

SÉROVÝ N-TERMINÁLNÍ PROPEPTID PROKOLAGENU TYPU I (P1NP) A KOSTNÍ METASTÁZY KARCINOMU PRSU

N-TERMINAL PROPEPTIDE OF TYPE I PROCOLLAGEN (P1NP) AND BREAST CANCER BONE METASTASES

ŠIMÍČKOVÁ M., NEKULOVÁ M., PETRÁKOVÁ K., PECEN L. *, STANÍČEK J. , FRGALA T., PILNÝ R.,
DUBSKÁ L., VALÍK D.

MASARYKŮV ONKOLOGICKÝ ÚSTAV BRNO, *ÚSTAV INFORMATIKY AV ČR, PRAHA

Souhrn

Východiska: Pro monitorování procesu osteoformace je doporučován N-terminální propeptid prokolagenu typu I (P1NP). **Soubor, metody.** V našem souboru nemocných s karcinomem prsu jsme vyšetřili 183 nemocných, u části z nich bylo možno srovnat výsledky scintigrafického vyšetření kostí se stanovením sérového P1NP (metoda Elecsys, Roche). **Výsledky.** Průměrná koncentrace P1NP ve skupině nemocných s prokázanými kostními metastázami (N=118) byla signifikantně vyšší ve srovnání se skupinami bez metastáz. Stanovení vykazuje klinickou senzitivitu 46 % při 90 % specifčnosti. **Závěr.** Sledování dynamiky změn hladin sérového P1NP může doplnit scintigrafické vyšetření kostí při monitorování specifického terapeutického procesu. Definitivní zhodnocení prediktivního významu vyšetření sérového P1NP bude provedeno po rozšíření studie o další nemocné.

Klíčová slova: sérový N-terminální propeptid prokolagenu typu I (P1NP), kostní metastázy, klinická validita, scintigrafie kostí.

Summary

Background: N-terminal propeptide of type I procollagen (P1NP) is recommended for monitoring of the bone formation process. **Subjects, Methods.** This study involved 183 breast carcinoma patients. In part of this group the bone scintigraphy was compared with serum P1NP levels (Elecsys method, Roche). **Results.** The average P1NP concentration in the group of patients with proved bone metastases (N=118) was significantly higher in comparison with patient groups without metastases. This P1NP method displays a 46% clinical sensitivity with 90 % specificity. **Conclusions.** Monitoring of P1NP concentration changes can supplement bone scintigraphy during monitoring of specific bisphosphonate treatment. A comprehensive assessment of the predictive value of serum P1NP measurement will be performed following increase of patient numbers in this study.

Key words: serum N-terminal propeptide of type I procollagen (P1NP), bone metastases, clinical validity, bone scintigraphy.

Úvod

Na **regulaci remodelace skeletu** se podílejí procesy spojené jak s odbouráváním kostní hmoty prostřednictvím osteoklastů, tak i s její tvorbou v osteoblastech. Rovnováha mezi oběma skupinami buněk je řízena různými regulačními vlivy.

Tvorba kostí je stimulována především působením fluoridu, parathormonu, transformujícího růstového faktoru beta (TGF beta), insulinu-podobného růstového faktoru I (IGF-I) a dalšími látkami. Na **zvýšeném odbourávání** se podílejí především parathormon, 1, 25-dihydroxyvitamin D, mnohé cytokiny a aktuálně intenzivně studovaný regulátor RANKL (ligand vázající se na receptor, který aktivuje nukleární faktor kappa B). Na **poklesu intenzity odbourávání** má naopak vliv kalcitonin, estrogeny, androgeny, dále pak osteoprotegerin a vybrané cytokiny (1).

