

Wartość rokownicza markerów kościotworzenia i resorpcji kości u pacjentów z mięsakiem kościopochodnym

Joanna Gajewska¹, Jadwiga Ambroszkiewicz¹, Teresa Klepacka²,
Magdalena Rychłowska-Pruszyńska³, Teresa Laskowska-Klita¹

Streszczenie. Dane z piśmiennictwa wskazują na możliwość zastosowania specyficznych markerów obrotu kostnego do wykrywania i monitorowania leczenia nowotworów kości, w tym również mięsaka kościopochodnego u dzieci. Zgodnie z klasyfikacją uwzględniającą strukturę histologicznego utkania nowotworowego wyróżnia się szereg podtypów osteosarcoma. Wśród nich najliczniej reprezentowany jest podtyp konwencjonalny mieszany, w którym różne struktury utkania występują obok siebie.

Celem pracy było zbadanie wybranych markerów obrotu kostnego u pacjentów z mieszanym podtypem osteosarcoma w trakcie leczenia.

Materiał i metody. Badaniami objęto 23 pacjentów (7 dziewcząt, 16 chłopców) w wieku 5-20 lat z mieszaną postacią osteosarcoma. W badanej grupie było 12 pacjentów z korzystnym (remisja) i 11 z niekorzystnym rokowaniem (progresja). Osteokalcynę (OC), kostną frakcję fosfatazy alkalicznej (BALP) i usieciowane telopeptydy kolagenu typu I (CTX) oznaczano w surowicy krwi pacjentów metodą immunoenzymatyczną (ELISA) przed leczeniem, w trakcie chemioterapii przed- i pooperacyjnej oraz po zakończeniu leczenia.

Wyniki. Wartości badanych markerów obrotu kostnego w momencie biopsji u chorych z korzystnym i niekorzystnym rokowaniem były zbliżone. W trakcie stosowanej chemioterapii obserwowane wartości OC, BALP i CTX były niższe niż przed leczeniem. Jednakże, w grupie pacjentów rokujących niekorzystnie były wyższe niż u rokujących korzystnie. Natomiast po zakończeniu leczenia pooperacyjnego poziom markerów kościotworzenia był około 3-krotnie wyższy, a markera resorpcji 2-krotnie wyższy u pacjentów z progresją choroby w porównaniu z chorymi w okresie remisji. Uzyskane różnice dla OC, BALP i CTX były istotne statystycznie na poziomie ufności odpowiednio $p < 0,05$, $p < 0,02$, $p < 0,002$.

Wnioski. powyższe wyniki wskazują, że u pacjentów z mieszanym podtypem osteosarcoma markery obrotu kostnego mogą być przydatne w monitorowaniu terapii i ocenie jej skuteczności. Dalsze badania dotyczące metabolizmu kostnego zarówno w mieszanym podtypie, jak i w innych postaciach występujących w osteosarcoma, pozwolą jednoznacznie ocenić wartość rokowniczą markerów kościotworzenia i resorpcji kości.

Słowa kluczowe: markery obrotu kostnego, mięsak kościopochodny, podtyp mieszany, rokowanie

Wstęp

Struktura kości, dostosowana do mechanicznych potrzeb organizmu, w znacznym stopniu zależy od przebudowy wewnętrznej kośćca odbywającej się przez całe życie osobnicze. Proces ten pełni funkcje modulujące, umożliwia wytworzenie jej prawidłowej, dostosowanej do obciążeń architektury oraz naprawianie mikrouszkodzeń. W badaniach dotyczących poszukiwania biochemicznych wskaźników obrotu kostnego zwrócono uwagę na cząsteczki białkowe lub produkty ich degradacji uwalniane podczas prze-

budowy kości. Stwierdzono, że odzwierciedlają one aktywność wszystkich procesów przebudowy, odbywających się w danym czasie w obrębie całego szkieletu, oraz dostarczają wielu informacji przydatnych do monitorowania leczenia schorzeń układu kostnego oraz przewidywania efektów jego leczenia [1, 2].

