Roche® (Roche® Diagnostics GmbH, D-68298 Mannheim, Katalog-Nr. 12149133) festgelegten Vorgaben.

Knochenspezifische Alkalische Phosphatase (Ostase)

Der für diese Arbeit verwendete In-vitro Test zur quantitativen Bestimmung der BAP im Serum ist der immunoradiometrische Assay Tandem®-R Ostase® der Firma Beckman Coulter™ (Beckman Coulter™ GmbH, D-47807 Krefeld, Bestell-Nr. 2058)

Dieser Sandwich-Assay verläuft in zwei Schritten. BAP-haltige Proben reagieren mit der Festphase, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen eine spezifische

Determinante des Phosphatasemoleküls gerichtet ist. Währenddessen reagiert die Probe über ein anderes Epitop desselben Proteins mit einem radioaktiv markierten monoklonalen Antikörper, wodurch es zur sogenannten Sandwichformation kommt. Nach dem Waschen des Reaktionsansatzes, bei dem ungebundene markierte Antikörper entfernt werden, wird die verbleibende an die Festphase gebundene Probenkonzentration indirekt über die Bestimmung der Radioaktivität in einem Gammazähler gemessen. Das ermittelte Signal ist der BAP-Konzentration im Serum direkt proportional.

Die Referenzwerte bei gesunden erwachsenen Männern liegen bei einem Mittelwert von 12,3 µg/l (Standardabweichung: 4,3 µg/l, Median: 11,6 µg/l).

Über die Leistungsmerkmale des Tests werden folgende Angaben gemacht:

A. Präzision: Die Intraassayvarianz des Tests beträgt < 6,7% bei 13,2 µg/l

Die Interassayvarianz des Tests beträgt < 8,1% bei 11,7 µg/l

B. Wiederfindung: Die Wiederfindung von BAP im Serum wurde von Beckman Coulter™ mit 103-112% angegeben.

Die Durchführung und Auswertung des Tests erfolgt gemäß den von Beckman Coulter™ festgelegten Vorgaben.

β-CrossLaps im Serum (β-CTX)

Die quantitative Bestimmung von β-CTX im Serum erfolgt wie bei Osteocalcin über einen Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA). Entsprechend der dortigen Beschreibung wird auch dieses Peptid an den Roche® Analysenautomaten Elecsys® 1010/2010 und am MODULAR ANALYTICS E170 bestimmt. Am Klinikum Rechts der Isar/München wird routinemäßig der Elecsys® verwendet.

Das Testprinzip dieses Sandwichimmunoassays entspricht dem des im Kapitel Osteocalcin beschriebenen Ablaufs. Dabei bilden der Analyt in der Serumprobe, ein biotinylierter monoklonaler β-CrossLaps spezifischer Antikörper und ein mit Ruthenium-Komplex markierter monoklonaler β-CrossLaps spezifischer Antikörper einen Sandwich-Komplex.

Die Referenzwerte von β-CTX im Serum liegen bei 0,300 ng/ml (Standardabweichung 0,142 ng/ml) bei gesunden erwachsenen Männern im Alter von 30-50 Jahren, bei 0,304 ng/ml (Standardabweichung 0,200 ng/ml) in der Altersgruppe von 50-70 Jahren und bei 0,394 ng/ml (Standardabweichung 0,200 ng/ml) in der Altersgruppe von über 70 Jahren.

Über die Leistung des Tests sind folgende Angaben zu machen:

- A. Präzision: Die Intraassayvarianz des Tests beträgt $< 4,6\%$ bei $0,08 \text{ ng/ml}$
Die Interassayvarianz des Tests beträgt $< 4,7\%$ bei $0,08 \text{ ng/ml}$
- B. Wiederfindung: Die Wiederfindung von β -CTx im Serum wurde mit $90\text{-}110\%$ des Serumwertes ermittelt.
- Die Durchführung und Auswertung des Tests erfolgt gemäß den von Roche® festgelegten Vorgaben.

Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAcP)

Das Testprinzip der quantitativen Bestimmung von TRAcP im Serum beruht auf einem nicht-kompetitiven Festphasenimmunoassay (medac®, Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Geschäftseinheit Diagnostika, D-22880 Wedel, Katalog-Nr.:720). Dabei werden zunächst Anti-TRAcP 5b-Antikörper in mit Anti-Maus-IgG beschichtete Mikrotiterplatten gegeben. Außerdem werden Serumproben mit TRAcP zugegeben, die mit einer Freisetzungsreagenz inkubiert werden. Die aktive Isoform des Enzyms, das knochenspezifische TRAcP 5b, kann nun von den Bindungsproteinen dissoziieren und an den Anti-TRAcP 5b-Antikörper koppeln.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde werden ungebundene Bestandteile aus den Microtitervertiefungen entfernt und die noch verbleibende Aktivität der an die Antikörper der Küvettenwände gebundenen markierten TRAcP-Antigene nach Inkubation in einer entsprechenden Substratlösung photometrisch gemessen. Die photometrischen Messungen von TRAcP wurden am Dynax MR 7000 (Kat.-Nr.: DL 2000, Serien-Nr.: G 4665) durchgeführt.

Die gemessene Extinktion ist direkt proportional zur TRAcP-Konzentration in der jeweiligen Serumprobe.

Für gesunde Männer wurde eine Bone-TRAcP-Aktivität von $3,81 \pm 1,30 \text{ U/l}$ ermittelt.

Folgende Angaben sind über die Leistungsmerkmale des Tests zu machen:

- A. Präzision: Die Intraassayvarianz des Tests beträgt $< 6 \%$ bei $3,97 \text{ U/l}$
Die Interassayvarianz des Tests beträgt $< 8 \%$ bei $3,76 \text{ U/l}$
- B. Wiederfindung: Die Wiederfindung verschiedener Mengen gereinigter humaner osteoklastischer TRAcP in Seren wurde mit $96,6 \pm 2,7 \%$ ermittelt.
- Die Durchführung und Auswertung dieses Tests erfolgt gemäß der von medac® festgelegten Vorgaben.

Prostata-spezifisches Antigen (PSA)

Die quantitative Bestimmung von Gesamt-PSA im Serum erfolgt wie bei Osteocalcin über einen Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA). Entsprechend der dortigen Beschreibung wird auch dieses Peptid an den Roche® Analyseautomaten Elecsys® 1010/2010 und am MODULAR ANALYTICS E170 bestimmt. Am Klinikum Rechts der Isar/München wird routinemäßig der Elecsys® verwendet.

Das Testprinzip dieses Sandwichimmunoassays entspricht dem des im Kapitel Osteocalcin beschriebenen Ablaufs. Dabei bilden die Serumprobe, ein biotinylierter monoklonaler PSA spezifischer Antikörper und ein mit Ruthenium-Komplex markierter monoklonaler PSA spezifischer Antikörper einen Sandwich-Komplex.

Die Referenzbereiche dieses Tests für Gesamt-PSA bewegen sich bei Werten $< 3,1$ ng/ml bei gesunden Männern im Alter von 50-60 Jahren, $< 4,1$ ng/ml bei gesunden Männern zwischen 60 und 70 Jahren und bei Werten $< 4,4$ ng/ml in der Altersgruppe > 70 Jahre (jeweils 95. Perzentile).

Die Leistungsmerkmale des Tests wurden, wie folgt, ermittelt:

A. Präzision: Die Intraassayvarianz des Tests beträgt $< 2,5\%$ bei $4,76$ ng/ml

Die Interassayvarianz des Tests beträgt $< 2,9\%$ bei $4,76$ ng/ml

B. Wiederfindung: Die Wiederfindung von Gesamt-PSA im Serum wurde mit 90-110% des Serumwertes ermittelt.

Die Durchführung und Auswertung des Tests erfolgt gemäß den von Roche® festgelegten Vorgaben.

3.4. Datenmanagement und statistische Auswertung

Alle klinischen Daten wurden in standardisierten Akten dokumentiert und später in eine Datenbank (Excel für Windows 2000) übertragen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SSPS.SAV für Windows 2000 (Hersteller: SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

Zur statistischen Prüfung von unverbundenen Stichproben wurde der Rangsummentest nach Mann-Whitney durchgeführt.

Das Signifikanzniveau von Parameterveränderungen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten, sowie zwischen den verschiedenen Kriterien und Gruppen wurde durch Analyse der Kovarianz bestimmt. Alle p-Werte sind zweiseitig, statistische Signifikanz wurde als $p < 0,05$ definiert.

Zur graphischen Veranschaulichung der Ergebnisse der Untersuchungen wurden Säulendiagramme verwendet. Auf der x-Achse findet sich die Einteilung nach dem

jeweils untersuchten Kriterium im zeitlichen Verlauf und die zu dem jeweiligen Zeitpunkt noch in die Messungen involvierte Anzahl (N) der Probanden.

Beispiel: Kriterium „Therapie“, eingeteilt in pos. (=positiver Verlauf) oder neg. (=negativer Verlauf) zu den jeweiligen Zeitpunkten 1-10, dargestellt durch jeweils 10 Säulen in Form von Boxplots. Jeder Boxplot ist außerdem mit der Anzahl N der zu diesem Zeitpunkt noch an den Messungen teilnehmenden Patienten versehen.

Auf der y-Achse sind rechts die gemessenen Serumparameter zu den jeweiligen Zeitpunkten 1-10 in der entsprechenden Säulenfarbe dargestellt (z.B. OC1, OC2,...), wobei die jeweiligen Zeitpunkte in einem regelmäßigen Abstand von drei Wochen zueinander liegen (d.h. OC2 fand 3 Wochen nach OC1 statt).

Auf der y-Achse der linken Diagrammseite ist schließlich der Absolutwert des gemessenen Serumparameters in dessen entsprechender Einheit aufgetragen.

4. Resultate

4.1. Probandencharakteristika und Studienverlauf

Es wurden 15 an einem histologisch gesicherten Adenokarzinom der Prostata mit Knochenmetastasen leidende Patienten longitudinal untersucht, die zum Zeitpunkt der Randomisierung für die in Kapitel 3.1. genannte Studie zwischen 58 und 85 Jahre alt waren. Jedem dieser Patienten wurde am Morgen vor ihrer jeweiligen Taxotere®-Gabe Blut entnommen. Das daraus durch Zentrifugation gewonnene Serum wurde bei einer Temperatur von -20°C aufbewahrt. Wurden die Patienten der Vergleichsgruppe mit Mitoxantrone®-Gabe zugeteilt, wurden Serumproben erst dann genommen, wenn bei den Patienten wegen Verschlechterung ihres Krankheitszustandes (Voraussetzungen siehe Studienprotokoll) auf Taxotere®-Gabe umgestellt werden musste. Für jeden der 15 untersuchten Patienten lagen, je nach Randomisierung in eine Studiengruppe mit ein- oder dreiwöchigem Zyklus beziehungsweise Mitoxantronetherapie, 3 bis 32 Serumproben vor.

4.2. Mittelwerte der biochemischen Knochenstoffwechselfparameter im Verlauf der Therapie

Zunächst wurden die Serum-Mittelwerte aller fünf Knochenstoffwechselfparameter zum Therapieverlauf unter Medikation mit Doxetacel in Bezug gesetzt. Dabei wurde ein stabiler Krankheitsverlauf respektive ein Rückgang der Krankheitsparameter wie PSA-Werte, Schmerzen und der Metastasenanzahl als positive Therapie definiert, ein Fortschreiten oder eine Verschlechterung dieser Marker als negativer Therapieverlauf. Vor diesem Hintergrund wurden 10 Patienten in die Gruppe mit positivem Therapieverlauf, die restlichen 5 in die Gruppe mit dem negativen Verlauf eingeteilt. Zur besseren Vergleichbarkeit bei der Darstellung wurden für alle Probanden nur Werte mit einem Intervall von 3 Wochen verwendet.

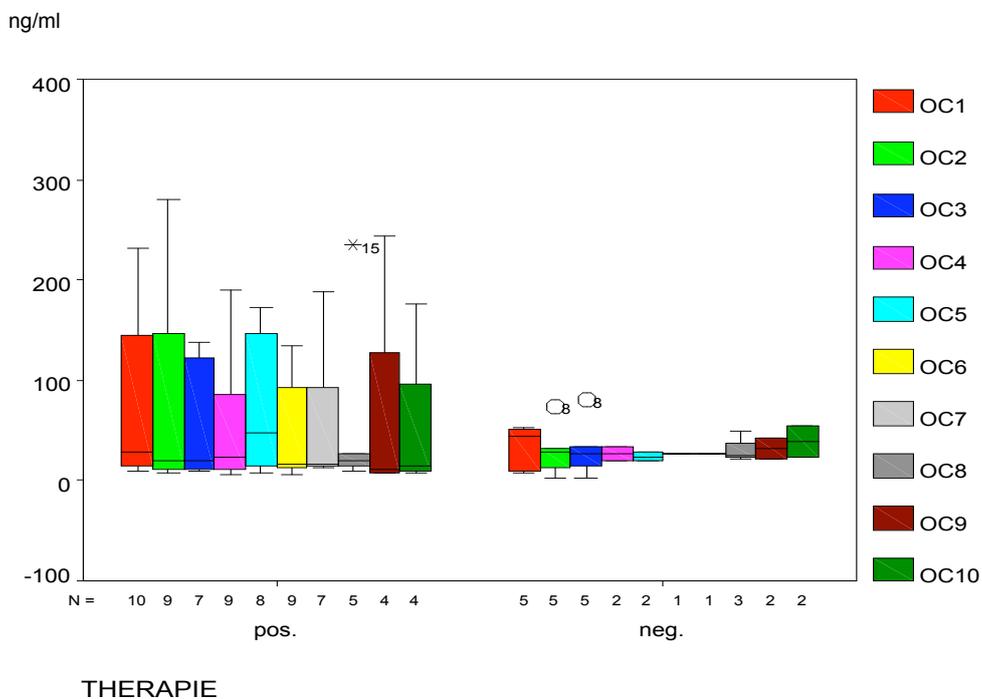
Dabei ist zu erkennen, dass die Mittelwerte (MW) der Knochenstoffwechselfmarker BAP, CTx und PSA im Verlauf der Therapie innerhalb der Gruppe mit gemessenem Therapieerfolg tendenziell (nicht signifikant) sinken, während dies bei TRAcP und Osteocalcin nicht erkennbar ist. Am deutlichsten - jedoch wegen der geringen Patientenzahl nicht signifikant - ist dieser Rückgang gegenüber den Ausgangswerten bei PSA sichtbar. Hier nämlich reduzierte sich der Wert von $166,2 \pm 1,1$ ng/ml (n=10; MW \pm SEM (Standard error of the mean)) auf $22,1 \pm 0,9$ ng/ml (n=4), während BAP,

der Parameter mit der nächstbesten Abbildung der Therapieantwort, von $84,7 \pm 1,1$ $\mu\text{g/l}$ auf $20,6 \pm 1,3$ $\mu\text{g/l}$ zurückging.

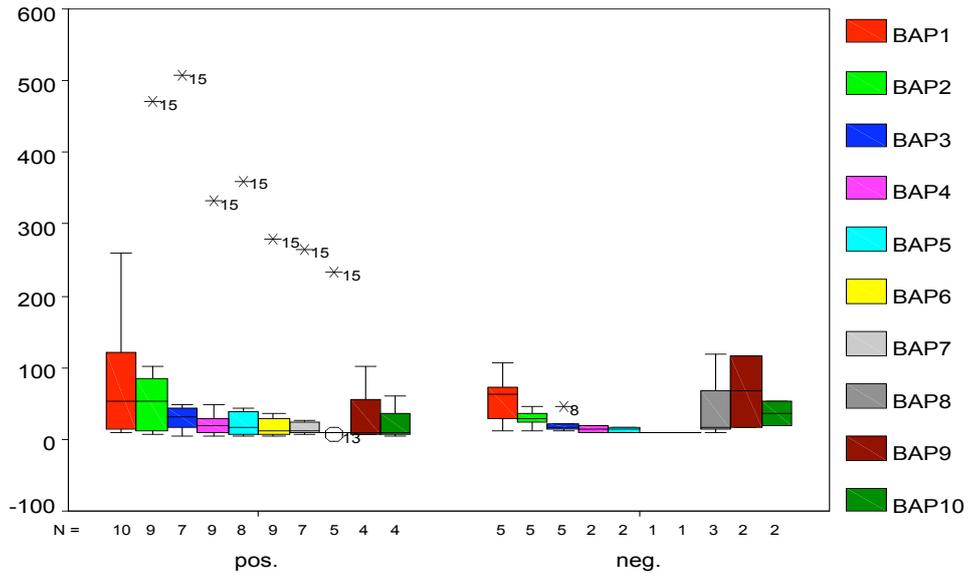
Die Knochenstoffwechselfparameter der Vergleichsgruppe sind aufgrund der geringen Fallzahl von nur 5 Patienten schwer einzuordnen, zumal auch bei nur zwei von ihnen über mehr als vier sukzessive Werte zu Verfügung standen. Aus diesem Grund kann bei diesen Patienten in den beobachteten 27 Wochen keine einheitlich steigende oder fallende Tendenz gezeigt werden.