Monitorování metabolismu kostí prostřednictvím vyšetřování uvedených regulátorů je však dosud méně časté než vyšetřování **kostních markerů vznikajících jako produkt metabolických procesů v kostní hmotě**. Osteoblasty indukovaná syntéza a osteoklasty indukovaná degradace kostí jsou těsně propojeny. Z mnoha studovaných osteomarkerů jsou aktuálně doporučeny **pro monitorování resorpce** (a sledování aktivity osteoklastů) především C-terminální telopeptid kolagenu I (ICTP), beta-Cross-

laps (beta-CTX, tj. oktapeptidový fragment C-terminálního telopeptidu kolagenu I), pyridinolin a deoxypyridinolin (pyridiniové příčné vazby v kolagenu) (2). Jako **markery kostní novotvorby** (a především osteoplastických metastáz) jsou užívány N-terminální propeptid prokolagenu typu I (P1NP) či jeho C-terminální propeptid (P1CP), dále osteokalcin (nekolagenní peptid typický pro osteoblasty, marker mineralizace kostí), nebo kostní forma alkalické fosfatázy (BALP) (doporučení National Committee for Clinical Laboratory Standards z roku 2004).

Cílem naší práce bylo vyhodnotit sérovou hladinu P1NP v souboru nemocných karcinomem prsu bez kostního rozsevu ve srovnání se souborem s kostními metastázami. Koncentrace P1NP byly korelovány s výsledky scintigrafie kostí, ev. dalších zobrazovacích vyšetření. Hladiny P1NP byly zhodnoceny ve vztahu ke klinickým údajům o typu terapie (radioterapie a chemoterapie). Speciální měření patřilo terapii bisfosfonáty, které se podílejí na inhibici maligní osteolýzy (1-3).

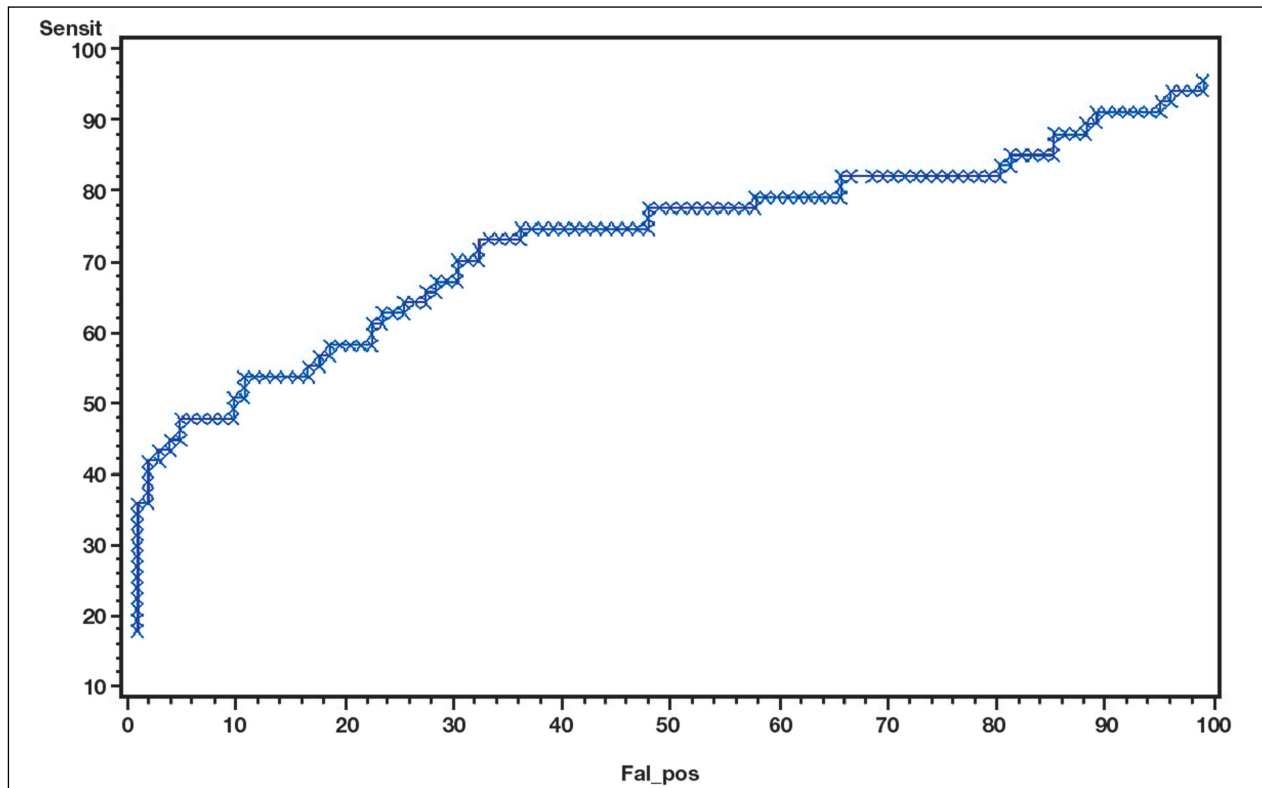
Pacienti a metody. Sérový P1NP byl stanoven v souboru vybraných 183 pacientek léčených pro karcinom prsu v MOÚ Brno (celkem 294 vzorků krve). Kostní rozsev byl prokázán kostní scintigrafií, ev. potvrzen dalšími zobrazovacími vyšetřovacími metodami (rentgenové vyšetření, počítačová tomografie) nebo