Nowotworom złośliwym i przerzutom nowotworowym do kości często towarzyszy zaburzenie równowagi w obrocie kostnym objawiającym się nasileniem procesu kościotworzenia i/lub resorpcji kości. Dotychczas wartość rokownicza tych markerów była oceniana głównie u osób dorosłych z chorobą nowotworową dającą przerzuty do kości [3-5]. Przerzuty do kości związane są z infiltracją i ekspansją komórek nowotworowych do szpiku kostnego i w efekcie z aktywacją osteoklastów i nasileniem osteolizy i/lub osteosklerozy [6]. Z procesami tymi współlistnieją zmiany w stężeniach markerów kościotworzenia i resorpcji kości, wśród których na szczególną uwagę zasługu-

¹ Zakład Biochemii Klinicznej

² Zakład Patomorfologii

³ Klinika Chirurgii Onkologicznej Dzieci i Młodzieży
Instytut Matki i Dziecka w Warszawie

je kostna frakcja fosfatazy alkalicznej (*bone alkaline phosphatase* – BALP), osteokalcyna (*osteocalcin* – OC) i usieciowany telopeptyd kolagenu typ I (*C-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen* – CTX) [7]. Wzrost aktywności BALP i OC stwierdzono u pacjentów z rakiem piersi i rakiem prostaty z przerzutami do kości [8,9]. W przypadku raka piersi Marchei i wsp. [8] wykazali dużą czułość i specyficzność BALP, której wzrost aktywności wyprzedzał nawet o kilka miesięcy pojawienie się w badaniach scyntygraficznych przerzutów do kości. U chorych z rakiem prostaty wykazano, że stężenie CTX w surowicy krwi u pacjentów bez przerzutów było wyższe o około 25%, a u chorych z przerzutami 4-krotnie wyższe w porównaniu z grupą kontrolną [9]. Oznaczanie usieciowanych telopeptydów wydaje się być szczególnie użyteczne, gdyż poziomy zarówno CTX, jak i NTX (*N-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen*), korelują dodatnio z ilością ognisk przerzutowych i progresją nowotworu [10, 11].

Badania własne dotyczące markerów kościotworzenia i resorpcji kości wskazują na ich przydatność jako wskaźników progresji choroby w monitorowaniu leczenia pacjentów z mięsakiem kościopochodnym [12, 13]. Podwyższona aktywność BALP oraz wyższe stężenie CTX i OC we krwi mogą mieć związek z niekorzystnym rokowaniem u tych chorych. Jednakże, badania te obejmowały pacjentów z mięsakiem kościopochodnym należącym do różnych podtypów histologicznych. Wiadomo, że *osteosarcoma* jest histologicznie wielopostaciowym guzem o wielopotencjalnych możliwościach różnicowania podścieliska mezenchymalnego. Cechą charakterystyczną i elementem istotnym w diagnostyce guza jest tworzenie osteoidu i/lub kości bezpośrednio z mięsakowego podścieliska mezenchymalnego, bez pośrednictwa chrząstki. Stąd, zgodnie z klasyfikacją uwzględniającą strukturę histologicznego utkania nowotworowego, wyróżnia się szereg podtypów *osteosarcoma*. Wśród nich licznie reprezentowany jest podtyp konwencjonalny mieszany, w którym różne struktury utkania występują obok siebie [14].

Celem pracy była ocena wybranych markerów obrotu kostnego u pacjentów z najczęstszym histologicznie konwencjonalnym, mieszanym podtypem *osteosarcoma* w przebiegu leczenia.

Materiał i metody

Badaniami objęto 23 pacjentów (7 dziewcząt, 16 chłopców) w wieku 5-20 lat z konwencjonalną, mieszaną postacią *osteosarcoma* leczonych w Klinice Chirurgii Onkologicznej Dzieci i Młodzieży IMD w latach 1999-2004. Wyróżniono 2 podgrupy:

- korzystnie rokującą z remisją choroby (12 dzieci),
- niekorzystnie rokującą z progresją choroby w trakcie leczenia (11 dzieci).

Pacjenci otrzymywali chemioterapię przedoperacyjną, mieli wykonany zabieg operacyjny oraz byli poddani chemioterapii pooperacyjnej. Leczenie chemiczne było prowadzone według protokołu EORTC (adriamycyna, cisplatyna) lub SFOP (adriamycyna, metotreksat, etopozyd, ifosfamid).