Führt man jedoch ein Einzelbeispiel eines Patienten mit unter Therapie fortschreitender Erkrankung an, so erkennt man, dass auch hier die Verläufe der einzelnen Knochenstoffwechselfparameter im Vergleich keine einheitliche Tendenz aufweisen: So stiegen die Werte der Formationsmarker OC (von 8,6 auf 22,4 ng/ml) und BAP (von 12,8 auf 19,6 $\mu\text{g/l}$) zwar an (nicht signifikant), auch bei dem Resorptionsmarker CTx konnte ein Anstieg von 397 auf höchstens 589 ng/ml festgestellt werden, bei TRAcP hingegen konnte keinerlei Tendenz eruiert werden und PSA fiel sogar ab.

Abb. 4.2 a-e: Mittelwerte der biochemischen Knochenstoffwechselfparameter im Verlauf der Therapie (Allgemeines zu den Abbildungen siehe Kapitel 3.4.)

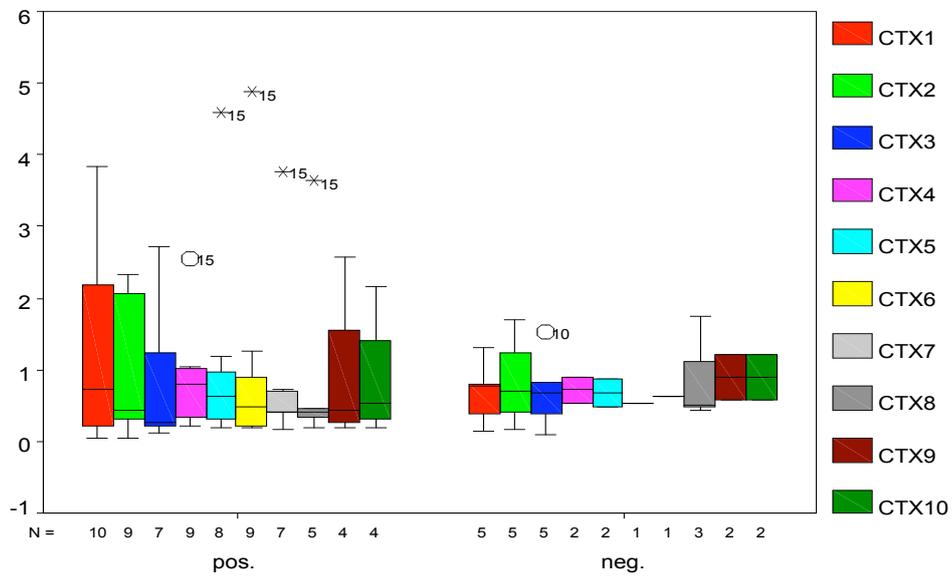


µg/l



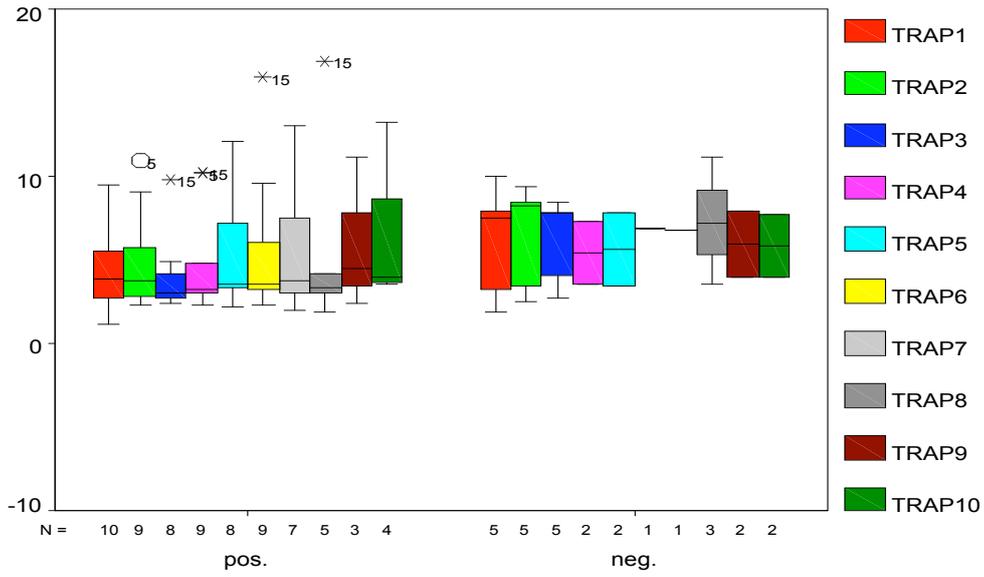
THERAPIE

ng/ml



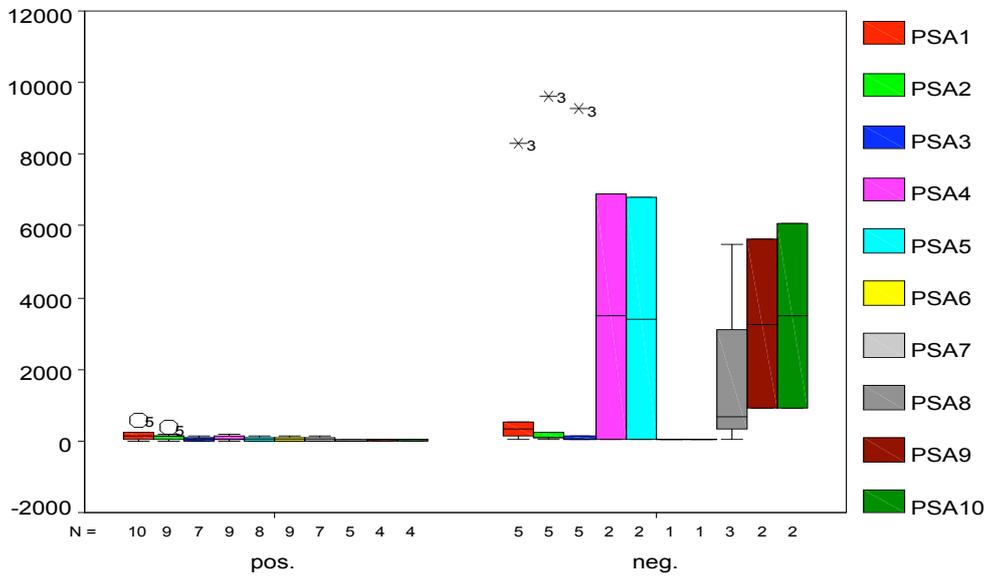
THERAPIE

U/I



THERAPIE

ng/ml



THERAPIE

4.3. Mittelwerte der Knochenstoffwechselfparameter im Vergleich zum Metastasentyp

Aus den Szintigraphiebefunden der in die Studie involvierten Patienten konnte neben der Metastasenanzahl auch deren Qualität eruiert werden. So wiesen 9 der 15 Patienten die beim Prostatakarzinom am häufigsten vorkommenden osteoblastischen Knochenanreicherungen (Gruppe 1) auf, bei den restlichen 6 zeigten sich kombiniert osteoblastisch-osteolytische Metastasen (Gruppe 2). Rein osteolytische Absiedlungen kamen nicht vor. Nach Einteilung der Patienten in die jeweiligen Gruppen konnten der Verlauf der Knochenumbauparameter innerhalb der Gruppe und im Vergleich zueinander beurteilt werden.

Betrachtet man dabei den Knochenformationsmarker Osteocalcin und die Resorptionsmarker TRAcP und CTx lässt sich sowohl bei den osteoblastischen als auch bei den kombinierten Metastasen im Therapieverlauf keine eindeutige Tendenz erkennen. Bei BAP und PSA jedoch zeigt sich ein deutlicher Rückgang der Mittelwerte in beiden Gruppen bezogen auf die Anfangswerte (BAP: von $90,1 \pm 1,7 \mu\text{g/l}$ (n=8) auf $20,6 \pm 1,3 \mu\text{g/l}$ in Gruppe 1 und von $87,0 \pm 0,9 \mu\text{g/l}$ (n=6) auf $15,2 \pm 0,4 \mu\text{g/l}$ (n=2) in Gruppe 2 ($p > 0,05$); PSA: von $154,1 \pm 1,2 \text{ ng/ml}$ (n=9) auf $22,1 \pm 0,9 \text{ ng/l}$ (n=4) in Gruppe 1 und von $1601,8 \pm 2,1 \text{ ng/l}$ (n=6) auf $43,4 \pm 1,3 \text{ ng/l}$ (n=2) in Gruppe 2 ($p > 0,05$)) - ein Verhalten, das tendentiell mit dem Rückgang der Metastasen in Einklang zu bringen ist. Ein signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Gruppen ist nicht sichtbar.

Das abweichende Verhalten der beiden Parameter in den letzten drei Messungen in der Gruppe der kombinierten Metastasen lässt sich dadurch erklären, dass bei diesen Patienten in weiteren Serumanalysen nach Therapieende mit Docetaxel ein enormer Anstieg der Knochenumbauparameter bei wieder zunehmenden Knochenmetastasen zu verzeichnen war.

Der Proband X als Beispiel für einen Patienten mit kombiniert osteolytisch-osteoblastischen Metastasen: Nach Beginn seiner Chemotherapie mit Docetaxel am 04.09.2001 waren sowohl BAP als auch PSA rückläufig. Nach Beendigung der Therapie am 18.03.2002 kam es zu einem rasanten Anstieg der beiden Parameter (Abb. 4.3a).

Abb. 4.3 a: Verlauf von BAP und PSA bei Patient X

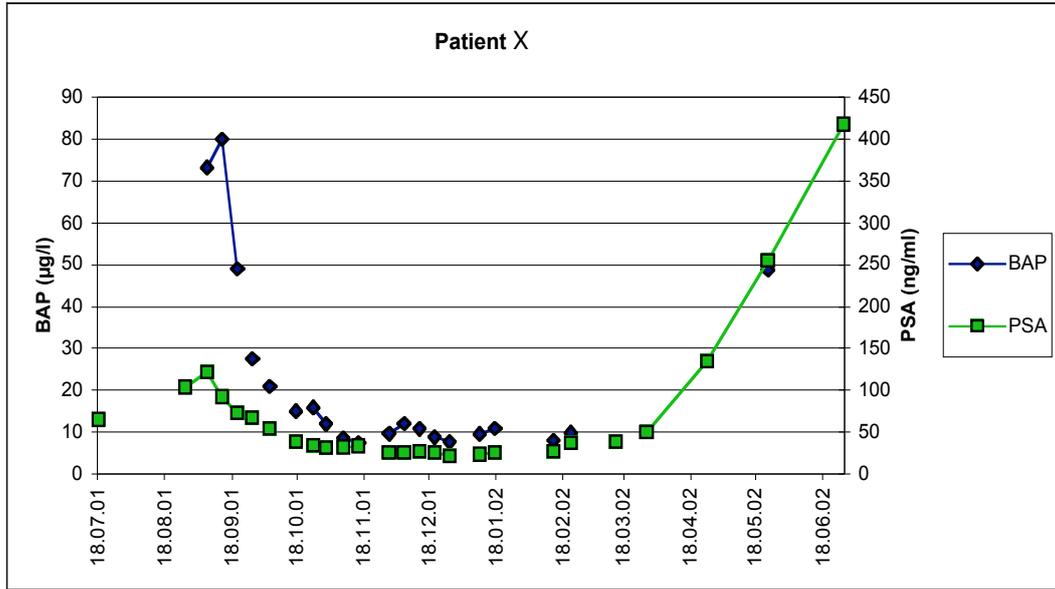
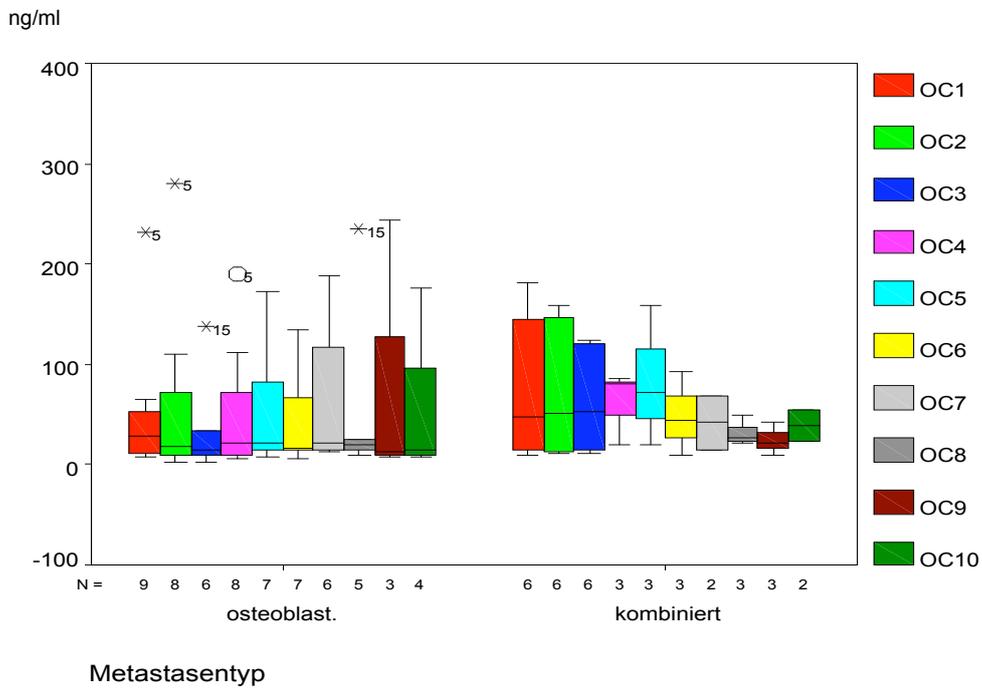
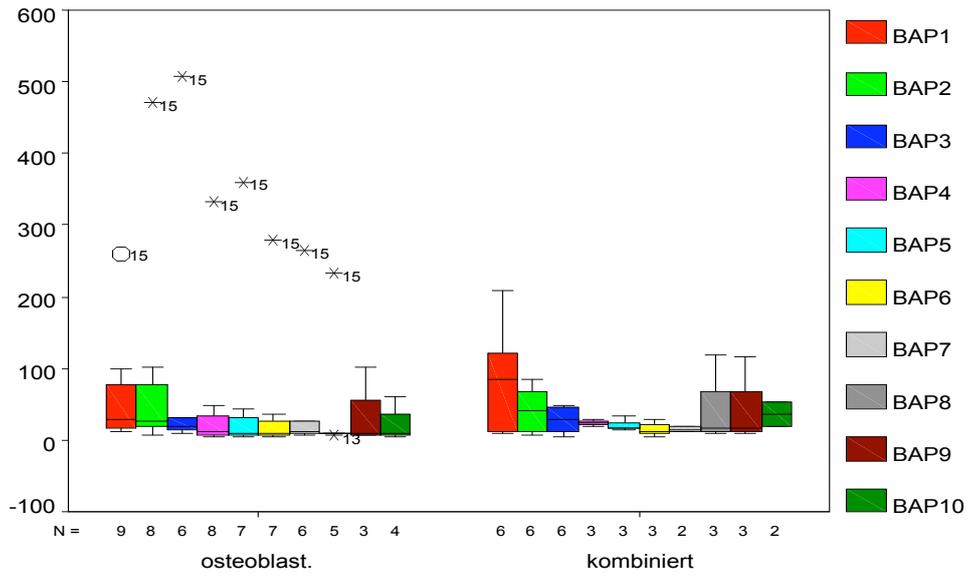


Abb. 4.3 b-f: Mittelwerte der Knochenstoffwechselfparameter im Vergleich zum Metastasentyp (siehe auch Kapitel 3.4.)