Tabulka 1.: Srovnání průměrných hladin sérového P1NP ve skupině vzorků nemocných s karcinomem prsu podle lokalizace metastáz.

		Nepřítomny	Metastázy		
			A. Kostní prokázané	B.Kostní prokázané (jen bez terapie) **	C. Kostní suspektní
Počet odběrů		103	167	70	24
PNP (ug/l)	medián	41,6	61,3	61,7	64,1
	průměr*	44,9	111,7	118,8	66,1
	SD	20,59	150,13	156,47	17,17

*: $p < 0,0001$, **: soubor A, vybraný pouze nemocné aktuálně bez specifické terapie bisfosfonáty

Obrázek 1.: ROC křivka pro P1NP u kostních metastáz nemocných s karcinomem prsu (senz: senzitivita, Fal_pos: falešná pozitivita, tj. [1-specifita] v procentech).



Tabulka 2.: Klinická validita vyšetření sérového P1NP v souboru nemocných s karcinomem prsu s kostními metastázami (vzhledem ke kontrolnímu souboru bez metastáz)

cut-off (ug/l)	specifičnost (%) (95% CI)	senzitivita (%) (95% CI)	PV+ (%) (95% CI)	PV- (%) (95% CI)	RR (95% CI)	AUC
73,3	90,4 (84,5-96,4)	46,4 (33,4-59,5)	74,3 (60,0-88,6)	73,9 (65,39-82,0)	2,85 (2,48-3,21)	0,7591

PV+, PV-: pozitivní a negativní prediktivní hodnota, RR: relativní riziko, AUC: plocha pod ROC křivkou

dalším klinickým vývojem. Všechna vyšetření byla provedena v intervalu do 1 měsíce od analýzy tohoto markeru v séru. Někteří z nemocných s prokázaným kostním rozsevem (N=22) byly vyšetřovány opakovaně vzhledem ke sledování efektu terapie v intervalu přibližně 3 až 6 měsíců od zahájení terapie bisfosfonáty (Bonefos, Fosamax), případně po radioterapii a chemoterapii. P1NP bylo vyšetřováno metodou elektrochemiluminiscence (na imunoanalýzátoru Elecsys 2010, firma ROCHE). Na souboru zdravých žen (N=8) byla ověřena diskriminační hranice 74 ug/l. Analytická charakteristika metody odpovídala firemním údajům. Byly hodnoceny parametry klinické validity (senzitivita, speci-

fičnost, pozitivní a negativní prediktivní hodnota, relativní riziko a ROC křivka). Bylo provedeno určení optimální referenčního rozmezí. Bodové odhady parametrů validity byly doprovázeny výpočtem 95% konfidenčních intervalů. Ke statistickému hodnocení jednotlivých proměnných byl užit neparametrický Wilcoxonův test.

Výsledky

V našem souboru 183 vybraných pacientek s karcinomem prsu (294 odběrů) byly kostní metastázy prokázány u 118 z nich (167 odběrů), u dalších 24 byl suspektní nález na scintigrafii kostí. Čty-

ři z těchto nemocných, u kterých byl později kostní rozsev potvrzen, byly také zahrnuty do dalšího monitorování. Nemocné s kostními metastázami vykazovaly průměr i medián koncentrace sérového P1NP signifikantně vyšší než nemocné bez metastáz (tab.1, $p < 0,0001$). U nemocných s pouze suspektním nálezem na scintigrafii byly hodnoty P1NP lehce nad referenční hodnotou jen v asi polovině případů.