U wszystkich pacjentów wykonano oznaczenia markerów kościotworzenia i resorpcji kości w surowicy krwi: przed leczeniem, w trakcie chemioterapii przed- i pooperacyjnej oraz po

zakończeniu leczenia. Badania uzyskały akceptację Komisji Etycznej IMD.

Krew żylną pobierano na czczo w godzinach rannych. Surowicę uzyskaną po odwirowaniu (300xg, 4°C, 10 min.) zamrażano w -20°C do momentu oznaczenia (nie dłużej niż 2 miesiące). Poziom osteokalcyny oraz usieciowanego telopeptydu kolagenu typu I oznaczono metodą immunoenzymatyczną z użyciem zestawu N-mid Osteocalcin One Step Elisa i Serum CrossLaps One Step Elisa firmy Osteometer Bio Tech, Dania. Aktywność kostnej frakcji fosfatazy alkalicznej badano metodą immunoenzymatyczną ELISA z zastosowaniem zestawu Alkphase-B firmy Metra Biosystem, USA. W analizie statystycznej użyto pakietu Statistica 6.0. Wyniki przedstawiono w postaci mediany i zakresu wartości (25-75%). Istotność różnic sprawdzono testem Manna-Whitneya. Za istotne statystycznie uznano różnice na poziomie ufności $p < 0,05$.

Wyniki

Zmiany parametrów obrotu kostnego w przebiegu leczenia w zależności od rokowania przedstawiono na Rycinach 1, 2 i 3. Stężenie osteokalcyny w momencie biopsji u chorych z korzystnym i niekorzystnym rokowaniem było podobne (Ryc. 1). W trakcie chemioterapii przedoperacyjnej w obu grupach pacjentów stężenie tego białka w surowicy krwi spadało o około 30-35%. Podczas leczenia pooperacyjnego wartości OC były wyższe o 15% u chorych dobrze rokujących, ale o 30% u rokujących źle. Po zakończeniu leczenia u pacjentów z rokowaniem korzystnym stężenie osteokalcyny utrzymywało się na podobnym poziomie (mediana 44,2 $\mu\text{g/L}$), natomiast w grupie źle rokujących było prawie 3-krotnie wyższe (mediana 122,8 $\mu\text{g/L}$, $p < 0,05$).

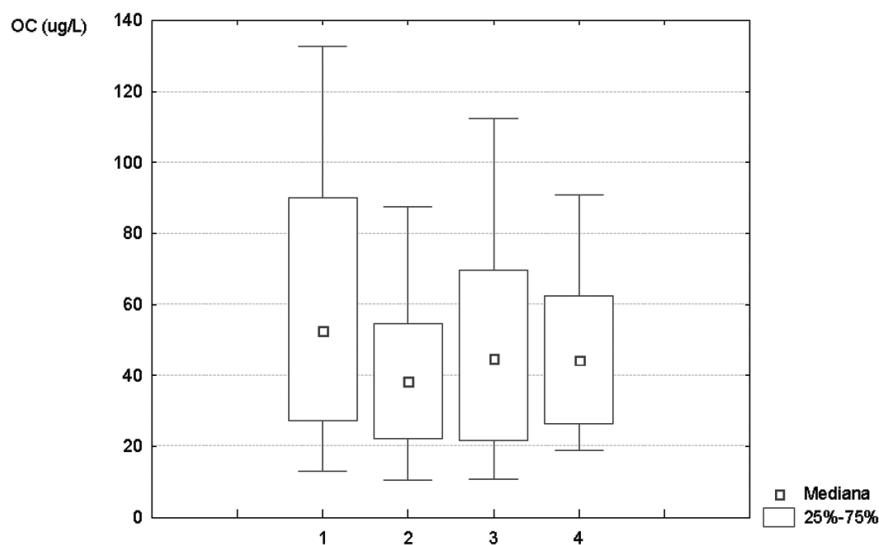
Aktywność kostnej frakcji fosfatazy alkalicznej w trakcie leczenia wstępnego była niższa o około 40% niż w momencie diagnozy i nie zmieniała się w sposób istotny podczas chemioterapii uzupełniającej. Natomiast po leczeniu u chorych ze złym rokowaniem w odróżnieniu od pacjentów z rokowaniem korzystnym aktywność BALP (mediana 37,5 U/L) była około 3-krotnie wyższa (mediana 104,8 U/L; $p < 0,02$) (Ryc. 2).