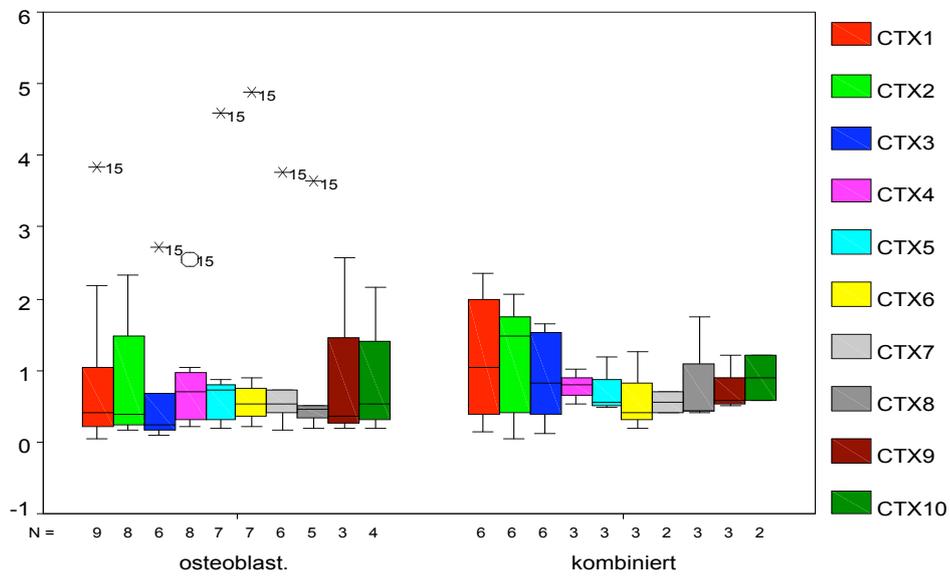


µg/l



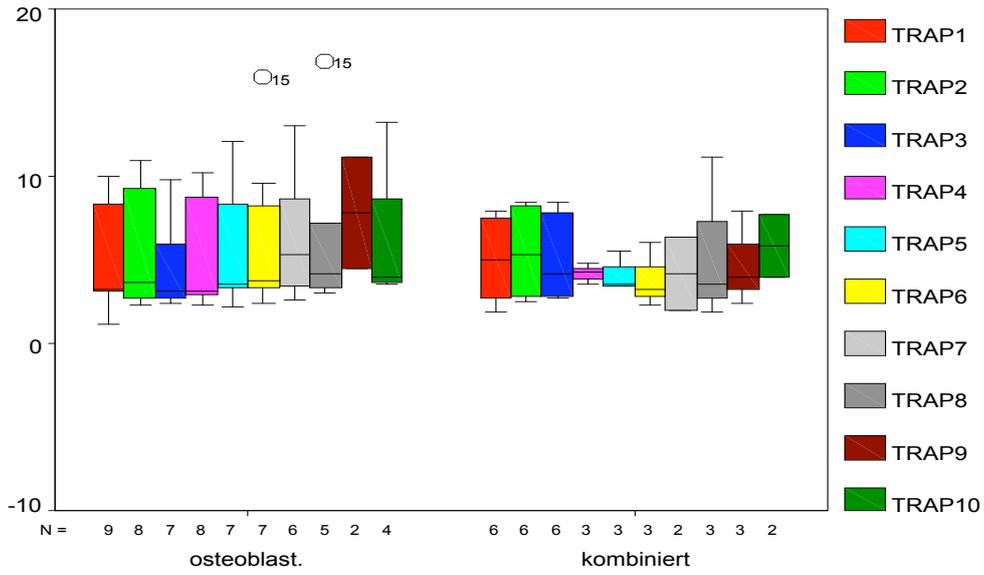
Metastasentyp

ng/ml



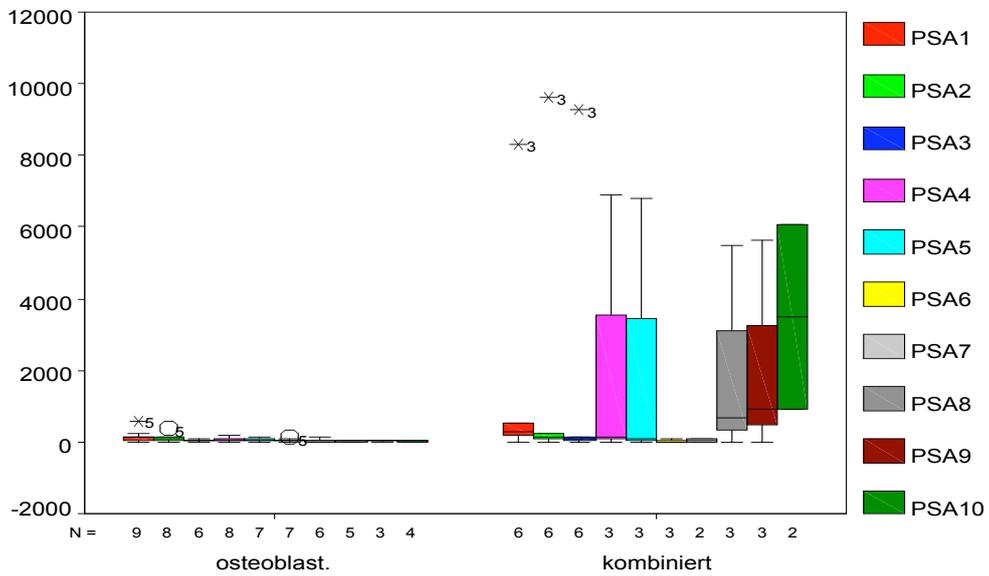
Metastasentyp

U/I



Metastasentyp

ng/ml

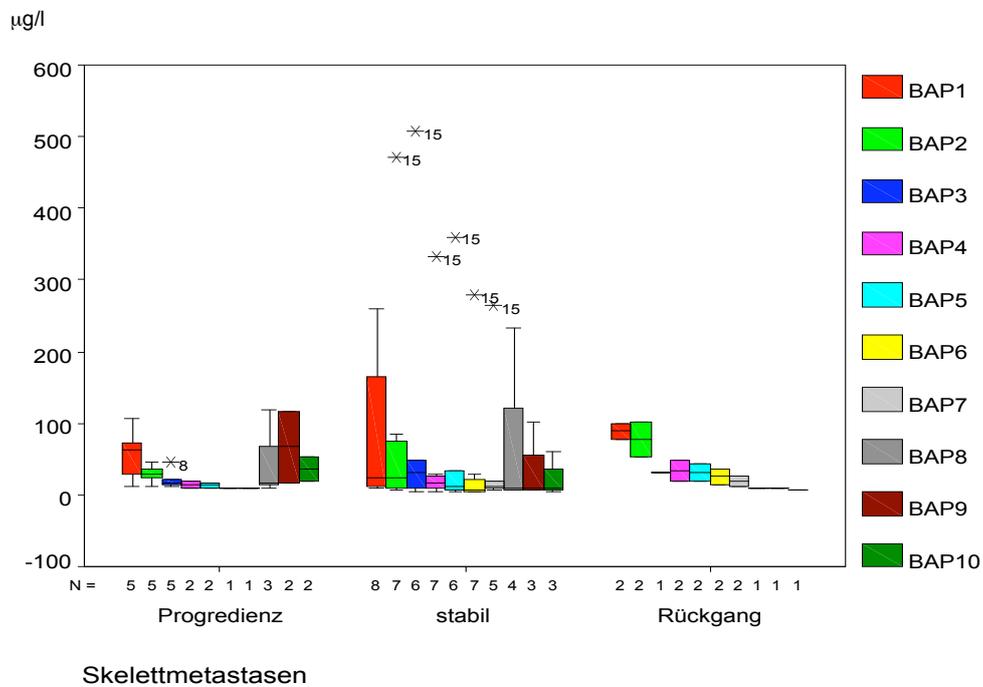
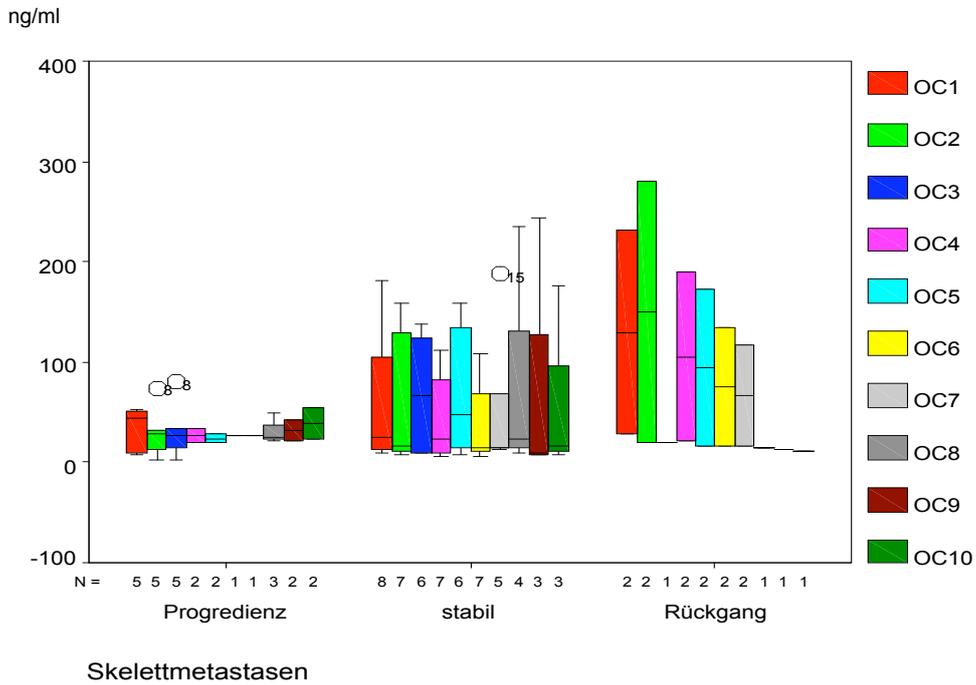


Metastasentyp

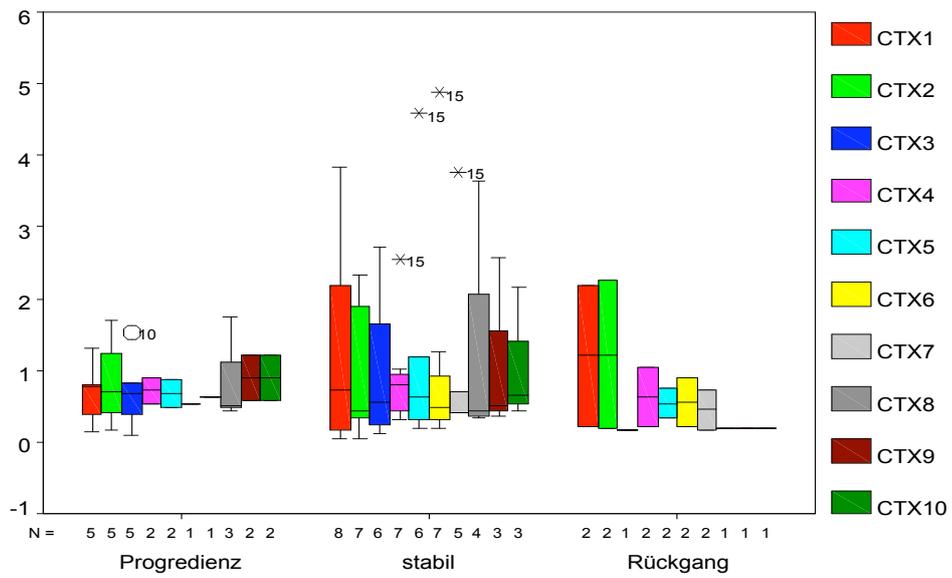
4.4. Mittelwerte der Knochenstoffwechselfparameter im Vergleich zum Verlauf der Skelettmastasierung

In einem weiteren Versuch wurde der Verlauf der Skelettmastasien in 3 Gruppen eingeteilt. Der ersten Gruppe wurden Patienten zugewiesen, die eine Progredienz an Anzahl und Intensität von Skelettmastasien aufwiesen, in die zweite Gruppe kamen Patienten mit stabilem Verlauf, in die dritte entsprechend Patienten mit dokumentierter Verminderung der Metastasenanzahl. Grundlage der Dokumentation war die nuklearmedizinische Verlaufskontrolle mittels Knochenszintigraphie. Innerhalb der Gruppe der Patienten mit fortschreitenden Skelettmastasien kann im Verlauf keine genaue Tendenz festgestellt werden, BAP fällt entgegen den Erwartungen sogar eher ab ($p > 0,05$). In der Patientenauswahl mit stabilen Metastasenverhältnissen zeigen die Werte von OC und CTx in der Tendenz einen Verlauf auf ungefähr gleich bleibendem Niveau. Die Mittelwerte für PSA dagegen fallen von maximal $114,7 \pm 0,8$ ng/ml ($n=8$) auf $26,3 \pm 0,8$ ng/ml ($n=3$) und auch BAP zeigt nach kurzem Anstieg von $83,8 \pm 1,2$ µg/l ($n=8$) auf $105,1 \pm 1,9$ µg/l ($n=6$) einen Rückgang auf $25,0 \pm 1,21$ µg/l ($n=3$) ($p > 0,05$). TRAcP dagegen steigt mit seinen Mittelwerten eher an: von $3,8 \pm 0,6$ U/l ($n=8$) auf $5,6 \pm 0,8$ U/l ($n=5$). Die letzte Gruppe, die jedoch nur 2 Patienten einschließt, zeigt im Verlauf gleich bleibende Werte für TRAcP. Die Mittelwerte für OC und BAP weisen den zu erwartenden Abfall gemäß der Reduktion der Skelettmastasien auf (OC: von $129,6 \pm 1,1$ ng/ml auf $66,4 \pm 1,1$ ng/ml und BAP: von $88,4 \pm 0,1$ µg/l auf $19,6 \pm 0,5$ µg/l; $p > 0,05$). Auch CTx weist einen Rückgang seiner Mittelwerte von $1,2 \pm 1,1$ ng/ml auf $0,5 \pm 0,8$ ng/ml auf. PSA, dessen Werte wiederum den deutlichsten Abfall zeigen, geht von $372,5 \pm 0,9$ ng/ml auf $65,7 \pm 1,1$ ng/ml zurück (p jeweils $> 0,05$).

Abb. 4.4 a-e: Mittelwerte der Stoffwechselfparameter im Vergleich zum Verlauf der Metastasierung (siehe auch Kapitel 3.4.)

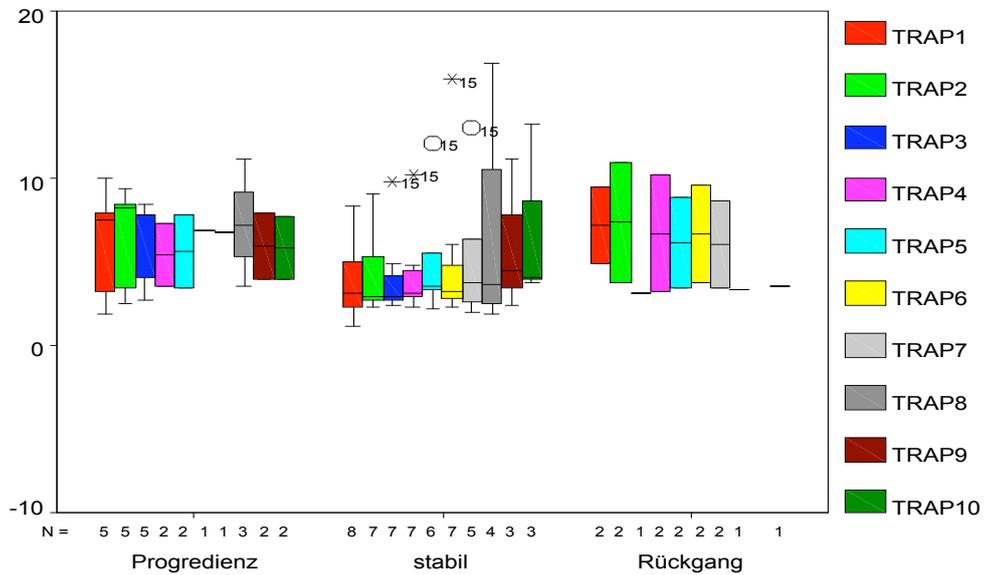


ng/ml

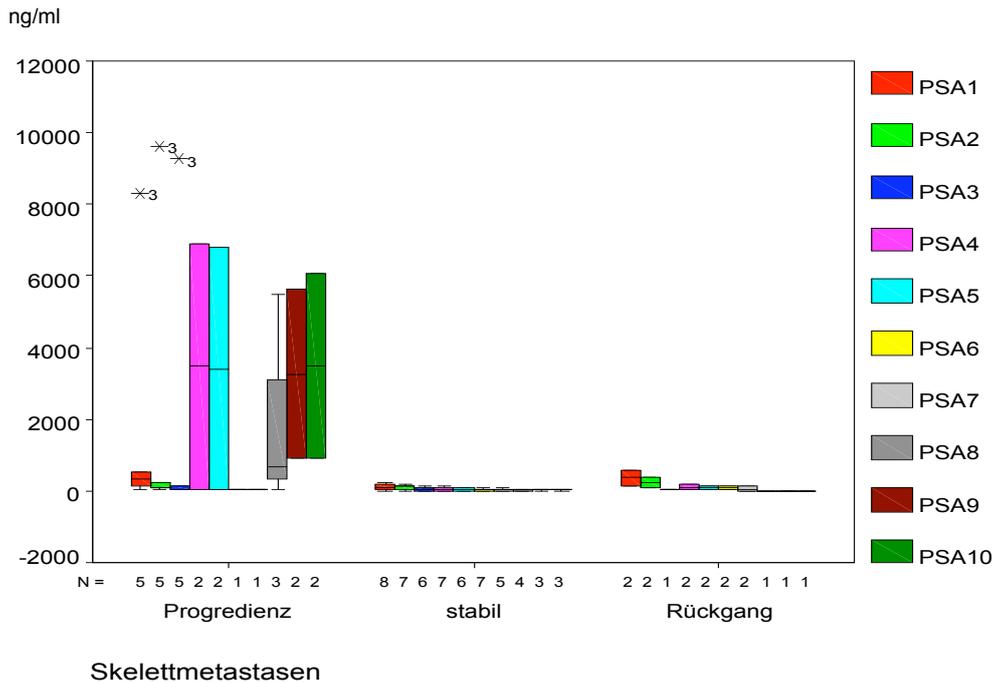


Skelettmetastasen

U/l



Skelettmetastasen



4.5. Mittelwerte der Knochenstoffwechselfparameter im Vergleich zum Schmerzverhalten

Als weiteres Kriterium erschien es sinnvoll, die Knochenstoffwechselfparameter zum Schmerzverhalten der Patienten in Bezug zu setzen, um zu eruieren, ob der Verlauf dieser Parameter positiv mit der Schmerzsymptomatik der Probanden zu korrelieren ist. Da diese Schmerzen beim metastasierten Prostatakarzinom zumeist Knochenschmerzen sind, könnte darüber hinaus auch eine indirekte Aussage über Ausdehnung und Anzahl von Metastasen möglich sein. Wie in Kapitel 3.2. beschrieben, wurde das subjektive Schmerzempfinden in der Aventis-Studie zum Einen durch den Present Pain Index, zum Anderen durch den Analgetic Score objektiviert. Anhand des Verlaufes dieser beiden Parameter wurden die Patienten wiederum in 3 Gruppen eingeteilt: Eine Gruppe mit Patienten, deren Schmerzen sich im Therapieverlauf steigerten, eine weitere mit stabil bleibendem Schmerzverhalten, und eine dritte Gruppe mit Besserungstendenz während der dreiwöchigen Befragungen.