Při optimalizované referenční hodnotě P1NP určené pro náš soubor (73,3 ug/l) jsme při specifickosti 90,4 % prokazovali přítomnost kostního rozsevu se senzitivitou 46,4 %. Plocha pod ROC křivkou (AUC) byla 0,7591 (tab.2, obr.1).

U 22 nemocných s kostními metastázami, které byly v terapii bisfosfonáty, bylo provedeno opakované vyšetření P1NP. U 10 z nich nedošlo po 6 měsících k efektu terapie, nález progredoval a u poloviny z nich došlo také ke zvýšení hodnoty P1NP i při terapii. U 12 nemocných naopak došlo ke stabilizaci či parciální remisi a hladina P1NP klesala. Soubor je průběžně rozšiřován.

Diskuse

Metastatická kostní choroba u karcinomu prsu je problém především ve vztahu k závažným komplikacím typu bolest, zlomeniny nebo komprese míšního kanálu, vedoucí ke zhoršení kvality života onkologického pacienta. Pro detekci kostních metastáz jsou k dispozici různé diagnostické techniky, především rentgenové zobrazení, počítačová tomografie, magnetická resonance či kostní scintigrafie. Nejrozšířenější z nich, kostní scintigrafie s Tc-99m značeným difosfonátem, je i nejcitlivější, má však jistá omezení (vedlejší účinky, finanční nákladnost, dostupnost). Proto je stále kladen důraz na to, nalézt pro monitorování kostních metastáz minimální invazivní metodu typu stanovení osteomarkeru v krvi (4).

Nádorový proces ovlivňuje kostní metabolismus mnoha dosud ne do detailu objasněnými mechanismy. **Tvorba osteolytických ložisek u mnohočetného myelomu** je stimulována především působením systému RANKL-osteoprotegerin. Myelomové buňky jsou schopny ovlivnit produkci zvýšeného množství RANKL (ligand) a naopak snížit množství osteoprotegerinu, který je schopen tento ligand blokovat. Tím je umožněna vazba RANKL na vlastní receptor - RANK. Aktivací receptoru RANK, který se nachází především na osteoklastech (i stromálních buňkách), dochází k vlastní osteolýze. Zkušenosti s ovlivněním rovnováhy osteoprotegerin - RANKL aplikací osteoprotegerinu jsou dosud na úrovni začátků klinického testování u nemocných s mnohočetným myelomem nebo karcinomem prsu (1).

Na mechanismu **vzniku osteoplastických metastáz solidních nádorů** (ca prostaty, méně často ca mammy) se podílejí především endotelin-1, dále pak FGF, PDGF a další látky. **Osteolytická ložiska metastáz solidních nádorů** ovlivňuje především produkce PTHrP (parathormone related peptide) nádorovými buňkami, stimulující produkci RANKL na stromálních buňkách. I tohoto procesu se účastní vybrané cytokiny, prostaglandiny a další látky.

Pro testování vlivu těchto regulátorů kostní remodelace v maligním onemocnění je však dosud rutinně užíváno především vyšetřování osteomarkerů uvolňovaných v důsledcích patologických procesů degradace i novotvorby kosti. Výsledky dosavadních studií vyšetřujících uvedené parametry prokazují, že i u osteoplastických metastáz (ca prostaty) či smíšených metastáz (ca prsu, ca plic) lze monitorovat osteolytické markery. Předpokládá se totiž, že k umožnění růstu osteoplastické metastázy musí v jejím okolí probíhat osteolýza (1). Z dosavadních výsledků rovněž vyplývá, že osteomarkery kostní degradace budou vhodnější pro monitorování účinku terapie bisfosfonáty, kdy dochází ke snížení počtu a aktivity osteoklastů.

P1NP je markerem vysoce specifickým pro tvorbu osteoplastických (a tedy i smíšených) metastáz, nevykazuje cirkadiánní

variaci, lze jej měřit i v séru a vykazuje poměrně nízkou intraindividuální variaci. Během tvorby kolagenu I je P1NP uvolňován do intracelulárního prostředí a následně do krevního oběhu. Metoda stanovení P1NP vykazuje dobrou reprodukovatelnost, nevykazuje výraznější závislost na dietě.

