

Mike Juraschek
Dr. med

Biochemisch-molekulare und histomorphologische Indizes des Knochenstoffwechsels in einem Tiermodell der PTHrP-induzierten Tumorosteopathie

Geboren am 15.03.68
Reifeprüfung am 08.05.1990
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1993 bis SS 2001
Physikum am 29.03.1995 in Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 02.05.2001 in Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Markus J. Seibel

Neoplasien sind oft mit Osteolysen und Hyperkalzämie assoziiert. Hierfür verantwortlich sind die direkte Tumorosteolyse infolge lokaler Invasion des Knochens durch Tumorzellen sowie paraneoplastisch produzierte Mediatoren wie Parathormon-ähnliches Peptid (engl. **parathormone-related peptide**, PTHrP), das die osteoklastäre Knochenresorption und die renale Kalziumrückresorption stimuliert. Die hieraus resultierende Störung der Kalziumhomöostase ist klinisch unter dem Begriff tumorassoziierte Hyperkalzämie (engl. **humoral hypercalcemia of malignancy**, HHM) bekannt.

Eine Früherkennung metastatischer Knochenerkrankungen ist anhand der derzeit verfügbaren diagnostisch-technischen Möglichkeiten nur beschränkt möglich, da die Sensitivität radiologischer, szintigraphischer und bioptischer Methoden zum Nachweis kleinster ossärer Läsionen in der Regel nicht ausreicht. In vielen Fällen ist daher bei Diagnosestellung das tumorinduzierte Geschehen am Knochen weit fortgeschritten und die therapeutische Effizienz zumindest pharmakologischer Interventionen a priori eingeschränkt. In jüngster Zeit wurde deshalb vermehrt die Frage aufgeworfen, inwieweit neue biochemische Marker des Knochenstoffwechsels aufgrund ihrer höheren Spezifität und Sensitivität zur frühzeitigen Diagnose tumorinduzierter Osteopathien Einsatz finden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die sequentiellen Veränderungen biochemischer und histomorphometrischer Indizes in einem Tiermodell der PTHrP-induzierten Tumorosteopathie zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Als Tumor wurde das Walker Karzinosarkom 256 (HWSC 256) gewählt. Als Versuchstiere dienten weibliche Wistar-Ratten im Alter von 12 Monaten. Der Walker-

Tumor ist eine Mischgeschwulst mit epithelialen und mesenchymalen Anteilen und ruft nach subkutaner Inokulation durch die Sekretion von PTHrP in kurzer Zeit eine Hyperkalzämie hervor.

Folgende spezifische Fragen sollten beantwortet werden:

1. Welche Sequenz molekularer sowie histologischer Veränderungen des Knochenstoffwechsels charakterisiert im vorliegenden Tiermodell die PTHrP-induzierte Tumorosteopathie? Welche Parameter zeigen die frühesten Veränderungen im Entwicklungsverlauf der Erkrankung?
2. Welche Zusammenhänge lassen sich zwischen biochemisch-molekularen und histologischen Veränderungen des Knochenstoffwechsels nachweisen?
3. In welcher Weise wird die Entfernung des Tumors nach Etablierung der Osteopathie durch Veränderungen biochemisch-molekularer und histomorphometrischer Indizes reflektiert.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden 3 Experimente durchgeführt:

Versuch 1: Effekt des HWSC 256 und von Ibandronsäure auf biochemisch-molekulare Indizes.

Es wurden 4 Gruppen zu jeweils 12 Tieren gebildet. Allen Tieren der Gruppe I und II wurden bei Versuchsbeginn 2 Millionen Zellen des HWSC 256 subkutan inokuliert, während die Tiere in den Gruppen III und IV lediglich Trägersubstanz erhielten. Die Tiere der Gruppen II und IV wurden ab Versuchsbeginn zusätzlich subkutan mit dem hoch potenten Bisphosphonat Ibandronsäure behandelt (10 µg P/kg/d). Serum- und Urinproben aller Tiere wurden täglich gewonnen und nach entsprechender Behandlung zur späteren Analytik eingefroren. Alle Tiere wurden am Versuchsende (Tag 8) getötet. Das rechte Femur wurde für die spätere Röntgendichte- und Mineralanalyse asserviert.

Versuch 2: Effekt des HWSC 256 auf histomorphometrische Indizes.

Bei Versuchsbeginn wurden 90 Tieren jeweils 2 Millionen Zellen des HWSC 256 subkutan inokuliert. Beginnend mit Tag 0 wurden bis Tag 8 jeweils 10 Tiere täglich getötet. LWK 4 und 5 wurden für die spätere chemische und histologische Analyse asserviert.

Versuch 3: Effekt einer Tumorexplantation auf biochemisch-molekulare und histomorphometrische Indizes.