Hierbei ist zu erkennen, dass alle Parameter mehr oder weniger starke Veränderungen in die zu erwartende Richtung aufweisen.

Die Mittelwerte von Osteocalcin steigen etwa in der 1. Gruppe mit den Patienten, deren Schmerzen im Verlauf der Therapie zunahmen, von $55,3 \pm 1,0$ ng/ml (n=5) auf $84,5 \pm 1,0$ ng/ml (n=3) an. In Gruppe zwei der Probanden mit gleich bleibender Schmerzintensität sinken die Osteocalcinmittelwerte von $47,2 \pm 1,3$ ng/ml (n=7) auf

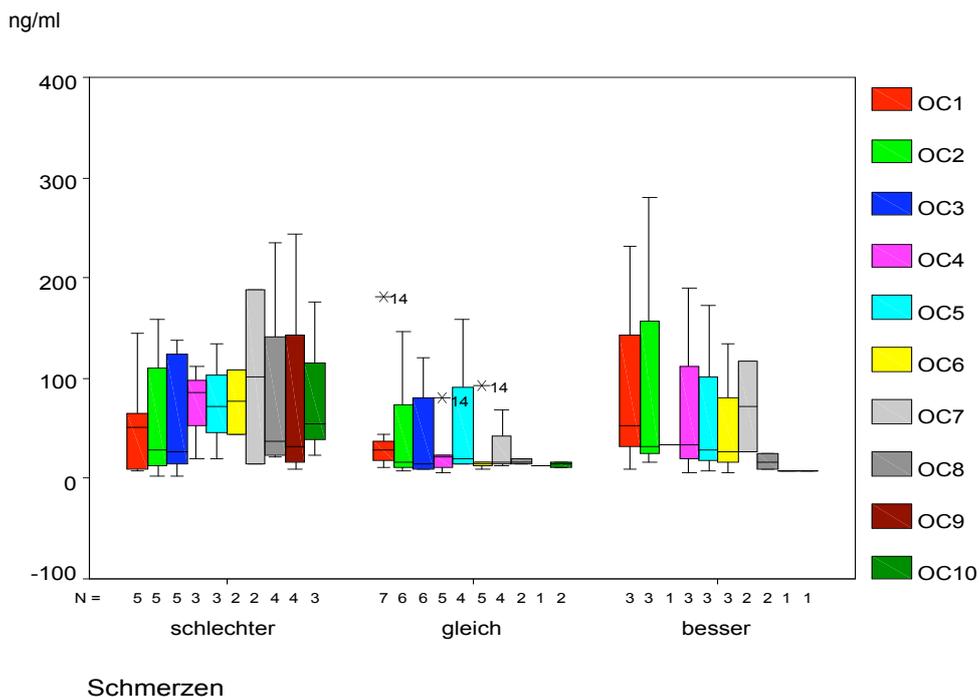
28,2 ± 1,0 ng/ml (n=4), ebenso wie in Gruppe drei mit Patienten bei Schmerzlinderung unter Therapie von 98,0 ± 1,2 ng/ml (n=3) auf 56,1 ± 1,2 ng/ml (n=3).

Ähnlich verhält es sich bei den übrigen Parametern. Während in Gruppe 1 bei BAP und CTx, wohl unter anderem bedingt durch die stark schwankenden Patientenzahlen pro Serumentnahmezeitpunkt, keine einheitliche Tendenz zu erkennen ist, sinken sie erwartungsgemäß in Gruppe 2 (BAP: von 66,2 ± 1,1 µg/l (n=7) auf 11,7 ± 0,5 µg/l (n=4); CTx: von 0,7 ± 1,1 ng/ml (n=7) auf 0,4 ± 0,5 ng/ml (n=4); p>0,05), sowie in Gruppe 3 (BAP: von 60,1 ± 0,8 µg/l (n=3) auf 16,5 ± 1,0 µg/l (n=3); CTx: von 1,0 ± 1,0 ng/ml (n=3) auf 0,6 ± 0,5 ng/ml (n=3); p> 0,05).

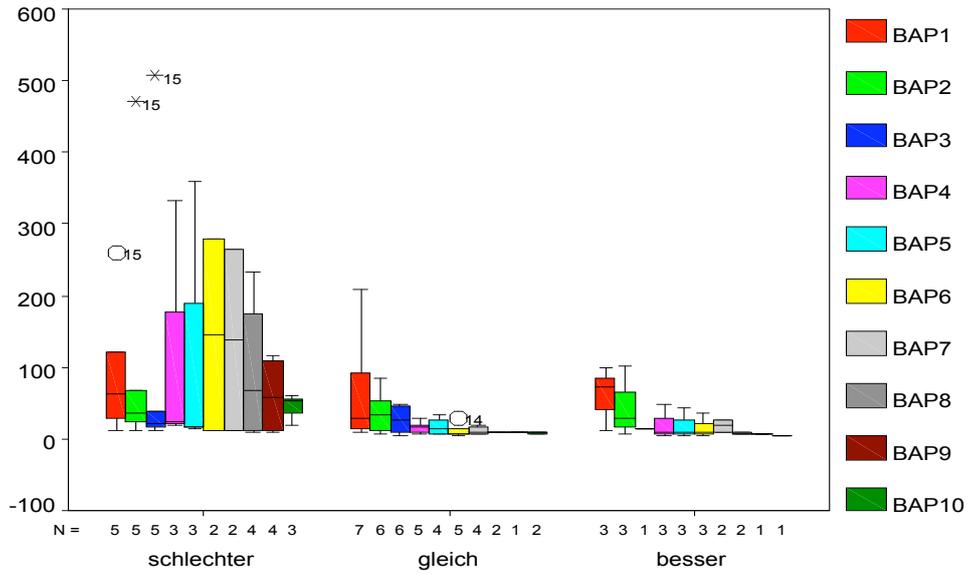
Am deutlichsten reagiert wiederum PSA auf die Veränderungen. Bei den Patienten mit Schmerzprogression ist erneut keine einheitliche Tendenz festzustellen. Bei den schmerzstabilen Patienten der zweiten Gruppe zeigt sich ein deutlicher Rückgang der Mittelwerte von 148,0 ± 1,2 ng/ml (n=7) auf 35,8 ± 1,0 ng/ml (n=4). Auch in der dritten Gruppe fällt PSA von 287,2 ± 0,9 ng/ml (n=3) auf 42,5 ± 0,0 ng/ml (n=2) ab (p jeweils>0,05).

TRAcP dagegen weist in der ersten Patientengruppe eine Zunahme der Werte von 5,2 ± 0,6 U/l (n=5) auf 8,3 ± 0,8 U/l (n=4) auf. In den beiden restlichen Gruppen stellt sich TRAcP im Verlauf auf gleich bleibendem Niveau dar.

Abb. 4.5 a-e: Mittelwerte der Knochenstoffwechselfparameter im Vergleich zum Schmerzverhalten (siehe auch Kapitel 3.4.)

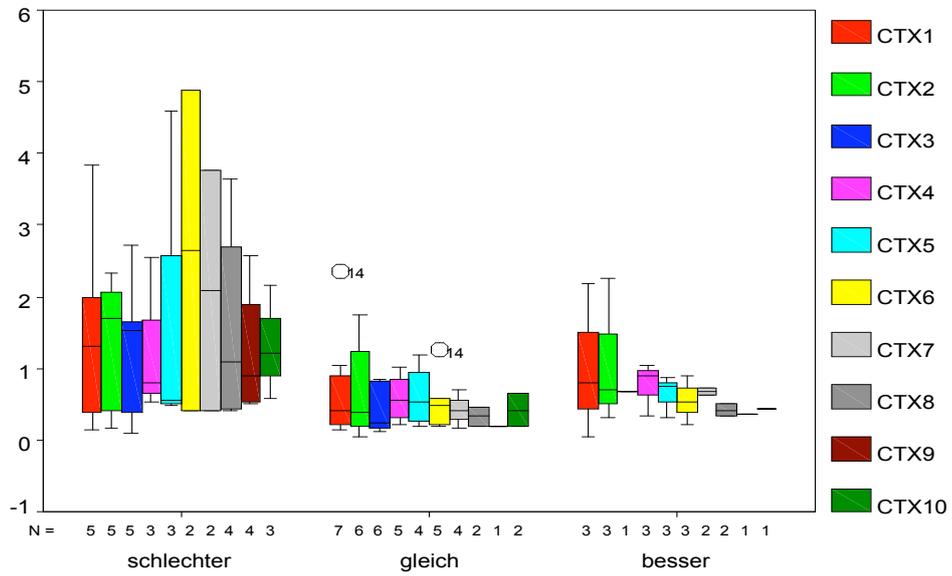


µg/l



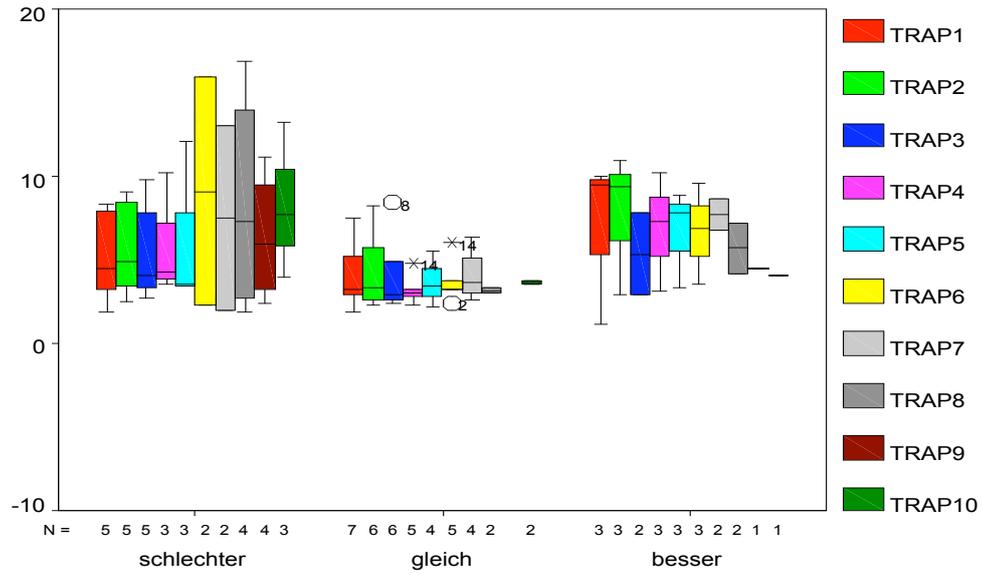
Schmerzen

ng/ml



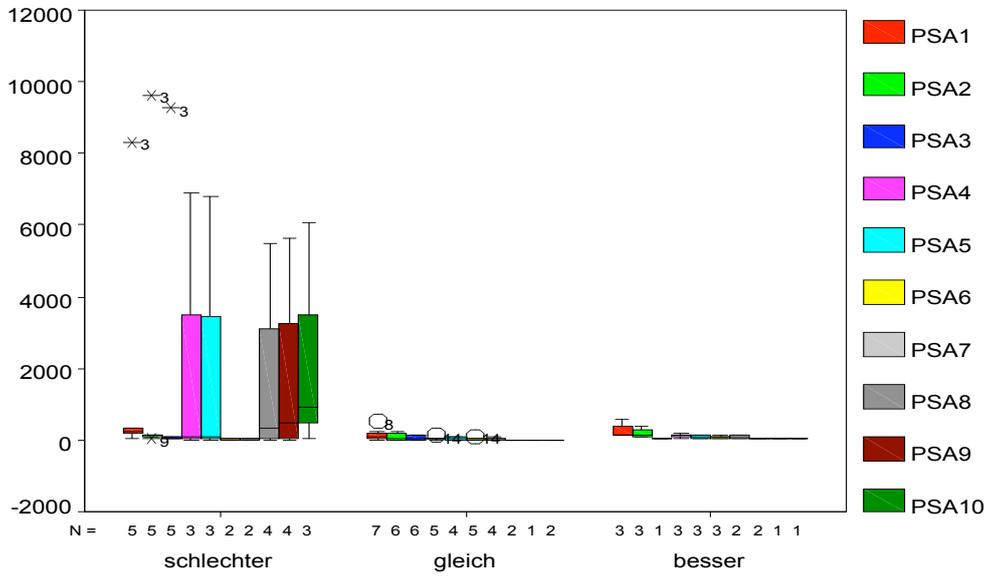
Schmerzen

U/I



Schmerzen

ng/ml



Schmerzen

4.6. Korrelation der Metastasenanzahl mit den Ausgangswerten der Serumparameter OC, BAP, CTx, TRAcP und PSA

Um einen Überblick darüber zu erlangen, inwieweit die absoluten Messwerte der Knochenstoffwechselfparameter Aussagen über die Anzahl und das Ausmaß von Knochenmetastasen machen können, wurde die Metastasenanzahl der einzelnen Patienten mit den jeweils gemessenen Anfangswerten der Serumparameter in Korrelation gesetzt. Die Anzahl der Metastasen wurde orientierend an den Knochenszintigraphiefunden anhand von absoluten Zahlen dokumentiert. Bei Patienten mit Metastasen, deren Zählung aufgrund einer derart großflächigen Verbreitung unmöglich war, wurde die Anzahl auf 16 festgelegt, eine Zahl, die um eins größer ist als die bei einem Patienten höchste Anzahl zählbarer Metastasen.

Dabei korreliert PSA am stärksten mit dem Ausmaß an Metastasen (Pearson's Korrelationskoeffizient $r = 0,35$), d.h. der PSA-Wert ist im Regelfall umso höher, je mehr Metastasen vorliegen. Auch CTx ($r = 0,19$), BAP ($r = 0,13$) und OC ($r = 0,17$) zeigen eine positive Korrelation zur Metastasenanzahl.