Poziom markera resorpcji CTX u pacjentów dobrze rokujących obniżył się w trakcie chemioterapii przedoperacyjnej o około 85%, następnie podczas leczenia pooperacyjnego wzrósł o 15% i pozostawał na podobnym poziomie po zakończeniu leczenia. Natomiast u chorych ze złym rokowaniem w trakcie chemioterapii przed zabiegiem spadek stężenia CTX był mniejszy, tylko o około 30%, a następnie podczas chemioterapii pooperacyjnej wzrastał o 30%. Po zakończeniu leczenia u pacjentów z progresją choroby poziom markera resorpcji kości był 2-krotnie wyższy (mediana 15528 pmol/L; $p < 0,002$) w porównaniu z wartościami uzyskanymi u chorych w okresie remisji (mediana 8195 pmol/L) (Rys. 3).

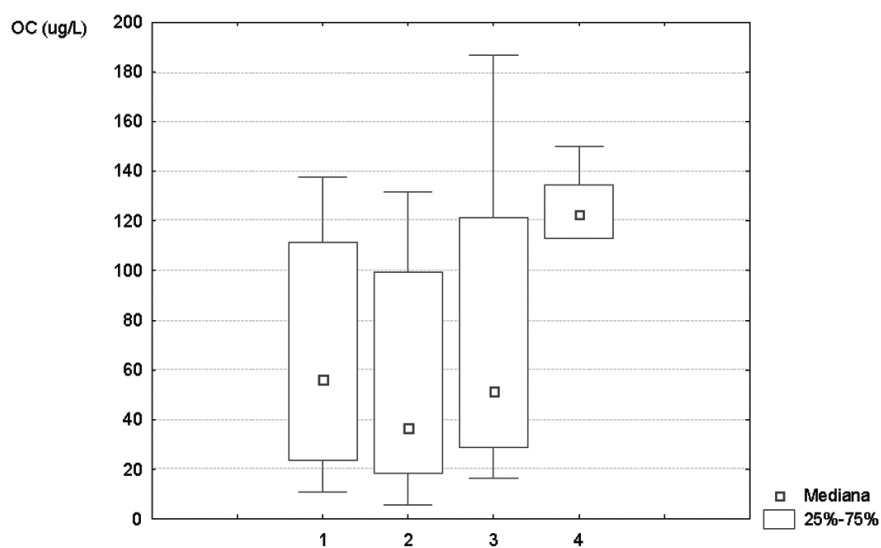
Dyskusja

W pracy wyróżniono dwie grupy dzieci z mięsakiem kościopochodnym korzystnie oraz niekorzystnie rokujących, z progresją choroby w trakcie leczenia. W obu grupach prześlędzono dynamikę zmian markerów obrotu kostne-

a)



b)

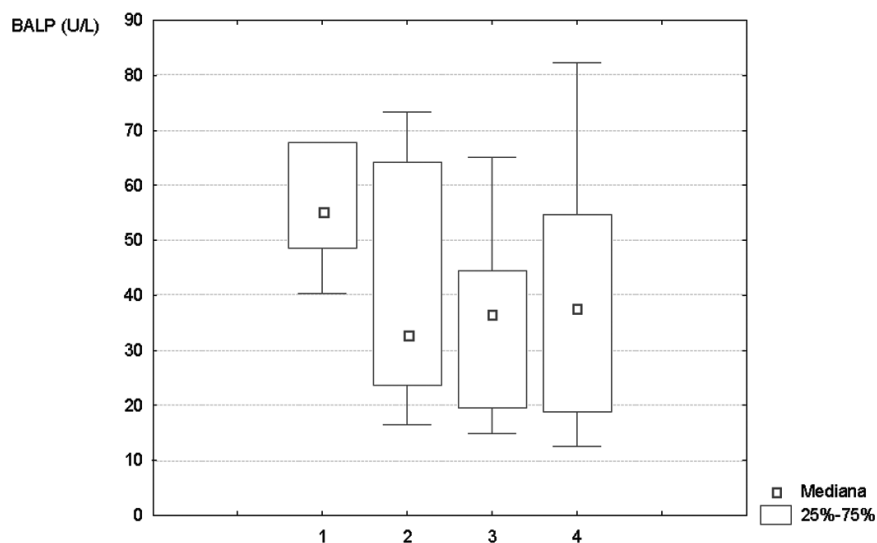


Ryc. 1. Stężenie OC w surowicy krwi pacjentów z korzystnym (a) i niekorzystnym (b) rokowaniem podczas diagnozy (1), chemioterapii przedoperacyjnej (2), chemioterapii pooperacyjnej (3) oraz po zakończeniu leczenia (4)