Dosavadní výsledky hodnocení validity P1NP pro detekci kostních metastáz prokazují ve většině studií použitelnost tohoto osteomarkeru. U žen léčených pro osteoporózu je očekáván při dobrém efektu terapie nejméně 40% pokles P1NP po 6 měsících léčení (3,5).

Onkologové potřebují více informací pro doporučení vhodného algoritmu vyšetřování v terapii žen s karcinomem prsu vzhledem k posouzení kostního metabolismu u těchto nemocných (6-8). U pacientek s karcinomem prsu se chovaly hodnoty P1NP v séru po operaci (6) i po chemoterapii (7) jako negativní prognostický parametrem vzhledem k přežívání. Také klasické nádorové markery bývají považovány za vhodné parametry u kostního rozsevu nádorového onemocnění (9).

Terapie bisfosfonáty, působící mechanismem indukce apoptózy osteoklastů, zvýšení tvorby osteoprotegerinu, snížení koncentrací vaskulárního endoteliálního růstového faktoru, a tím i angiogeneze apod., představuje pro tyto nemocné profit, i když se obvykle jedná jen o podpornou a život neprodlužující terapii. Při monitorování této terapie vykazují obvykle nejvyšší senzitivitu markery kostní degradace (10). Zhodnocení významu jednoho z nich, beta-CrossLaps, bude provedeno v našem souboru po dostatečném rozšíření souboru monitorovaných nemocných.

O možné falešné pozitivitě těchto osteomarkerů v cirkulaci není dosud mnoho informací, i když o vlivu radioterapie na jejich hladinu (zejména degradačního typu), by mohlo svědčit prokázané zvýšení jejich obsahu v ozářené tkáni (11).

Nárůst biochemických markerů kostního metabolismu v době progresu a pokles při úspěšné specifické terapii u pacientek s metastatickou formou rakoviny prsu prokazují ve své práci také další autoři (12-16). Výsledky Luftnera et al. potvrzují dostatečnou klinickou validitu P1NP (12,13), ostatní práce potvrzují význam markerů osteoresorpce (14-16). Výrazná korelace však nebyla nalezena pro P1NP a kostní scintigrafii pro 88 nemocných s různými typy nádorů (17), i když hodnocení senzitivity (24 %) bylo provedeno při příliš vysoké specifickosti (až 96 %). Sérové koncentrace metabolitů kolagenu typu I korelovaly s metastatickým procesem u karcinomu prostaty (18).

Naše výsledky na dosud omezeném počtu nemocných potvrdily, že při optimalizaci cut-off má metoda senzitivitu 46 % (při 90 % specifickosti) pro zachyt nemocných s karcinomem prsu s metastatickým postižením kostí. Podobné závěry byly publikovány ve studiích zahrnující 62 nemocných s karcinomem prsu (13). V tomto souboru (u 38 nemocných byly potvrzeny kostní metastázy) vykazoval P1NP 50 % senzitivitu při cut-off 95 ug/l, plocha pod ROC křivkou byla 0,72.

V průběhu terapie bisfosfonáty jsme pozorovali nárůst sérové hladiny P1NP u poloviny z těch nemocných, kdy kostní proces progredoval. Naopak, pokles jsme zaznamenali u nemocných s pozitivním efektem terapie. Pro kvalitativní statistické vyhodnocení je však třeba soubor nemocných při terapii bisfosfonáty rozšířit.

Scintigrafie tedy zůstává stále hlavní metodou průkazu kostních metastáz, její limity (cena, možná frekvence vyšetření) však mohou být důvodem rozvoje relativně neinvazivního a ekonomicky méně náročného vyšetření P1NP v séru. Dynamika změn hladin sérového P1NP může mít navíc větší význam při monitorování terapeutického procesu. Probíhající prospektivní studie by měla potvrdit, že stanovení uvedeného osteomarkeru (spolu s markerem osteoresorpce beta-Crosslaps) bude mít vliv na optimalizaci a řízení terapie kostních metastáz a příznivý účinek na výsledný stav nemocného.