Abb. 4.6 a: Korrelation des Serumspiegels von Osteocalcin mit der Anzahl an Skelettmetastasen

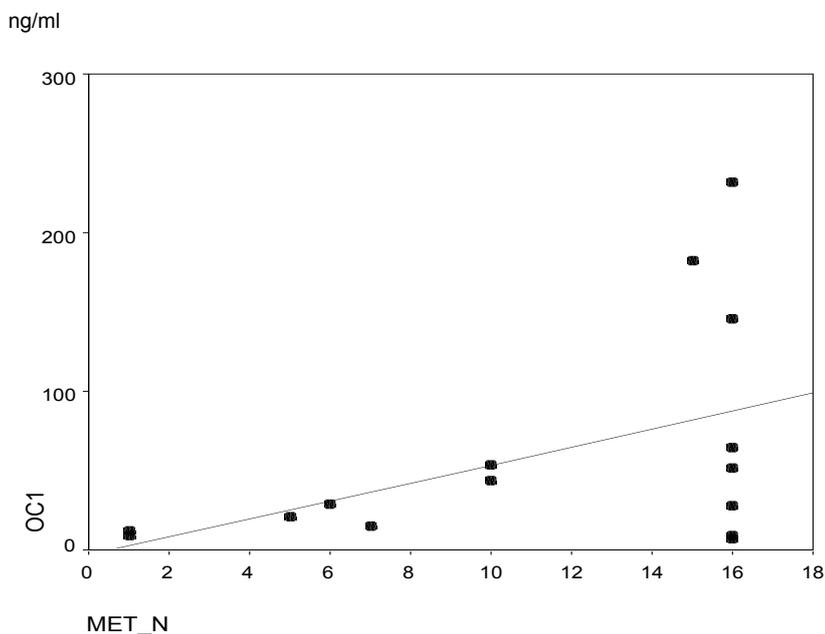


Abb 4.6 b: Korrelation des Serumspiegels von BAP mit der Anzahl an Skelettmastasen

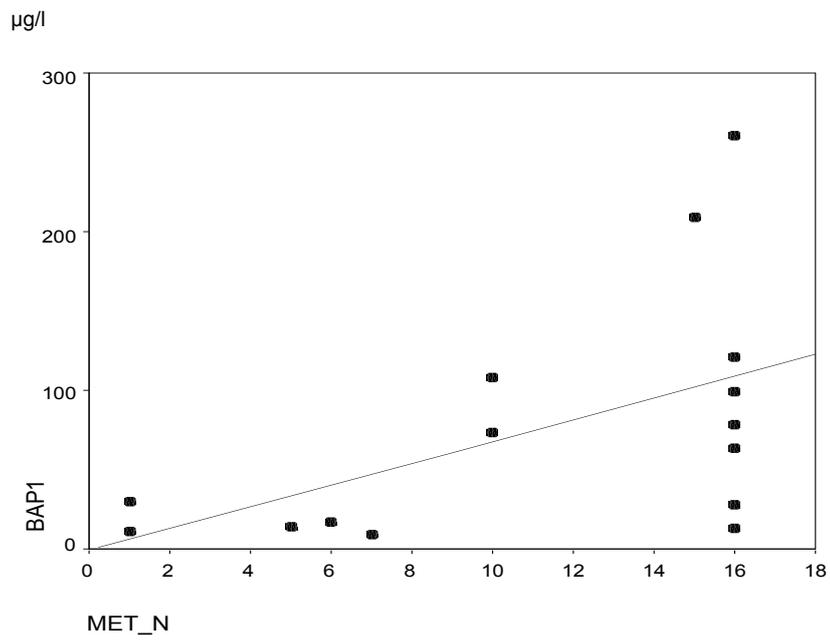


Abb. 4.6 c: Korrelation des Serumspiegels von CTx mit der Anzahl an Skelettmastasen

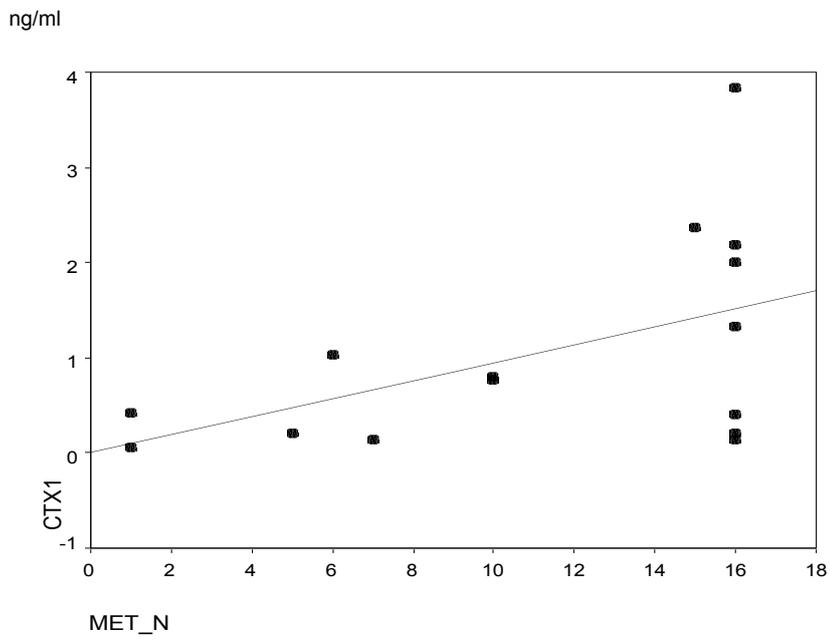


Abb. 4.6 d: Korrelation des Serumspiegels von TRAcP mit der Anzahl an Skelettmetastasen

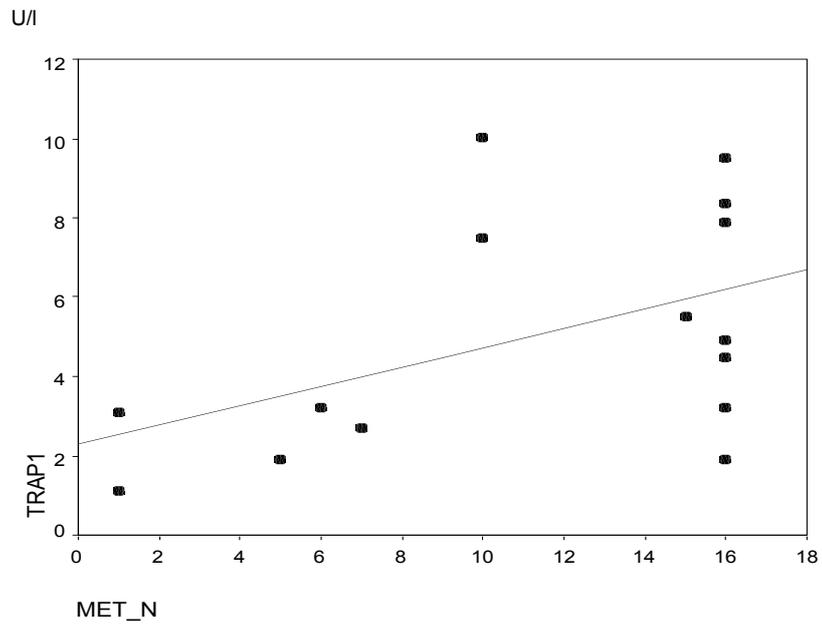
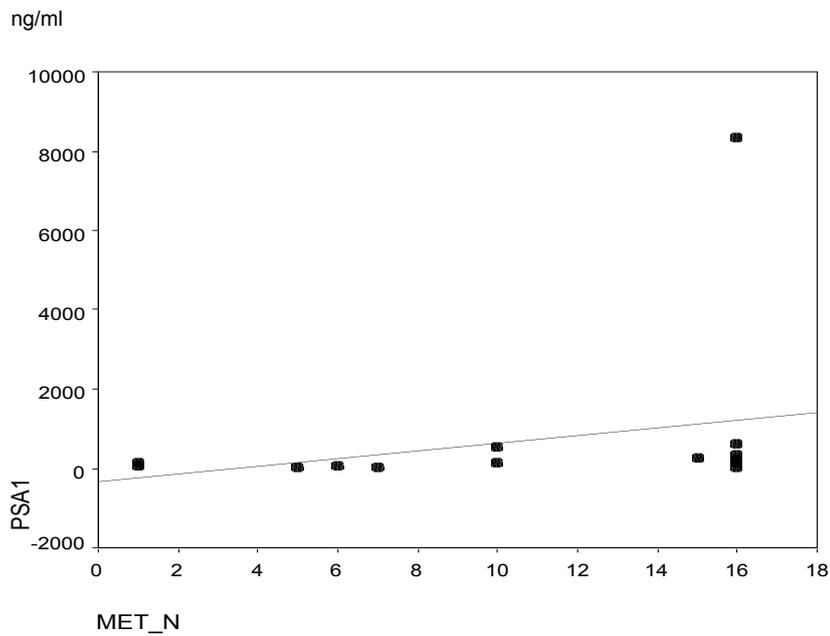


Abb. 4.6 e: Korrelation des Serumspiegels von PSA mit der Anzahl an Skelettmetastasen



5. Diskussion der Ergebnisse

5.1. Diagnostische Effizienz von Knochenstoffwechselfparametern in aktuellen Studien aus der internationalen Literatur

Das Prostatakarzinom ist eine verbreitete Erkrankung des älteren Mannes. Die Therapie der ersten Wahl bei fortgeschrittenem Krankheitsprozess und androgener Aktivität ist die hormonsupprimierende Therapie, sei es durch Orchiektomie oder durch GnRH-Releasing-Antagonisten. Die meisten Patienten sprechen auf diese Therapie auch an, wobei der Therapieerfolg meist nicht länger als 1-2 Jahre anhält, weil die Tumoren Resistenzen gegen die Hormongaben entwickeln [Petrioli et al. 2004, S. 321]. Mehr als 90% der hormonresistenten Patienten mit Prostatakarzinom entwickeln Knochenmetastasen [Petrioli et al. 2004, S. 321]. Die derzeit gängigste Methode zur Diagnose und Überwachung des Verlaufes von Knochenmetastasen stellt die Knochenszintigraphie dar, eine Untersuchungstechnik, die zwar über eine hohe Sensitivität verfügt, jedoch nicht sehr spezifisch und zudem teuer ist [de la Piedra et al. 2003, S. 45]. Auch reflektiert sie nicht das Ausmaß der schnellen Knochenantwort auf Therapie [Coleman 1998, S. 258], etwa nach Beginn einer Medikation mit Bisphosphonaten, so dass der Knochenscan insbesondere in der Frühphase neu begonnener Therapieschemata über wenig Aussagekraft verfügt [Pollen et al. 1984, S. 775]. Diese Tatsache macht die Suche nach anderen möglichen nicht-invasiven Untersuchungsmethoden zur Detektion und Verlaufskontrolle von Knochenmetastasen verständlich. Bisher ist PSA der gemeinhin verwendete Serumparameter, der sowohl zur Kontrolldiagnostik des Prostatakarzinoms als auch als wichtiger Hinweis für das Vorhandensein von Knochenmetastasen herangezogen wird [Garnero et al. 2001, S. 187]. Trotz seiner hohen Sensitivität ist aber auch PSA hinsichtlich der Detektion von Knochenmetastasen nicht zu hundert Prozent spezifisch. Der Parameter ist als Serinprotease, das von Zellen des Prostataparenchyms produziert und sezerniert wird, auch bei Patienten mit Prostatakarzinom erhöht, die nicht durch das Vorhandensein von Knochenmetastasen auffällig geworden sind [Garnero et al. 2001, S. 187]. Um die Gegenwart, das Ausmaß und die Progression von Knochenmetastasen verifizieren zu können, ist daher die Bestimmung neuer Parameter erforderlich, die die speziell bei der Bildung von Knochenmetastasen auftretenden Knochenumbauprozesse zum Ausdruck bringen. Wie schon in Kapitel 1.3. beschrieben, ist Knochen eine dynamische Gewebsstruktur, dessen Stoffwechsel durch zwei gegensätzliche Vorgänge charakterisiert ist: Resorption und Formation. Die beteiligten Zellen sind Osteoklasten und Osteoblasten, deren Aktivitäten über verschiedene Faktoren gegeneinander abgestimmt sind, um einen stabilen Gleichgewichtszustand, sowie eine auf die

spezifischen Belastungen der jeweiligen Knochen adaptierte Trabekularstruktur aufrechtzuerhalten. Während dieser ununterbrochen fortschreitenden Prozesse kommt es zur Freisetzung spezifischer biochemischer Marker, einerseits als Syntheseprodukte stoffwechsellaktiver Osteoklasten und Osteoblasten, andererseits als Abspaltungsprodukte des Knochens während der Resorptionsphase. Dringen nun metastatische Tumorzellen in die Knochensubstanz ein, interferieren sie mit gewöhnlichen Knochenzellen mittels Cytokinen und Wachstumsfaktoren und stören die natürliche Balance des Knochenumsatzes [de la Piedra et al. 2003, S. 46]. Aus diesem Grund scheint es sinnvoll, biochemische Knochenstoffwechselmarker zur Diagnostik, Verlaufsbeobachtung und Follow-up als Folge dieses pathologischen Ungleichgewichtes im Knochenremodeling heranzuziehen.

Schon mehrere Studien hatten die Sensitivität und Spezifität einiger dieser Marker beleuchtet, um zwischen Patienten mit und ohne Metastasen bei bekanntem Prostatakarzinom zu differenzieren. So erschienen in einer Studie um L. F. A. Wymenga aus dem Urin gewonnenes DPD und Serum-BAP als die geeignetsten Prädiktoren für das Vorhandensein von Knochenmetastasen. Patienten mit Knochenmetastasen hatten dort signifikant höhere Werte als Patienten ohne skeletale Beteiligung respektive Patienten mit benigner Prostatahyperplasie [Wymenga et al. 2001, S. 234]. Dies deckt sich mit Ergebnissen von Pecherstorfer 1995 und Lorente 1996, denen im Serum von Patienten mit neoplastischen Knochenneubildungen ebenfalls erhöhte Werte von BAP aufgefallen waren [Pecherstorfer et al. 1995, S. 101] [Lorente 1996 et al., S. 1350]. Eine andere Arbeitsgruppe um P. Garnero, Lyon, Frankreich, versuchte die Aussagekraft verschiedener Knochenmarker im Therapieverlauf des metastasierten Prostatakarzinoms mit Bisphosphonaten zu evaluieren. Hierbei zeigte sich, dass unter Therapie zwar ein sehr schneller Abfall der Knochenresorptionsparameter, insbesondere auch von β -CTx, resultierte, wohingegen ein signifikanter Rückgang der Formationsparameter Osteocalcin und knochenspezifischer alkalischer Phosphatase weitgehend ausblieb [Garnero et al. 2000, S. 861ff]. Des weiteren fiel auch in dieser Studie die positive Korrelation aller knochenspezifischen Serummarker mit Anzahl und Ausdehnung von Knochenmetastasen ins Auge. Patienten mit einem Soloway-Score ≥ 2 wiesen im Vergleich zu Patienten mit einem Score < 2 signifikant höhere Werte von PICP, Osteocalcin, BAP und von β -CTx auf [Garnero et al. 2000, S. 860f].

Trotz dieser Erkenntnisse fiel im Rahmen der Untersuchungen eine mit im Mittel bei etwa 50 – 80% liegende, zu geringe Sensitivität dieser Marker auf, die ihre Aussagekraft im Hinblick auf eine mögliche Knochenbeteiligung erheblich einschränkt. Einen Ausweg auf dem Weg zur verbesserten diagnostischen Einschätzung des Vorhandenseins von Skelettmetastasen bei Prostatakarzinom sah Garnero jedoch in

ihrer Kombination mit dem weitaus sensitiveren PSA [Garnero et al. 2001, S. 190]. So konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität zur Diagnostik von Knochenmetastasen, etwa bei erhöhten BAP-Werten, 87,5% beträgt, bei einer Spezifität von 100%. Wurde nun die Messung von BAP mit der von PSA kombiniert, erhöhte sich die Sensitivität auf 98% bei gleich bleibender Spezifität [Lorente et al. 1996, S. 1350]. Konträre Aussagen hierzu bilden die Untersuchungen von C. de la Piedra. Auch er versuchte die Aussagekraft einer Gruppe von Knochenumbauparametern hinsichtlich der Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Prostatakarzinompatienten mit und ohne skelettale Beteiligung zu evaluieren. Als Resultat zeigte sich zwar ebenfalls eine signifikante Erhöhung der verwendeten Parameter - darunter BAP, PINP, β -CTx - in Gegenwart neoplastischer Knochenneubildungen, auffällig allerdings war entgegen allen bisherigen Studienergebnissen eine bei nahezu allen Markern berechnete Sensitivität von 100% (Ausnahme: BAP 92%). Die Spezifitäten variierten hingegen deutlich: Von Werten um 60% bis zu 100% bei PINP und β -CTx [de la Piedra et al. 2003, S. 51f]. Trotz bei geringen Patientenzahlen begrenzter Aussagekraft dieser Arbeit unterstützen de la Piedras Resultate insbesondere die Verwendung von PINP und β -CTx als Marker zur Separation von Prostatakarzinompatienten mit und ohne Knochenmetastasen. Während bisherige Studiendesigns ihr Hauptaugenmerk größtenteils auf Diagnostik und Untersuchung des Therapieverlaufes legten, gingen andere Arbeitsgruppen weiter. So analysierte R. Petrioli den Einfluss einiger Stoffwechselfparameter, sowie verschiedener anderer Faktoren wie Karnofsky-Index, Patientenalter, LDH und Ausmaß der Knochenbeteiligung auf das Überleben von Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom. Nach Beobachtung von 141 Studienpatienten zeigte sich, dass die Werte für BAP, PINP und CTx nicht mit der biologischen Aggressivität und der Heterogenität des Tumors korrelieren, dass sie keinen prognostischen Wert als Faktor für das Patientenüberleben darstellen [Petrioli et al. 2003, S. 51f]. Zu weiterführenden Ergebnissen hierzu kamen allerdings Jung et al., die sich überdies zusätzlicher Parameter bedienten. Prostatakarzinompatienten mit erhöhten Werten von OPG und BSP wiesen im Vergleich zu Patienten mit niedrigeren Markerkonzentrationen signifikant kürzere Überlebenszeiten auf. Bei den schon von R. Petrioli untersuchten Parametern PINP, BAP und CTx, sowie von BSP, NTx und TRAcP konnte eine Korrelation allerdings auch hier nicht eindeutig festgestellt werden [Jung et al. 2004, S. 785].