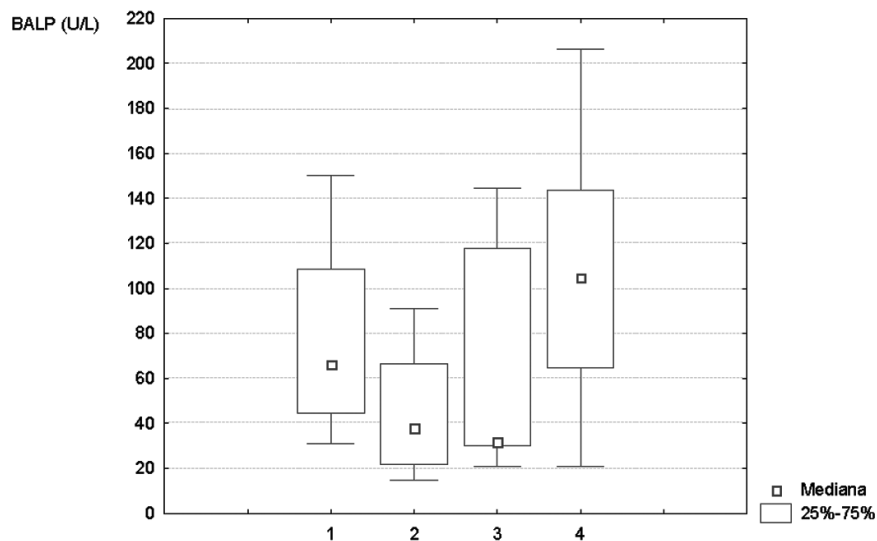
go przed leczeniem, w trakcie prowadzonego leczenia oraz po jego zakończeniu. Stężenie OC, BALP i CTX przed rozpoczęciem leczenia przeciwnowotworowego było często zbliżone w obu badanych grupach. W trakcie chemioterapii wstępnej, a także kontynuowanej po zabiegu operacyjnym u większości badanych pacjentów poziomy wszystkich trzech markerów metabolizmu kostnego ulegały znacznemu obniżeniu, chociaż były częściej wyższe u pacjentów z niekorzystnym rokowaniem niż u dobrze rokujących. Największe różnice pomiędzy badanymi grupami obserwowano po zakończonym leczeniu. U chorych z progresją choroby wartości obu markerów kościotworze-

nia były 3-krotnie wyższe, a CTX 2-krotnie wyższe niż u pacjentów z remisją. Z danych z piśmiennictwa wynika, że u pacjentów z rakiem prostaty, płuc, piersi i mięśniem Ewinga występuje wzrost aktywności BALP we krwi [8, 10, 15, 16]. W swoich badaniach Fontana i wsp. [9] oraz Jung i wsp. [17] stwierdzili u pacjentów z nowotworem prostaty wysokie wartości BALP współistniejące z przerzutami do kości. Zauważono ponadto, że aktywność tego enzymu koreluje pozytywnie nie tylko z liczbą potwierdzonych radiologicznie ognisk przerzutowych, lecz również ze stopniem zaawansowania choroby [8, 16, 18]. Obserwacje te, jak i wyniki własne dotyczące pacjentów

a)



b)