Práce byla podpořena VZ MZd č 00020980501-5.

Literatura:

1. Adam Z., Ševčík P., Vorlíček J., Mistrík M. a kol.: Kostní nádorová choroba. Grada, Avicenum 2005
2. www.ncls.org (Guideline Document C48-A, 2004)
3. Morris, G., Mitchell, E. P.: Bisphosphonate Therapy for Women with Breast Cancer and at High Risk for Osteoporosis. *J Nat Med Assoc* 2007, 99, 35-48.
4. Clamp A., Danson S., Nguyen H., Cole D., Clemone M.: Assessment of therapeutic response in patients with metastatic bone diseases. *The Lancet Oncology* 2004, 5, 607-616.
5. Delmas PD, Hardy P, Garnero P, Dain M. Monitoring individual response to hormone replacement therapy with bone markers. *Bone*, 2000, 26, 553-560. Comment in: *Bone*. 2000, 26, 5 51-552.
6. Jukkola A, Bloigu R, Holli K, Joensuu H, Valavaara R, Risteli J, Blanco G. Postoperative PINP in serum reflects metastatic potential and poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res.* 2001, 21, 2873-2876.
7. Jensen BV, Johansen JS, Skovsgaard T, Brandt J, Teisner B. Extracellular matrix building marked by the N-terminal propeptide of procollagen type I reflect aggressiveness of recurrent breast cancer. *Int J Cancer.* 2002, 98,582-589.
8. Hillner BE, Ingle JN, Chlebowski RT, Gralow J, Yee GC, Janjan NA, Cauley JA, Blumenstein BA, Albain KS, Lipton A, Brown S; American Society of Clinical Oncology 2003 update on the role of bisphosphonates and bone health issues in women with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003, 21, 4042-4057. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2004, 2, 1351.
9. Oremek GM, Weis A, Sapoutzis N, Sauer-Eppel H. Diagnostic value of bone and tumour markers in patients with malignant diseases. *Anticancer Res.* 2003; 23,987-990.
10. Delmas P.D., Eastell R., Garnero P., Seibel M.J., Stepan J.: The use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporosis Int.* 2000, Supl.6, S2-17.
11. Sassi M, Jukkola A, Riekk R, Hoyhtya M, Risteli L, Oikarinen A, Risteli J. Type I collagen turnover and cross-linking are increased in irradiated skin of breast cancer patients. *Radiother Oncol.* 2001, 58, 317-23.
12. Luftner D, Richter A, Geppert R, Wernecke KD, Possinger K.: Normalization of biochemical markers of bone formation correlates with clinical benefit from therapy in metastatic cancer. *Anticancer Res.* 2003, 23, 1017-1026.
13. Luftner D, Jozereau D., Schildhauer S., Geppert R., Muller C., Fiolka G., Wernecke K.D., Possinger K.: PINP as serum marker of metastatic spread to bone in breast cancer patients. *Anticancer Res.* 2005, 25, 1017-26.
14. Lipton A, Costa L, Ali S, Demers L Use of markers of bone turnover for monitoring bone metastases and the response to therapy. *Semin Oncol.* 2001, 28, 54-59.
15. Wada N., Fujisaki M., Ishii S., Ikeda T., Kitajima M.: Evaluation of bone metabolic markers in breast cancer with bone metastasis. *Breast Cancer* 2001, 8, b131-137.
16. Koizumi M., Takahasi S., Ogata E.: Comparison of serum bone resorption markers in the diagnosis of skeletal metastasis. *Anticancer Res.* 2003, 23, 4095-4099.
17. Schoenberg J., Rozenboom S., Wirthgen-Beyer E., Eilles C h.: Evaluation of the clinical value of bone metabolic parameters for the screening of osseous metastases compared to bone scintigraphy. *BMC Nuclear Medicine* 2004, .
18. Yoshida K., Sumi S., Arai K., Koga F., Umwega H., Hosoya Y., Honda M., Yano M., Moriguchi H., Kitahara S.: Serum concentration of type I collagen metabolism as a quantitative marker of bone metastases in patients with prostate cancer. *Cancer* 1997, 80, 1760-1767.

Došlo: 6. 6. 2006
Přijato: 15. 9. 2006