5.2. Diskussion verschiedener Parameter als Kriterium zur Begründung bzw. zum Monitoring einer palliativen Therapie mit Bisphosphonate

Das Prostatakarzinom ist, zusammen mit Mamma-, Schilddrüsen-, Nieren- und Lungenkarzinomen für etwa 80 % metastatischer Knochenabsiedlungen bei bösartigen Tumorerkrankungen verantwortlich. Die Tumorzellen breiten sich dabei gewöhnlich innerhalb der gut durchbluteten Bereiche des Skeletts wie der Wirbelsäule, der Rippen, des Schädels und der proximalen Enden der Röhrenknochen aus. Knochenmetastasen sind häufig symptomatisch und bei fortgeschrittenem Krankheitsprozess die Ursache signifikanter Morbidität und herabgesetzter Lebensqualität. Das klinische Beschwerdebild ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Knochenschmerzen, Leukopenien und Hypercalcämien, sowie pathologischen Frakturen und spinalen Kompressionssyndromen [Carlin et al. 2000, S. 2990]. Im Gegensatz zu Tumoren anderer Entitäten sind skelettale Metastasen beim Prostatakarzinom eher osteoblastischer Natur. Histologisch kommen die Knocheninfiltrationen in Form einer ausgeprägten Osteoidstruktur, sowie eines ungeordneten Geflechtknochens zur Darstellung. Dennoch gibt es histologischen und biochemischen Nachweis für das Vorhandensein erhöhter Knochenresorption [Papapoulos et al. 2000, S. 3048f], ein Indiz dafür, dass ein Kopplungsmechanismus zwischen Knochenformation und Knochenresorption existiert.

Zusammengenommen bilden diese Erkenntnisse die Grundlage für die Verwendung von Bisphosphonaten in der Behandlung von Patienten mit Prostatakarzinom, zumal sie schon im Management des in die Knochen metastasierten Mammakarzinoms [Hortobagyi et al 1996, S. 1787ff] und des multiplen Myeloms [Berenson et al 1996, S. 490ff] hinreichende therapeutische Effizienz bewiesen haben. Bisphosphonate, synthetische Substanzen, die selektiv in die mineralisierte Knochensubstanz eingebaut werden und die Knochenresorption hemmen, sind die Therapieoption der Wahl bei tumorassoziierten Hyperkalzämien, sowie bei osteolytischen Knochendestruktionen. Dazu werden sie während des Vorgangs des durch Osteoklasten bedingten Knochenabbaus kontinuierlich aus dem Knochen freigesetzt [Papapoulos et al. 2000, S. 3049]. Ihre Wirkungsweise beruht zum Einen auf ihrer direkten zellulären Toxizität, zum Anderen interagieren sie mit spezifischen intrazellulären Regulationsmechanismen in Osteoklasten. Die Unterschiede in ihrer Wirkungsweise sind in gewissen Besonderheiten im Aufbau der Molekülstruktur begründet. Bisphosphonate, die keinen Stickstoff in ihrem Gerüstaufbau enthalten, entfalten ihre Wirkung dadurch, dass sie intrazellulär zu für den Zellstoffwechsel toxischen Substanzen metabolisiert werden [Russell et al 1999, S. 61ff]. Stickstoffhaltige Bisphosphonate dagegen inhibieren spezifische Enzyme, die zur Hemmung der

Phenylierung eines GTP-bindenden Enzyms führen, das für die Integrität des Cytoskeletts und die intrazelluläre Signalgebung essentiell ist [van Beek et al 1999, S. 726f]. Die Osteoklasten werden in Folge inaktiviert und unterliegen einer verfrühten Apoptose, was wiederum eine signifikante Verringerung der knochendestruierenden Prozesse bewirkt. Außerdem gibt es zunehmende Hinweise darauf, dass Bisphosphonate auch direkte Anti-Tumoraktivität aufweisen, indem sie die Adhäsion von Tumorzellen an die Knochenmatrix, sowie deren Migration und Invasion behindern [Clezardin 2005, S. 3ff].

Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse stellt sich nun die Frage, welche Parameter zur Begründung und Verlaufskontrolle einer Therapie mit Bisphosphonaten am geeignetsten sind. Unter dem heutigen Stand der Technik, bei der vor allem bildgebende Maßnahmen zur Anwendung kommen, liegen bei der diagnostischen Einschätzung des Ausmaßes und des Verlaufes von Knochenmetastasen gewisse Einschränkungen vor. Generelle Verlaufskontrollen in Form von regelmäßigen Knochenszintigraphien oder Computertomographien zur Primärdiagnostik eventuell neu aufgetretener Skelettmetastasen weisen eine zu geringe Spezifität auf [de la Piedra et al. 2003, S. 45]. Außerdem müssten die teuren Untersuchungen in relativ kurzen Abständen durchgeführt werden, um den oftmals schnell fortschreitenden Krankheitsverlauf zeitnah darstellen zu können mit der Möglichkeit frühzeitiger therapeutischer Maßnahmen. Darüber hinaus hätten bildgebende Techniken zum Therapiemonitoring bei bereits vorhandenen Knochenmetastasen wohl zu wenig Aussagekraft, in Anbetracht der Tatsache, dass Patienten mit Prostatakarzinom, die palliativ mit Bisphosphonaten therapiert werden, gewöhnlich eine bereits sehr ausgeprägte Knochenbeteiligung aufweisen [Papapoulos et al. 2000, S. 3050]. Die unter Medikation erfahrungsgemäß nur relativ geringgradigen quantitativen Veränderungen in der Ausdehnung der skelettalen Manifestationen spiegeln sich szintigraphisch weitgehend nicht adäquat wider. Eine Forschungsgruppe um K. Lin untersuchte daher in weiterführenden Studien die prognostische Aussagekraft anderer Parameter im Hinblick auf die mögliche Entwicklung von Knochenmetastasen. Er stellte fest, dass Patienten mit einem Gleason Score ≥ 7 , einem PSA-Wert von mindestens 20 ng/dl oder das Vorliegen eines Prostatakarzinoms bestätigender Biopsiekerne zum Zeitpunkt der Erstdiagnostik ein höheres Risiko für das Auftreten metastatischer Knochenläsionen aufweisen. Allerdings kamen bei Szintigraphiekontrollen auch bei einer signifikanten Anzahl von Probanden ohne diese Risikofaktoren Knochenmetastasen zur Darstellung [Lin et al. 1999, S. 80f]. Weitere Komponenten, anhand derer der klinische Verlauf des Grades skelettaler Metastasierung veranschaulicht werden könnte, sind die Schmerzintensität und die darunter bestehende Lebensqualität. Es gibt Hinweise darauf, dass die

Schmerzausprägung bei Patienten mit metastatischer Knochenbeteiligung mit der Knochenresorptionsrate korreliert und dass deren Unterdrückung zu einer Verringerung von Knochenschmerzen führen kann. In einer Studie mit 52 durch schmerzhafte Knochenmetastasen auffällig gewordenen Patienten konnte J. Vinholes zeigen, dass durch palliative Behandlung mit Bisphosphonaten eine Verbesserung des klinischen Zustandes in Form einer Verringerung der Schmerzintensität erreicht werden kann [Vinholes et al. 1997, S. 1248f]. Auch Studiengruppen um R. E. Coleman 1996 und R. C. M. Pelger 1998 konnten bei Patienten mit von in die Knochen metastasierten Tumoren verschiedener Genese, unter anderem auch dem Prostatakarzinom, hervorgerufenen Knochenschmerzen, eine signifikante Verbesserung der Lebensqualität unter Bisphosphonat-Therapie nachweisen [Coleman et al. 1996, S. 40ff] [Pelger et al. 1998, S. 405ff]. Die Schmerzintensität scheint als Kriterium zur Darstellung des Krankheitsverlaufes allerdings zu schlecht objektivierbar, um zur Begründung beziehungsweise zur Festlegung des Zeitpunktes für den Beginn einer Therapie mit Bisphosphonaten in Frage zu kommen [Papapoulos et al. 2000, S. 3050]. Vinholes konnte 1997 aber zeigen, dass die Verbesserung der Lebensqualität unter Medikation mit der signifikanten Abnahme biochemischer Knochenresorptionsparameter einhergeht [Vinholes et al. 1997, S. 1248f]. Auch P. Garnero untersuchte die Aussagekraft verschiedener Knochenmarker im Therapieverlauf des metastasierten Prostatakarzinoms mit Bisphosphonaten. Hierbei zeigte sich ein sehr schneller, bis zu 70%-iger Abfall der Knochenresorptionsparameter, etwa von aus dem Serum und dem Urin gewonnenen β -CTx, [Garnero et al. 2000, S. 861ff]. Lyubimova et al. bewerteten zudem TRAcP als vielversprechenden Serummarker zur frühzeitigen Diagnostik von Knochenmetastasen, sowie zur Abbildung der Effizienz einer Therapie mit Bisphosphonaten [Lyubimova et al. 2004, S. 78f].

Ausgehend von diesen Erkenntnissen und vor dem Hintergrund der in Kapitel 5.1. diskutierten Studienergebnisse aus der internationalen Literatur scheinen biochemische Parameter die beste Aussagekraft sowohl in der Einschätzung des Vorhandenseins metastatischer Knochenbeteiligung, als auch zum Monitoring einer Bisphosphonat-Therapie im Hinblick auf die mögliche Entwicklung eines optimalen Behandlungsregimes zu haben.

5.3. Diskussion der diagnostischen Effizienz der untersuchten biochemischen Parameter

Die Studie hatte zum Ziel, Aufschluss über die diagnostische Effizienz von Knochenstoffwechselmarkern bei Patienten mit Prostatakarzinom und Knochenmetastasen zu gewinnen. Anhand des Verlaufes von PSA, der Knochenformationsmarker Osteocalcin und BAP und der Resorptionsmarker CTx und TRAcP von unter Chemotherapie mit einem Taxotere®-Präparat stehenden Patienten, wurde untersucht, inwieweit das Verhalten des pathologischen Knochenumbaus mit der Freisetzung der Knochenparameter korreliert. Hierzu wurden sie mit Faktoren wie Therapieerfolg, Metastasentyp, Metastasenanzahl, dem Metastasen- und Schmerzverlauf in Bezug gesetzt.

BAP, ein in der Plasmamembran von Osteoblasten vorliegendes Enzym, wird während des Mineralisationsprozesses des Knochens freigesetzt und gelangt dabei in die Blutzirkulation. Schon seit Jahren wird BAP als biochemischer Knochenformationsmarker zur Diagnostik und Verlaufsbeobachtung von Knochenmetastasen diskutiert [de la Piedra et al. 2003, S. 51]. In unseren Untersuchungen ist diese These weitgehend mit unseren Ergebnissen in Einklang zu bringen, wenngleich die gewonnenen Resultate aufgrund der niedrigen Probandenanzahl keine statistische Signifikanz erreichten. So zeigte sich bei BAP eine positive Korrelation zum während des Dokumentationszeitraumes verzeichneten Verlauf unter Chemotherapie mit Taxotere®. Patienten, die angesichts des Verlaufes ihrer Krankheitsparameter einen messbaren Therapieerfolg erzielen konnten, wiesen, den Erwartungen aus früheren Studienergebnissen entsprechend, tendentiell auch einen Rückgang der gemessenen BAP-Werte auf. Dazu passt auch das Verhalten des Markers hinsichtlich des objektivierten Schmerzverhaltens der Probanden als einer der Kriterien zur Einschätzung des Therapiefortschrittes. Auch hier korrelierte der Parameter in seinem Verlauf mit der Schmerzintensität. Nahm die Lebensqualität der Patienten infolge zunehmender Schmerzen eher ab, kam es zu einem Anstieg von BAP. Bei Besserung der Symptomatik konnte eine Reduktion der Werte verzeichnet werden. Lediglich der Verlauf der Skelettmetastasierung ließ sich nicht eindeutig widerspiegeln. Zwar sanken die Mittelwerte des Markers unter bei chemotherapeutischer Behandlung regredienten Skelettmetastasen, ein korrespondierendes Verhalten in der Gruppe der Patienten mit progredienter Knochenbeteiligung konnte allerdings nicht festgestellt werden. Diese Resultate decken sich weitgehend mit den Ergebnissen aus der Literatur. In Arbeiten von C. de la Piedra und J. A. Lorente wies BAP eine hohe Sensitivität und Spezifität im Nachweis und der Beurteilung des Ausmaßes von Knochenmetastasen auf [de la Piedra et al. 2003, S. 51f] [Lorente et al. 1996, S. 1349f]. Auch bei den Probanden

unserer Studie waren die BAP-Werte vor Beginn der Chemotherapie in Entsprechung der dokumentierten Metastasen meist weit über die Normwerte hinaus erhöht. Eine Korrelation zum Verhalten der Skelettläsionen konnte jedoch in seiner Eigenschaft als Knochenformationsmarker nicht gezeigt werden. Auch P. Garnero konnte nur einen signifikanten Nutzen von Knochenresorptionsmarkern wie β -CTX zur Therapiekontrolle des metastasierten Prostatakarzinoms nachweisen, wohingegen BAP als Verlaufsparemeter nicht geeignet erschien [Garnero et al. 2000, S. 861ff].

Betrachtet man hingegen das individuelle Krankheitsverhalten, fällt insbesondere bei Patienten mit sehr hohen Ausgangswerten eine adäquate Abbildung des Therapieerfolges auf den BAP-Verlauf auf.

Im Gegensatz zu diesen weitgehend vielversprechenden Resultaten, verfügten die anderen verwendeten Serummarker wider Erwarten über eine nur eingeschränkte Aussagekraft im Hinblick auf die klinischen Untersuchungsergebnisse der Probanden. So spiegelten Osteocalcin in seiner Eigenschaft als Knochenformationsparemeter und CTx als Resorptionsmarker in ihrem Verlauf zwar weitgehend den Schmerzprogress der Studienpatienten wider, CTx korrelierte darüber hinaus im Wesentlichen auch mit dem Therapieverlauf. Bei den Probanden, die unter Therapie eine Befundverbesserung erzielen konnten, waren die CTx-Werte im Mittel tendentiell leicht rückläufig. Beide Paremeter bildeten aber weder das Metastasenverhalten, noch den Typ der skelettalen Läsionen ab. Insbesondere bei Osteocalcin decken sich diese Ergebnisse mit der internationalen Literatur. So beschrieben schon Koizumi et al. die Messung von Osteocalcin in Serum und Urin als von eingeschränkter Aussagekraft in der Bewertung metastatischer Knochenanreicherungen [Koizumi et al. 1997, S. 1603f]. Die eingeschränkte Korrelation von OC mit dem Ausmaß von skelettalen Metastasen wird begründet mit Befunden, die sich beim M. Paget ergeben hatten. Hier zeigte sich, wie beim Prostatakarzinom, eine signifikante Erhöhung des Knochenumsatzes mit der Bildung neuen Geflechtknochens. Dabei wird eine Fraktion des von den Osteoblasten gebildeten Enzyms in die Knochenmatrix eingebaut, ein weiterer Teil gelangt in die Blutzirkulation. Nimmt nun die Aktivität der Osteoblastentätigkeit während der Bildung der Mehranreicherungen im Rahmen des Krankheitsprozesses zu, resultiert daraus, so glaubt man, der Einbau eines zunehmenden Anteils neu synthetisierten Osteocalcins in den dabei vermehrt entstehenden Geflechtknochen [Delmas et al. 1986, S. 60f]. Folge ist die Freisetzung einer geringeren Menge in den Blutkreislauf und die somit geringe Sensitivität des Serummarkers bei der Evaluation des Ausmaßes von Knochenmetastasen. CTx dagegen wurde im Allgemeinen durchwegs als Paremeter beschrieben, anhand dessen das Verhalten skelettaler Läsionen adäquat abgebildet werden kann [Garnero 2001, S. 188ff]. Zudem schien er als reiner Knochenmarker dem Stellenwert von PSA als prognostischem Marker überlegen zu sein [Akimoto et al. 1998,

S. 102]. Die in die Blutzirkulation freigesetzte PSA-Fraktion ist nämlich nicht nur abhängig vom Grad der Differenzierung des Primärtumors, sondern in seiner Eigenschaft als vom Prostataparenchym freigesetzte Serinprotease insbesondere auch von dem eventuellen Vorliegen von Absiedlungen in anderen Körpergeweben [Akimoto et al. 1998, S. 102]. **Die fehlende Korrelation von CTx mit dem Verhalten der Skelettmetastasen in dieser Studie ist daher möglicherweise durch die hohe Komorbidität und die Immobilisation der größtenteils, für das Krankheitsbild des Prostatakarzinoms typischerweise, alten Patienten zu begründen.** Chronische Nierenerkrankungen mit resultierendem veränderten Knochenstoffwechsel, degenerativ osteoporotische Umbauprozesse, sowie immobilitätsbedingte Knochensubstanzverluste infolge erhöhter Morbidität sind bei derartigem Krankengut weit verbreitet und nehmen möglicherweise größeren Einfluss auf das Verhalten von CTx im Therapieverlauf. Andererseits liefert auch die geringe Anzahl der beurteilten Serumproben eine mögliche Erklärung für die fehlende Sensitivität des Resorptionsparameters.