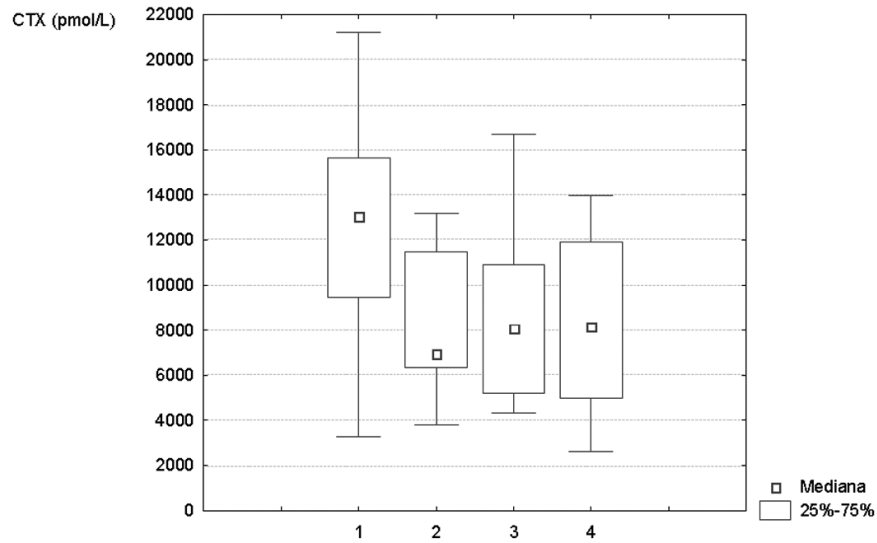
Ryc. 2. Aktywność BALP w surowicy krwi pacjentów z korzystnym (a) i niekorzystnym (b) rokowaniem podczas diagnozy (1), chemioterapii przedoperacyjnej (2), chemioterapii pooperacyjnej (3) oraz po zakończeniu leczenia (4)

z *osteosarcoma*, wskazują, że u tych chorych procesy kościotworzenia mogą być nasilone. Tym bardziej, że drugi marker kościotworzenia – osteokalcyna wydaje się mieć, podobnie jak BALP, wartość diagnostyczną w progresji *osteosarcoma*. Wcześniej użyteczność BALP oraz OC w diagnostyce mięsaka kościopochodnego sugerowali Fanburg i wsp. [19] i Nagoya i wsp. [20] w badaniach immunohistochemicznych.

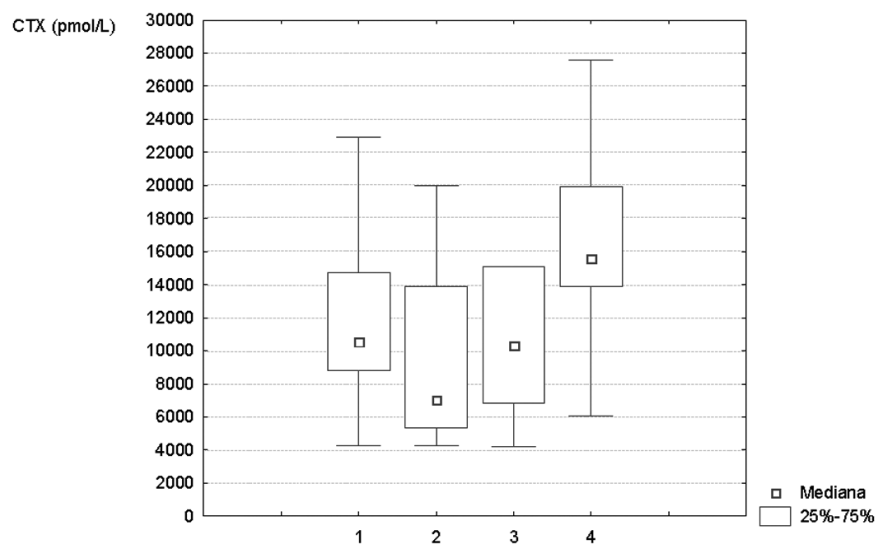
W literaturze dyskutuje się też wartość rokowniczą wskaźników resorpcji kości. Wydaje się, że zwiększone ich wydzielanie jest skutkiem wzmoczonych procesów resorpcji indukowanych przez proces nowotworowy. U do-

rosłych pacjentów z pierwotnymi guzami prostaty, płuc, piersi, nerek, gardła i układu pokarmowego stężenia wskaźników resorpcji kości są podwyższone [8, 15, 21-23]. Dotyczy to szczególnie pacjentów z przerzutami, u których stężenie CTX może być prawie 4-krotnie wyższe niż w grupie kontrolnej [9]. Berruti i wsp. [10] oraz Demers i wsp. [11] wykazali, że stężenia markerów resorpcji dodatkowo korelują z ilością ognisk przerzutowych i progresją nowotworu. Body i wsp. [24] sugerują, że ocena skuteczności leczenia przeciwnowotworowego z zastosowaniem markerów resorpcji kości może być zdecydowanie szybsza i bardziej czuła niż przy użyciu konwencjonal-

a)



b)