Bei Versuchsbeginn wurden 48 Tieren jeweils 2 Millionen Zellen des HWSC 256 subkutan inokuliert. Nach Vollentwicklung wurde der Tumor am Tag 7 explantiert. Von Tag 7 bis Tag 9 wurden alle 12 Stunden, an den Tagen 10 und 11 alle 24 Stunden jeweils 8 Tiere getötet und Urin-, Serum- sowie Knochenproben zur späteren chemischen und histologischen Analyse asserviert.

Im Rahmen der verschiedenen Versuche wurden die folgenden biochemisch-molekularen und histomorphometrischen Marker bestimmt: alkalische Gesamphosphatase (TAP) im Serum mittels Kolorimetrie, Osteocalcin (OC) im Serum mittels RIA, Serum-Kalzium (S-Ca) mittels Atomabsorptionsspektrometrie (ASS), Pyridinolin (PYD) und Desoxypyridinolin (DPD) im Urin mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie sowie Kalzium im Urin (U-Ca) mittels ASS. Histomorphometrisch wurden im 4. und 5. Lendenwirbelkörper die Zahl der Osteoklasten und Osteoblasten sowie das trabekuläre Knochenvolumen und das Osteoidvolumen bestimmt. Außerdem wurde eine Knochendichte- und Mineralanalyse des rechten Femur durchgeführt mit Bestimmung von Röntgendichte, Kalziumgehalt, Trockengewicht und Aschgewicht.

Die früheste signifikante Veränderung gegenüber Versuchsbeginn (Tag 0) war eine transiente Abnahme der Osteoblastenzahl an Tag 2, gefolgt von einer Zunahme der Osteoklastenzahl an Tag 3 und einer Reduktion des trabekulären Knochenvolumens an Tag 4. Die Ausscheidung von PYD und DPD im Urin war ab Tag 4 signifikant gegenüber Tag 0 erhöht. S-Ca und U-Ca zeigten eine signifikante Erhöhung an Tag 6, während TAP gegen Versuchsende an Tag 7 signifikant gegenüber Tag 0 erhöht war. OC zeigte keine signifikante Veränderung. Die Therapie mit Ibandronsäure führte zu einer signifikanten Reduktion aller untersuchten Resorptionsmarker, während die Formationsmarker TAP und OC unter Therapie keine wesentlichen Veränderungen zeigten.

Nach Entfernung des Tumors gingen die Werte für PYD, DPD, S-Ca und U-Ca innerhalb von 12 Stunden auf Ausgangsniveau zurück, während TAP bis zu 36 Stunden nach Explantation erhöht blieb. OC zeigte keine signifikanten Veränderungen. Die Zahl der Osteoklasten fiel 24 Stunden nach Tumorexplantation auf Ausgangswerte zurück, während das trabekuläre Knochenvolumen bis zum Versuchsende vermindert blieb. Die Osteoblastenzahl und das Osteoidvolumen zeigten keine signifikanten Veränderungen.

Bedenkt man, dass sich die Hyperkalzämie im vorliegenden Modell innerhalb nur weniger Tage entwickelt, ist der frühe Anstieg von PYD und DPD bedeutsam. Von allen untersuchten Markern spiegeln sie die histologischen Veränderungen im Knochen am genauesten wider und zeigen 48 Stunden (= 30%) früher als Serum- und Urin-Kalzium die erhöhte Knochenresorption. Unter osteoprotektiver Therapie mit einem Bisphosphonat und nach Explantation des Tumors zeigten alle untersuchten Resorptionsmarker einen schnellen Rückgang auf Ausgangswerte.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass eine signifikant erhöhte Ausscheidung von Kollagen-Abbauprodukten im Urin ein Hinweis auf eine frühe ossäre Beteiligung beim Tumorleiden sein kann. Unsere Ergebnisse zeigen, dass diese Biomarker das zelluläre Geschehen im Knochen offenbar adäquat und mit kurzer Latenzzeit reflektieren. Die erhöhte Ausscheidung der Pyridinium-Crosslinks im Urin geht der Hyperkalziurie deutlich voraus, so dass sich diese neuen Marker als Frühdiagnostika zum Screening bei Risiko-Patienten und zur Verlaufskontrolle eignen könnten. Der therapeutische Effekt nach Behandlung mit Ibandronsäure wird von allen Resorptionsmarkern gut reflektiert. Daher könnten sich alle hier untersuchten Marker zur Therapieüberwachung eignen. Auf die untersuchten Formationsmarker hatte die

Behandlung mit Ibandronsäure keinen statistisch signifikanten Einfluß, so dass aus diesen Resultaten eine Eignung dieser Marker für Diagnose und Therapiekontrolle bei humoraler Hyperkalzämie nicht offensichtlich ist.

Zur Zeit werden weltweit klinische Studien durchgeführt, um diese Hypothesen zu überprüfen. Die vorliegenden experimentellen Ergebnisse zeigen, dass molekulare Marker der Knochenresorption wertvolle Hilfen in der Diagnostik bei Krebspatienten und bei Verlaufskontrolle und Therapieüberwachung bei osteoprotektiver Therapie sein könnten.