Als weiteren Knochenabbauparameter untersuchten wir die Korrelation von TRAcP 5b, ein, wie schon in Kapitel 1.6.2. beschrieben, insbesondere in Lysosomen von Osteoklasten vorkommendes Enzym, mit dem Ausmaß des Vorhandenseins von Knochenmetastasen. In mehreren vorangegangenen Arbeiten war TRAcP 5b als ein Parameter beurteilt worden, der quantitative Veränderungen von Knochenstoffwechselfvorgängen adäquat abbilden kann [Jung et al. 2004, S. 787f] [Koizumi et al. 2003, S. 4097f] [Lyubimova et al. 2004, S. 78f] [Ureña 1998, S. 164f] und zeigte sich teilweise schon bei nur sehr geringer Metastasenlast erhöht [Koizumi et al. 2003, S. 4097]. Bei Jung et al. wurde TRAcP überdies als möglicher Prädiktor für die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit in die Knochen metastasiertem Prostatakarzinom gewertet [Jung et al. 2004, S. 785]. In dieser Studie konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. TRAcP 5b bildete weder die Metastasenausbreitung und deren Verlauf, noch die sich verändernden Bedingungen im Therapieverlauf ab. Trotz bei einer Vielzahl unserer Probanden szintigraphisch dokumentiert sehr hoher Metastasenlast waren die Werte nur geringgradig über die Norm hinaus erhöht. Auch eine positive Korrelation zum Schmerzverhalten der Patienten konnte nicht gesehen werden. **Insgesamt gesehen erwies sich TRAcP in dieser Untersuchung als der am wenigsten geeignetste Parameter,** um die skelettalen Stoffwechselprozesse adäquat darzustellen, zumal sich auch der individuelle Werteverlauf der einzelnen Probanden nicht mit dem Metastasenverhalten im Therapieverlauf in Einklang bringen ließ.

PSA hingegen war der Serummarker, der sich in dieser Arbeit als der überlegenste Marker zur Veranschaulichung knochenspezifischer

Stoffwechselprozesse bei Prostatakarzinomen zeigte. Er bildete sowohl den Therapieverlauf, als auch das Metastasenausmaß und deren Verhalten ab, unabhängig vom Typ der Läsionen. Betrachtet man die einzelnen Patienten, war PSA je nach Ausprägung der Metastasen weitgehend um ein Vielfaches über die Normwerte erhöht und reagierte, ähnlich dem BAP, sehr sensibel und zumeist schon in der Frühphase der Chemotherapie mit teilweise sprunghaftem Werteabfall. Diese enge Korrelation kam auch im Hinblick auf das Schmerzverhalten zur Darstellung. Nahmen die Beschwerden der Patienten innerhalb des Dokumentationszeitraums eher ab, kam es tendentiell auch zu einer deutlichen Reduktion der PSA-Mittelwerte. Interindividuelle Unterschiede entsprechend des Differenzierungsgrades des Prostatakarzinoms, der sich an dem sogenannten Gleason-Score orientiert, der den Malignitätsgrad des Tumors anhand der bioptisch vorliegenden Zellarchitektur einteilt, fielen dabei nicht ins Gewicht. So lagen die PSA-Werte bei Patienten mit Tumorgewebe niedriger Differenzierung und geringerer Metastasenanzahl, verglichen mit Patienten, deren Tumorzellen bei höherer Anzahl skelettaler Läsionen einen höheren Differenzierungsgrad aufwiesen, nicht unbedingt in quantitativ tieferen Bereichen.

5.4. Basalbestimmungen von PSA und BAP als geeignete Möglichkeit zur individuellen klinischen Verlaufskontrolle

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass PSA und BAP bei Patienten mit Knochenmetastasen bei Prostatakarzinom als geeignete Parameter erscheinen, um deren klinischen Verlauf adäquat darzustellen und um den Krankheitsverlauf im Hinblick auf eine individuelle und optimierte Therapieentscheidung besser objektivieren zu können. Beide Marker waren bei Vorliegen von Knochenmetastasen zumeist weit über die Normwerte hinaus erhöht und waren bei dokumentiert positiv verlaufendem Therapieverlauf unter Chemotherapie tendentiell stark rückläufig. Zudem ließ sich auch das Schmerzverhalten der Patienten durch beide Kenngrößen sehr gut darstellen.

Ausschlaggebend für die zukünftige Verwertung dieser Resultate scheint allerdings die patientenbezogene, intraindividuelle Betrachtung der gewonnenen Serum-Werte zu sein. Obwohl bei Vorliegen von Skelettmetastasen durchgehend erhöht, verhielten sich die Werteverläufe der einzelnen Probanden interindividuell weitgehend unabhängig von der szintigraphisch dokumentierten Anzahl der Metastasen. So wiesen Probanden mit vergleichbarer Ausprägung skelettaler Läsionen, auch bei histologisch ähnlichem Differenzierungsgrad des Tumorgewebes, höchst unterschiedliche Serumwerte auf.

Patientenspezifisch zeigte sich, gemessen am individuellen Ausgangswert, allerdings eine deutliche Korrelation des Verhaltens von BAP und PSA zum Therapieverlauf.

Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse erscheinen Basalbestimmungen von Serum-PSA und -BAP bei Patienten mit neu diagnostizierten skelettalen Metastasen bei Prostatakarzinom beziehungsweise regelmäßige Verlaufskontrollen ein nützliches Instrument zum Monitoring einer Therapie mit Chemotherapeutika oder Bisphosphonaten, sowie zur Individualisierung des jeweiligen Therapieschemas zu sein. Eine Kombination beider Parameter ist aus zwei Gründen sinnvoll. Wie schon in Kapitel 5.3. erwähnt, ist PSA als prostatagewebsspezifischer Marker oft auch bei Patienten mit Prostatakarzinomen ohne Nachweis skelettaler Läsionen erhöht [Garnero 2001, S. 189]. Außerdem ist die Höhe des PSA-Wertes im Serum und Urin abhängig vom Differenzierungsgrad des Tumorzellgewebes [Akimoto et al. 2001, S. 102]. Die daraus resultierende zu geringe Spezifität in der Diagnostik und Verlaufsbeurteilung von Knochenmetastasen kann durch Kombination mit BAP auf bis zu 100% erhöht werden, bei einer Sensitivität von 96 % [Lorente et al. 1996, S. 1350]. Gegebenenfalls erforderliche Adaptionen des Therapieregimes auf sich verändernde skelettale Umbauprozesse können nun möglicherweise frühzeitiger und zeitnäher erfolgen. Die für gewöhnlich mit zunehmender Knochenmetastasierung einhergehenden Knochenschmerzen wären dadurch besser zu kontrollieren mit dem Resultat einer weitaus besseren Lebensqualität der betroffenen Patienten.

Ziel sollte allerdings die präventive Nutzung von Bisphosphonaten sein. Hierzu werden allerdings Studien nötig sein mit der Intention, Patienten, die ein hohes Risiko für die Entwicklung von Skelettmetastasen aufweisen, bereits vor deren Entstehung ausfindig zu machen. Da Knochenabsiedlungen beim Prostatakarzinom, wie bereits erwähnt, gewöhnlich osteoblastischer Natur sind, könnten Knochenmarker osteoblastären Ursprungs, neben PSA, möglicherweise geeignete Prädiktoren für beginnende Knochenmetastasen beim Prostatakarzinom sein. Untersuchungen von Paul et al. hierzu etwa zeigten, dass bei PSA-Werten von unter 10 ng/ml und normalen Werten von Gesamt-AP bzw. BAP nur ein sehr geringes Risiko für Knochenmetastasen besteht. Patienten mit über diese Bereiche hinaus erhöhten Werten sollten dagegen bei dann signifikant erhöhtem Metastasierungsrisiko ein weiterführendes Knochenstaging durch eine Skelettszintigraphie erhalten. Denn aufgrund ihrer höheren Sensitivität kann die Knochenszintigraphie auch laut dieser Studie nicht durch die Serumparameter ersetzt werden [Paul et al. 2000, S. 45f]. Bei Patienten mit neu diagnostiziertem Prostatakarzinom ohne skelettale Beteiligung wäre daher die Suche nach neuen, möglicherweise sensitiveren prognostischen Faktoren vonnöten. Bereits vorliegende Daten zeigen, dass erhöhte Serumwerte von Knochen-Sialoprotein bei nicht-metastasiertem Mammakarzinomen mit einem hohem Risiko konsekutiver

Knochenläsionen einhergehen [Diel et al. 1999, S. 3916ff]. Diese Ergebnisse sollten durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

6. Zusammenfassung

Knochenmetastasen treten beim Prostatakarzinom bei über 75% der betroffenen Patienten auf. Zur bestmöglichen Behandlung im Hinblick auf eine verbesserte Lebensqualität und Prognose der Erkrankung ist allerdings die frühestmögliche Diagnostik dieser Knochenmetastasen und deren Verlaufskontrolle, etwa im Rahmen einer Therapie mit Bisphosphonaten, von Bedeutung. Bisher diente die Knochenszintigraphie als Methode der Wahl zur Diagnostik skelettaler Läsionen. Sie weist bei hoher Sensitivität allerdings eine nur geringe Spezifität auf. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die diagnostische Effizienz von Knochenstoffwechselfparametern bei Patienten mit Prostatakarzinom und Knochenmetastasen zu prüfen. Hierzu wurden Seren von 15 Probanden im Verlauf einer Chemotherapiestudie rekrutiert. Anhand spezifischer Immunoassays wurde das Verhalten von PSA (Prostata-spezifisches Antigen), der Knochenformationsparameter BAP (knochenspezifische alkalische Phosphatase) und OC (Osteocalcin), sowie der Resorptionsmarker β -CTX (Carboxyterminales Kollagen Typ I Telopeptid) und TRAcP 5b (Tartrat-resistente saure Phosphatase) im Hinblick darauf untersucht, inwieweit der pathologische Knochenumbau mit der Freisetzung der Knochenparameter korreliert. Vor diesem Hintergrund wurden sie mit Faktoren wie Therapieerfolg, Metastasentyp, Metastasenanzahl, Metastasen- und Schmerzverlauf in Bezug gesetzt. Dabei zeigte sich, dass insbesondere BAP und PSA den klinischen Verlauf von Patienten mit Prostatakarzinom und Knochenabsiedlungen am geeignetsten darstellen. Ihre im Serum gemessenen Werte waren durchwegs erhöht und unter erfolgreicher Therapie beziehungsweise abnehmenden Schmerzen tendentiell rückläufig. Am Deutlichsten kam diese Korrelation bei der patientenspezifischen Betrachtung des Verhaltens der beiden Parameter, ausgehend von einem individuellen Ausgangswert, zur Darstellung. Diese Resultate bekräftigen den Nutzen von Basalbestimmungen von BAP und PSA, um den Krankheitsverlauf im Hinblick auf ein individuelles und optimiertes Therapieregime besser objektivieren zu können. Bei Patienten mit in die Knochen metastasiertem Prostatakarzinom lässt sich anhand einer anfänglichen Serumbestimmung in Kombination mit weiteren Verlaufskontrollen ein optimales Therapiemonitoring erreichen, etwa bei einer palliativen Medikation mit Bisphosphonaten. Dadurch ist eine zeitnähere Adaption des Therapieprozederes an sich ändernde Erfordernisse im Rahmen des Krankheitsprozesses möglich und bedingt eine Steigerung der Lebensqualität durch Schmerzreduktion und Verringerung der Komplikationsrate.

Im Hinblick auf das Ziel einer präventiven Nutzung von Bisphosphonaten wird es allerdings notwendig sein, High-Risk-Patienten im Hinblick auf die Entwicklung von Knochenmetastasen bereits vor deren Auftreten auffindig zu machen.

Entgegen den Erwartungen zeigte das Verhalten der übrigen Serumparameter CTx, TRAcP und OC keine Korrelation zum Krankheitsverlauf von Patienten mit Prostatakarzinom und Knochenmetastasen. Bei der üblicherweise hohen Komorbidität und Immobilisierung des für dieses Krankheitsbild typischen Patientenguts und der infolgedessen zu hohen Sensitivität bei zu geringer Spezifität der Knochenmarker ist davon auszugehen, dass auch in zukünftigen, möglicherweise größer angelegten Studien ähnliche Ergebnisse resultieren werden.

7. Anhang

Literaturverzeichnis

Akimoto, S., Furuya, Y., Akakura, K., Ito, H.

Comparison of markers of bone formation and resorption in prostate cancer patients to predict bone metastasis.

Endocrine J 45 (1998) 97-104

Beck, T.

Der Knochenstoffwechsel – ein stoffwechselaktives Gewebe.

Pharmazeutische Zeitung 30 (2003)

van Beek, E., Löwik, C., van der Pluijm, G., Papapoulos, S.

The role of geranylgeranylation in bone resorption and its suppression by bisphosphonates in fetal bone explants in vitro: a clue to the mechanism of action of nitrogen-containing bisphosphonates.

J Bone Miner Res 14 (1999) 722-729

Berenson, J. R., Lichtenstein, A., Poter, L., Di MoPoulos, M. A., Bordini, C., George, S., Lipton, A., Keller, A., Ballester, O., Koracs, M. J. V., Blacklock, H. A., Bell, R., Simeone, J., Reitsma, D. J., Heffernan, P. D., Seaman, J., Knight, R. D.

Efficiency of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced myeloma
N Engl J Med 334 (1996) 488-493

Brown, J. M., Vessella, R. L., Kostenuik, P. J., Dunstan, C. R., Lange, P. H., Corey, E.
Serum osteoprotegerin levels are increased in patients with advanced prostate cancer.

Clin Cancer Res 7 (2001) 2977-2983

Carlin, B. I., Andriole G. L.

The natural history, skeletal complications, and management of bone metastases in patients with prostate carcinoma.

Cancer 88 (2000) 2989-2994

Caulfield, M. P.

Alternate markers for biochemical assessment of bone turnover.

J Clin Ligand Assay 21 (1998) 149-158

Clarke, N. W., McClure, J., George, N. J. R.

Morphometric evidence for bone resorption and replacement in prostate cancer.

Brit J Urol 68 (1991) 74-80

Clezardin, P.

Anti-tumour-activity of zoledronic acid.

Cancer Treat Rev 31 (2005) 1-8

Coleman, R. E., Purohit, O. P., Vinholes, J.

Improved quality of life with high dose bisphosphonate treatment: the UK experience.

In: Bisphosphonates – improved treatment of osteolysis in malignant and non-malignant indications.

Possinger, K., Ziegler, R. (Hrsg.), Ciba Geigy Verlag,

Wehr/Baden 1996, 37-48

Coleman, R. E.

Skeletal complications of malignancy.

Cancer 80 (1997) 1588-1594

Coleman, R. E.

Monitoring of bone metastasis.

Eur J Cancer 34 (1998) 252-259

Cook, G. F. R., Fogelman, I.

Diagnosis and monitoring on bone metastases: scintigraphy.

In: Tumor bone diseases and osteoporosis in cancer patients. Pathophysiology, diagnosis and therapy.

Body, J. J. (Hrsg), New York, Marcel Dekker 2000, 131-154

Delmas, P. D., Demiaux, B., Malaval, L., Chapuy, M. C., Meunier, P. J.

Serum-bone-GLA-protein is not a sensitive marker of boneturnover in Paget´s disease of bone.

Calcif Tissue Int 38 (1986) 60-61

Demers, L. M.

Biochemical markers in the management of patients with metastatic bone disease.

Clin Chem 45 (1999) 1131-1132

Demers, L. M., Costa, L., Lipton, A.

Biochemical markers and skeletal metastases.

Cancer 88 (2000) 2919-2926

Diegelmann, R. F.

Collagen metabolism.

Wounds 13 (2001) 177-182

Diel, I. J., Solomayer, E. F., Seibel, M. J.

Serum bone sialoprotein in patients with primary breast cancer is a prognostic marker for subsequent bone metastases.

Clin Cancer Res 5 (1999) 3914-3919

Ducy, P., Schinke, T., Karsenty, G.

The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance.

Science 289 (2000) 1501-1504

Edelson, G. W., Kleerekoper, M.

The use of bone markers in osteoporosis.

J Clin Ligand Assay 21 (1998) 96-101

Fraser, W. D.

The collagen crosslinks pyridinoline and deoxypyridinoline: A review of their biochemistry, physiology, measurement, and clinical applications.

J Clin Ligand Assay 21 (1998) 102-110

Fontana, A., Delmas, P. D.

Markers of bone turnover in bone metastases.

Cancer 88 (2000) 2952-2960

Garnero P., Buchs N., Zekri J., Rizzoli R., Coleman R. E., Delmas P. D.,

Markers of bone turnover for the management of patients with bone metastases from prostate cancer.

Br J Cancer 82 (2000) 858-864

Garnero, P.

Markers of bone turnover in prostate cancer.

Cancer Treat Rev 27 (2001) 187-192

Guise, T. A.

Molecular mechanisms of osteolytic bone metastasis.

Cancer 88 (2000) 2892-2898

Gundberg, C. M.

Biology, physiology, and clinical chemistry of osteocalcin.

J Clin Ligand Assay 21 (1998) 128-138

Hortobagyi, G. N., Theriault, R. L., Porter, L., Blayney, D., Lipton, A., Sinoff, C.,

Wheller, H., Simeone, J.F., Seaman, J., Knight, R. D., Heffernan, M., Reitsman, D. J.