Ryc. 3. Steżenie CTX w surowicy krwi pacjentów z korzystnym (a) i niekorzystnym (b) rokowaniem podczas diagnozy (1), chemioterapii przedoperacyjnej (2), chemioterapii pooperacyjnej (3) oraz po zakończeniu leczenia (4)

nych metod radiologicznych i scyntygraficznych. Spadek stężeń tych wskaźników świadczy często o dobrej odpowiedzi na zastosowane leczenie, podczas gdy wzrost wskazuje na progresję choroby [25]. Obserwacje te są zgodne z naszymi wcześniejszymi i przedstawianymi w niniejszej pracy wynikami dotyczącymi pacjentów z konwencjonalnym, mieszanym podtypem *osteosarcoma* [12]. Nie można zatem wykluczyć, że u dzieci z mięsakiem kościopochodnym, podobnie jak w chorobie nowotworowej dorosłych, markery resorpcji mogą być prognostycznie użyteczne. Obserwacje te korespondują z badaniami Ferrari i wsp. [26], którzy u chorych z *osteosarcoma* stwierdzili zwiększo-

ne wydalanie z moczem markerów resorpcji kości. Autorzy ci wnioskują, że u dzieci z tym nowotworem intensywny proces resorpcji kości może być związany ze stopniem agresywności guza.

Wartość rokownicza wskaźników obrotu kostnego u dzieci i młodzieży z różnymi podtypami histologicznymi mięsaka kościopochodnego nie była dotychczas systematycznie badana. Z uzyskanych powyżej danych wynika, że wzrost wartości zarówno markerów kościotworzenia, jak i resorpcji kości u pacjentów z mieszanym podtypem *osteosarcoma*, często towarzyszy progresji choroby, podczas gdy ich obniżenie może wskazywać na dobrą odpowiedź

na leczenie. Wskaźniki te mogłyby być stosowane zarówno podczas prowadzonego leczenia przeciwnowotworowego, pozwalając na ocenę skuteczności stosowanej terapii, jak i po zakończeniu leczenia w ramach rutynowych badań kontrolnych w celu wykrywania ewentualnych wczesnych zmian przerzutowych. Jednakże, dopiero dalsze badania dotyczące metabolizmu kostnego zarówno w mieszanym podtypie jak i pozostałych podtypach *osteosarcoma*, pozwolą jednoznacznie ocenić wartość rokowniczą markerów kościotworzenia i resorpcji kości.

Wnioski

1. U dzieci i młodzieży z konwencjonalnym, mieszanym podtypem mięsaka kościopochodnego leczenie przeciwnowotworowe może obniżyć tempo obrotu kostnego na skutek hamowania zarówno procesu kościotworzenia, jak i resorpcji kości.
2. U pacjentów z konwencjonalną, mieszaną postacią *osteosarcoma*, wysokie wartości wskaźników kościotworzenia i resorpcji kości podczas leczenia i po jego zakończeniu wiążą się z rokowaniem niekorzystnym i mogą wskazywać na progresję choroby.

Dr n. biol. Joanna Gajewska
Instytut Matki i Dziecka
Zakład Biochemii Klinicznej
01-211 Warszawa, ul. Kasprzaka 17a
e-mail:biochem@imid.med.pl

15. Plebani M, Bernardi D, Zaninotto M i wsp. New and traditional serum markers of bone metabolism in the detection of skeletal metastases. *Clin Biochem* 1996; 29: 67-72.
16. Alatas F, Alatas O, Metintas M i wsp. Usefulness of bone markers for detection of bone metastases in lung cancer patients. *Clin Biochem* 2002; 35: 293-6.
17. Jung K, Lein M, Stephan C i wsp. Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications. *Int Cancer* 2004; 111: 783-91.
18. Berruti A, Piovesan A, Torta M i wsp. Biochemical evaluation of bone turnover in cancer patients with bone metastases: relationship with radiograph appearances and disease extension. *Br J Cancer* 1996; 73: 1581-7.
19. Fanburg JC, Rosenberg AE, Weaver DL i wsp. Osteocalcin and osteonectin immunoreactivity in the diagnosis of osteosarcoma. *Am J Clin Pathol* 1997; 108: 464-73.
20. Nagoya S, Uede T, Wada T i wsp. Detection of bone-type alkaline phosphatase by monoclonal antibodies reacting with human osteosarcoma-associated antigen. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 862-70.
21. Kir ZO, Oner P, Iyidogan YO i wsp. Serum prolidase I activity and some bone metabolic markers in patients with breast cancer: in relation to menopausal status. *Clin Biochem* 2003; 36: 289-94.
22. Noguchi M, Yahara J, Noda S. Serum levels of bone turnover markers parallel the results of bone scintigraphy in monitoring bone activity of prostate cancer. *Urology* 2003; 61: 993-8.
23. Vinholes J, Coleman R, Eastell R. Effects of bone metastases on bone metabolism: implication for diagnosis imaging and assessment of response to cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 1996; 22: 289-331.
24. Body JJ, Dumon JC, Gineys M i wsp. Comparative evaluation of markers of bone resorption in patients with breast cancer-induced osteolysis before and after bisphosphonate therapy. *Br J Cancer* 1997; 75: 408-12.
25. Coleman RE. Monitoring of bone metastases. *Eur J Cancer* 1998; 34: 252-9.
26. Ferrari S, Zolezzi C, Pratelli L i wsp. Urinary excretion of pyridinium cross-links and serum osteocalcin levels in patients with primary high-grade osteosarcoma. *Calcif Tissue Int* 2003; 73: 1-4.

Otrzymano: 27 marca 2006 r.

Przyjęto do druku: 23 maja 2006 r.

Piśmiennictwo

1. Szulc P, Seeman E, Delmas PD. Biochemical measurements of bone turnover in children and adolescents. *Osteoporos Int* 2000; 11: 281-94.
2. Seibel MJ. Molecular markers of bone turnover: biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporos Int* 2000; Suppl 6: 18-29.
3. Vinholes J, Coleman R, Eastell R. Effects of bone metastases on bone metabolism: implication for diagnosis imaging and assessment of response to cancer treatment. *Cancer Treat Rev* 1996; 22: 289-331.
4. Souberbielle JC, Cormier C, Kindermans C. Bone markers in clinical practice. *Curr Opin Rheumatol* 1999; 11: 312-9.
5. Seregeni E, Martinetti A, Ferrari L i wsp. Clinical utility of biochemical marker of bone remodeling in patients with metastases of solid tumors. *Q J Nucl Med* 2001; 5: 7-17.
6. Goltzman D. Osteolysis and cancer. *J Clin Invest* 2001; 107: 1219-20.
7. Demers LM. Biochemical markers in the management of patients with metastatic bone disease. *Clin Chem* 1999; 45: 1131-2.
8. Marchei P, Santini D, Bianco V i wsp. Serum ostease in the follow-up of breast cancer patients. *Anticancer Res* 1995; 15: 2217-22.
9. Fontana A, Delmas PD. Markers of bone turnover in bone metastases. *Cancer* 2000; 88: 2952-60.
10. Berruti A, Dogliotti L, Gorzegno G i wsp. Differential patterns of bone turnover in relation to bone pain and disease extent in bone in cancer patients with skeletal metastases. *Clin Chem* 1999; 45: 240-7.
11. Demers LM, Costa L, Lipton A. Biochemical markers and skeletal metastases. *Cancer* 2000; 88: 2919-26.
12. Ambroszkiewicz J, Gajewska J, Laskowska-Klita T i wsp. Biochemiczne wskaźniki procesu resorpcji kości u dzieci z osteosarcoma. *Med Wieku Rozwoj* 2004; 8: 225-33.
13. Gajewska J, Ambroszkiewicz J, Rychłowska-Pruszyńska M i wsp. Markery kościotworzenia u dzieci z osteosarcoma. *Med Wieku Rozwoj* 2004; 8: 235-43.
14. Bertoni F, Bacchini P. Classification of bone tumors. *Eur J Radiol* 1988; 27: 74-6.