Efficiency of pamidronate in reducing skeletal events in patients with breast cancer and lytic bone metastases.

N Engl J Med 335 (1996) 1785-1791

Jung, K., Lein, M., Stephan, C., von Hoesslin, K., Semjonow, A., Sinha, P., Loenong, S. A., Schnorr, D.

Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications.

Int J Cancer 111 (2004) 783-791

Kanis, J. A.

Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: Synopsis of a WHO report.

Osteoporosis Int 4 (1994) 368-381

Keck, A.-V., Pecherstorfer, M.

Knochenstoffwechsel bei malignen Erkrankungen.

J Miner Stoffwechs 10 (2003) 6-11

Kress, B. C.

Bone alkaline phosphatase: methods of quantitation and clinical utility.

J Clin Ligand Assay 21 (1998) 139-148

Koizumi, M., Maeda, H., Yoshimura, K., Yamauchi, T., Kawai, T., Ogata, E.

Dissociation of bone metabolic markers in bone metastasis of prostate cancer.

Br J Cancer 75 (1997) 1601-1604

Koizumi, M., Takahashi, S., Ogata, E.

Comparison of serum bone resorption markers in the diagnosis of skeletal metastasis.
Anticancer Res 23 (2003) 4095-4099

Lee, M. H., Javed, A., Kim, H. J., Shin, H. I., Gutierrez, S., Choi, J. Y., Rosen, V., Stein, J. L., von Wijnen, A. J., Stein, G. S., Lian, J. B., Ryoo, H. M.

Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 in C2C12 myogenic cells coincidence with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblastic differentiation.

J Cell Biochem 73 (1999) 114-125

Liu, B. Y., Guo, J., Lanske, B., Divieti, P., Kronenberg, H. M., Bringhurst, F. R.

Conditionally immortalized murine bone marrow stromal cells mediate parathyroid hormone-dependent osteoclastogenesis in vitro.

Endocrinology 139 (1998) 1952-1964

Logothetis, C. J., Lin, S.-H.

Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone.

Nat Rev Cancer 5 (2005) 21-28

Lorente J. A., Morote J., Raventos C., Encabo G., Valenzuela H.

Clinical efficiency of bone alkaline phosphate and prostate specific antigen in the diagnosis of bone metastasis in prostate cancer.

J Urol 155 (1996) 1348 – 1351

Lyubimova, N. Y., Pashkov, M. V., Tyulyandin, S. A., Goldberg, V. E., Kushlinskii, N. E.

Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of bone metastases in patients with breast cancer and prostate cancer.

Bull Exp Biol Med 138 (2004) 77-79

Mallinak, N. J. S., Clemens, J. D.

Crosslinked N-telopeptides of bone collagen: a marker of bone resorption.

J Clin Ligand Assay 21 (1998) 111-117

Mikuz, G.

Männliche Geschlechtsorgane.

In: „Pathologie“

Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U. (Hrsg.), Urban & Fischer Verlag,

München - Jena, 2001, 2. Auflage, 817-840

Miyamoto, K. K., McSherry, S. A., Robins, S. A., Besterman, J. M., Mohler, J. L.
Collagen cross-link metabolites in urine as markers of bone metastases in prostatic carcinoma.

J Urol 51 (1994) 909-913

Okada, Y., Moromoto, I., Ura, K., Watanabe, K., Eto, S., Kumegawa, M., Raisz, L., Pilbeam, C., Tanaka, Y.

Cell-to-cell adhesion via intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1 pathway is involved in $1-\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, PTH and IL- 1α -induced osteoclast differentiation and bone resorption.

Endocr J 49 (2002) 483-495

Orr, F. W., Lee, J., Duivenvoorden, W. C. M., Singh, G.

Pathophysiologic interactions in skeletal metastasis.

Cancer 88 (2000) 2912-2918

Partin, A. W., Oesterling, J. E.

The clinical usefulness of prostate specific antigen.

J Urol 152 (1994) 1358-1368

Paul, R., Bottermann, P., Breul, J., Hartung, R.

Isoenzymes of alkaline phosphatase – useful parameters for identification of bone metastasis in prostatic carcinoma?

Onkologie 23 (2000) 42-46

Papapoulos, S. E., Hamdy, N. A. T., Pluijm, G.

Bisphosphonates in the management of prostate carcinoma metastatic of the skeleton.

Cancer 88 (2000) 3047-3053

Pecherstorfer, M., Zimmer-Roth, I., Schilling, T., Woitge, H. W., Schmidt, H., Baumgartner, G., Thiébaud, D., Ludwig, H., Seibel, M. J.

The diagnostic value of urinary pyridinium cross-links of collagen, alkaline phosphatase and urinary calcium excretion in neoplastic bone disease.

J Clin Endocrinol Metab 80 (1995) 97-103

Pedersen, B. J., Ravn, P., Bonde, M.

Type I collagen C-telopeptide degradation products as bone resorption markers.
J Clin Ligand Assay 21 (1998) 118-127

Pelger, R. C. M., Hamdy, N. A. T., Zwinderman, A. H., Lycklama, A. H. B., Nijeholt, A., Papapoulos, S. E.
Effects of bisphosphonate olpadronate in patients with carcinoma of the prostate metastatic to the skeleton.
Bone 22 (1998) 403-408

Petrioli, R., Rossi, S., Caniggia, M., Pozzessere, D., Messinese, S., Sabatino, M., Marsili, S., Correale, P., Salvestrini, F., Manganeli, A., Francini, G.
Analysis of biochemical bone markers as prognostic factors for survival in patients with hormone-resistant prostate cancer and bone metastases.
Urology 63 (2004) 321-326

de la Piedra, C., Castro-Errecaborde, N.-A., Traba, M. L., Méndez-Davila, C., García-Moreno, C., de Acuña, L. R., Rodríguez-Molina, J.
Bone remodeling markers in the detection of bone metastases in prostate cancer.
Clin Chim Acta 331 (2003) 45-53

Pollen, J. J., Witztun K. F., Ashburn W. L.
The flare phenomenon on radionuclide bone scan in metastatic bone cancer.
Am J Radiother 142 (1984) 773 - 776

Price, J. S.
Biochemical markers of bone metabolism in horses: potentials and limitations?
Vet J 156 (1998) 163-165

Riede, U.-N., Köhler, G., Orłowska-Volk, M., Schwarzkopf, G.
Tumorpathologie – Tumorklassifizierung: Beispielhafte Organkarzinome.
In: „Taschenatlas der allgemeinen Pathologie“,
Riede, U.-N. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag,
Stuttgart - New-York, 1998, 320-385

Risteli, J., Elomaa, I., Niemi, S., Novamo, A., Risteli, L.
Radioimmunoassay for the pyridinoline cross-linked carboxy-terminal telopeptides of type I collagen: a new serum marker of bone collagen degradation.
Clin Chem 39 (1993) 635-40

Rosenbrock, H., Seiffert-Klauss, V., Kaspar, S., Busch, R., Lupp, P. B.
Changes of biochemical bone markers during the menopausal transition.
Clin Chem Lab Med 40 (2002) 143-151

Russell, R. G. G., Rogers, M. J., Frith, J.C., Luckman, S.P., Coxon, F. P., Benford, H. L.,
et al.
The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanism of
action.
J Bone Miner Res 14 (1999) 56-65

Sakuma, Y., Tanaka, K., Suda, M., Yasoda, A., Natsui, K., Tanaka, I., Ushikubi, F.,
Narumiya, S., Segi, E., Sugimoto, Y., Ichikawa, A., Nakao, K.
Crucial involvement of the EP4 subtype of prostaglandin E receptor in osteoclast
formation by proinflammatory cytokines and lipopolysaccharide.
J Bone Miner. Res. 15 (2000) 218-227

Schiebler, T. H.
Bindegewebe.
In: „Histologie“
Schiebler, T. H., Junqueira, L. C., Carneiro, J. (Hrsg.), Springer-Verlag,
Berlin-Heidelberg-New York 1996, 4. Auflage, 140-171

Schiebler, T. H.
Knochen und Knochenverbindungen.
In: „Histologie“
Schiebler, T. H., Junqueira, L. C., Carneiro, J. (Hrsg.), Springer-Verlag,
Berlin - Heidelberg - New York 1996, 4. Auflage, 190-217

Schoppet, M., Preissner, K. T., Hofbauer, L. C.
RANK ligand und osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and
vascular function.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 22 (2002) 549-553.

Seibel, M. J., Stracke, H.
Metabolische Osteopathien, Stuttgart-New York 1997.

Sokoll, L. J., Kroll, M. H., Levine, M. A., Poordad, F. F., Chan, D. W.

Bone to total alkaline phosphatase ratios improve sensitivity and specificity of bone alkaline phosphatase immunoassays.

Clin Biochem 30 (1997) 625-629

Takeda, S., Yoshizawa, T., Nagai, Y., Yamato, H., Fukumoto, S., Sekine, K., Kato, S., Matsumoto, T., Fujita, T.

Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells: studies using knockout mice.

General and Comparative Endocrinology 140 (1999) 1005-1008

Teitelbaum, S. L.

Bone resorption by osteoclasts.

Science 289 (2000) 1504-1508

Ureña, P.

Plasma biochemical markers of bone remodeling in patients with renal insufficiency.

J Clin Ligand Assay 21 (1998) 159-170

Urwin, G. H., Percival, R. C., Harris, S., Beneton, M. N. C., Williams, R. C., Kanis, S. A.

Generalised increase in bone resorption in carcinoma of prostate.

Eur J Urol 57 (1985) 721-723

Vinholes, J. F. F., Purohit, O. P., Abbey, M. E., Eastell, R., Coleman, R. E.

Relationships between biochemical and symptomatic response in a double-blind randomised trial of pamidronate for metastatic bone disease.

Ann Oncol 8 (1997) 1243-1250

Wang, D., Christensen, K., Chawla, K., Xiao, G., Krebsbach, P. H., Franceschi, R. T.

Isolation and characterisation of MC3T3-E1 preosteoblast subclones with distinct in vitro and in vivo differentiation/mineralisation potential.

J Bone Miner. Res. 14 (1999) 893-903

Westerhuis, L. W. J. J. M., Delaere, K. P. J.

Diagnostic value of some biochemical bone markers for the detection of bone metastases in prostate cancer.

Eur J Clin Chem Clin Biochem 35 (1997) 89-94

Withold, W., Georgescu, G., Khakzad, H., Vosberg, H., Müller-Gärtner, H. W., Reinauer, H.

Simultaneous assessment of bone collagen synthesis and degradation in patients with different malignant tumors – comparison with the results of ^{99m}Tc-methylene bisphosphonate bone scintigraphy.

Eur J Clin Chem Clin Biochem 33 (1995) 479-485

Woitge, H. W., Pecherstorfer, M., Horn, E., Keck, A.-V., Diel, I. J., Bayer, P., Ludwig, H., Ziegler, R., Seibel, M. J.

Serum bone sialoprotein as a marker of tumour burden and neoplastic bone involvement and as a prognostic factor in multiple myeloma.

Br J Cancer 84 (2001) 344-351

Woitge, H. W., Horn, E., Keck, A. V., Auler, B., Seibel, M. J., Pecherstorfer, M. Biochemical markers of bone formation in patients with plasma cell dyscrasias and benign osteoporosis.

Clin Chem 47 (2001) 686-693

Wymenga, L. F. A., Groenier, K., Schuurman, J., Boomsma, J. H. B., Elferink, R. O., Mensink, H. J. A.

Pretreatment levels of urinary deoxypyridinoline as a potential marker in patients with prostate cancer with or without bone metastasis.

BJU International 88 (2001) 231-235

Abkürzungsverzeichnis

BAP	Knochenspezifische alkalische Phosphatase (bone specific alkaline phosphatase)
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Bone Multicellular Unit
BSP	Knochen-Sialoprotein (bone sialoproteine)
CTx	Carboxy-terminales Telozeptid (CrossLaps)
DPD	Desoxypyridinolin
IGF	Insulin-like-Growth-Factor
IL	Interleukin
ICTP	Carboxy-terminales Telozeptid von Typ I Kollagen
NTx	N-(Amino-)terminales Telozeptid
OC	Osteocalcin
25-OH-D	25-Hydroxy-Cholecalciferol
OPG	Osteoprotegerin
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PYD	Pyridinolin
PDGF	Platelet-Derived-Growth-Factor
PICP	Carboxy-terminales Kollagen Typ I-Propeptid
PINP	Amino-terminales Kollagen Typ I-Propeptid
RANK	Rezeptor-Aktivator-Nuklear-Kappa-B
RANKL	Rezeptor-Aktivator-Nuklear-Kappa-B-Ligand
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standard Error of the Mean
TALP	Gesamt-Alkalische Phosphatase (total alkaline phosphatase)
TGF	Transforming-Growth-Factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAcP	Tartrat-resistente saure Phosphatase (tartrate-resistant acid phosphatase)
VEGF	Vasculo-Endothelial-Growth-Factor

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. P. Luppä für die Vergabe des Themas, sowie, zusammen mit Frau Dr. B. Alber, für die intensive und zuverlässige Betreuung, Unterstützung und wissenschaftliche Förderung.

Ebenso möchte ich dem Team in den endokrinologischen Labors des Instituts für klinische Chemie und Pathobiochemie im Klinikum rechts der Isar danken, das mir stets mit Rat und Tat, sowie allerlei netten Unterhaltungen zur Seite stand. Mein besonderer Dank geht hier an Frau E. Dürmeier, Frau U. Huber und Frau A. M. Kleinmaier.

Herzlich danken möchte ich auch Frau Prof. R. Busch, die mir mit ihren Kenntnissen bei der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse eine große Hilfe war.

Außerdem bin ich auch den die Docetaxel-Studie betreuenden Ärzten der Klinik für Urologie, Herrn PD Dr. R. Paul und Herrn Dr. H. Kübler, dankbar für ihre wertvollen Informationen und die Bereitstellung der Räumlichkeiten zur Auswertung der für meine Arbeit wichtigen klinischen Patientinformationen.

Ebenso möchte ich meinen guten Freunden danken und meinen beiden Brüdern Markus und Stefan, für ihre dauernde und unermüdliche Unterstützung, ihre Geduld im Umgang mit meinen Launen und einfach nur dafür, dass es jeden einzelnen von ihnen gibt.

Vor allem aber möchte ich meiner Mama danken, der ich durch ihre aufopferungsvolle Unterstützung, ihren mentalen Rückhalt und ihre aufopferungsvolle Liebe alles in meinem Leben Erreichte zu verdanken habe.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Vorname	Josef
Name	Friedenberger
Adresse	Parzivalstraße 8 80804 München Telefon: +49 17 9 / 20 80 11 9 Email: friedenberger@hotmail.de
Geburtsdatum / -ort	23. Februar 1978, Deggendorf
Konfession	katholisch
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Maria Friedenberger Josef Friedenberger

Schulbildung

09 / 1984 – 08 / 1988	Grundschule Hengersberg
09 / 1988 – 06 / 1997	Comenius-Gymnasium, Deggendorf
06 / 1997	Abitur

Zivildienst

07 / 1997 – 07 / 1998	Rettungsdiensthelfer / Bayerisches Rotes Kreuz, Deggendorf
-----------------------	--

Berufsausbildung

07 / 1997 – 03 / 1999	Ausbildung zum Rettungssanitäter in Deggendorf und Jettingen
-----------------------	--

Studium

10 / 1998 – 09 / 2000	Vorklinisches Studium / Universität Regensburg
10 / 2000 – 04 / 2005	Klinisches Studium / Technische Universität München
04 / 2004 – 08 / 2004	1. Tertial des praktischen Jahres / Krankenhaus München Bogenhausen (Innere Medizin)
08 / 2004 – 11 / 2004	2. Tertial des praktischen Jahres / Krankenhaus München Schwabing (Pädiatrie)
12 / 2004 – 03 / 2005	3. Tertial des praktischen Jahres / Gold Coast Hospital, Brisbane (Australien / Chirurgie)
05 / 2005	Approbation als Arzt

Famulaturen

03 / 2001 Unfallchirurgie / Krankenhaus Barmherzige Brüder,
Regensburg
09 / 2001 Kardiologie / Deutsches Herzzentrum, München
03 / 2002 Dermatologie / Praxis Dr. Fischer, Regensburg
08 / 2002 Gynäkologie / Ospedale di Nuovo, Pisa (Italien)
03 / 2003 Klinische Chemie / Klinikum Rechts der Isar,
München

Wissenschaftliche Tätigkeit

2004 – 2006 Prof. Dr. Peter Lupp, Institut der Klinischen Chemie
und Pathobiochemie / Klinikum rechts der Isar,
München

Thema: Diagnostische Effizienz von Knochen-
stoffwechsellmarkern bei Patienten mit Prostata-
karzinom und Knochenmetastasen

Berufliche Tätigkeit

Seit 07 / 2005 Assistenzarzt im Herzzentrum Leipzig / Kardiologie

München, den 01.06.2006

Josef Friedenberger