3. Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Die Krankengeschichten und Befunde von 158 Patientinnen mit Mammakarzinom, die im Zeitraum von Mai 1993 bis Januar 1996 an den viertel-, halb- oder ganzjährlichen Nachsorgeuntersuchungen im Zentrum für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Justus-Liebig-Universität Gießen teilnahmen, wurden für diese Studie retrospektiv analysiert. 3 Patientinnen konnten im weiteren Verlauf der Arbeit nicht berücksichtigt werden, da bei ihnen extraossäre Metastasen diagnostiziert wurden.

3.1.1 Patienten

3.1.1.1 Altersverteilung und Menopausenstatus

Das durchschnittliche Alter der insgesamt 155 Patientinnen lag zum Zeitpunkt des operativen Eingriffs nach Diagnosestellung eines Mammakarzinoms bei 55 Lebensjahren, mit einem Minimum von 28 und einem Maximum von 84 Lebensjahren. Die Standardabweichung betrug 11,8 Lebensjahre. 9 % der Patientinnen wurden vor dem 40. Lebensjahr an der Brust operiert.

Zum Zeitpunkt der retrospektiven Befunderhebung war die jüngste Patientin 31 Jahre, die älteste 85 Jahre alt. Der Altersmedian lag bei 58 Lebensjahren, der Mittelwert bei 59 Lebensjahren, 43 % der Frauen befanden sich in der Postmenopause, 57 % waren prämenopausal.

3.1.1.2 Histologie des Mammakarzinoms

126 Patientinnen wiesen ein duktales Mammakarzinom auf. Bei 21 Frauen war ein lobuläres Karzinom nachweisbar. Das lobulär-duktale Karzinom, das meduläre Karzinom sowie das Paget-Karzinom wurden in Abbildung 1 unter andere histologische Typen des Mammakarzinoms zusammengefaßt.

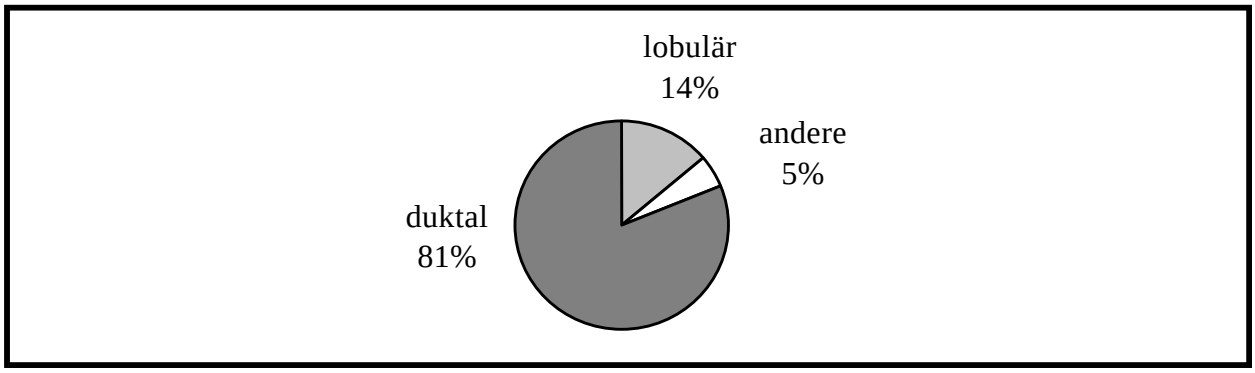

Abbildung 1: Histologische Typen des Mammakarzinoms (n = 155)

3.1.1.3 pTNM-Klassifikation (Stadieneinteilung siehe Anhang, Seite 110 und 111)

a) Tumorgröße (**pT**)

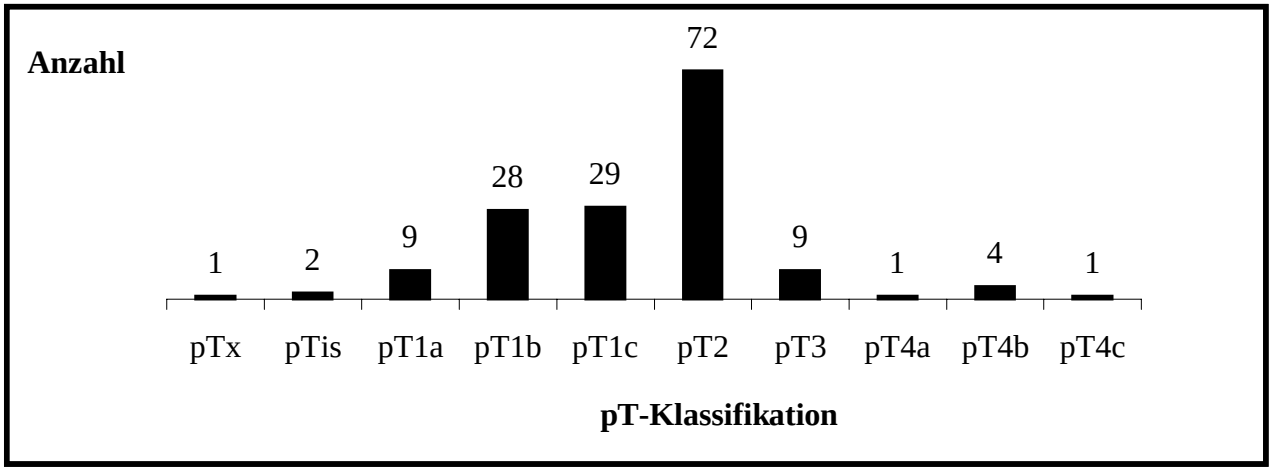

Abbildung 2: Verteilung der Patientinnen innerhalb der pT-Klassifikation

b) Regionäre Lymphknoten (**pN**)

76 der 155 Patientinnen wiesen keine regionären Lymphknotenmetastasen auf (pN0). Bei 5 Patientinnen waren die regionären Lymphknoten nicht zu beurteilen (pNx). Die histologische Untersuchung ergab bei 7 Frauen eine Mikrometastasierung der Lymphknoten (pN1a). Makrometastasen konnten in den regionären Lymphknoten von 67 Patientinnen diagnostiziert werden [pN1b (i)-pN1b (iv)] (Erläuterungen siehe Seite 111).

Die nächste Abbildung gibt einen detaillierten Überblick über das letztgenannte Patientenkollektiv.

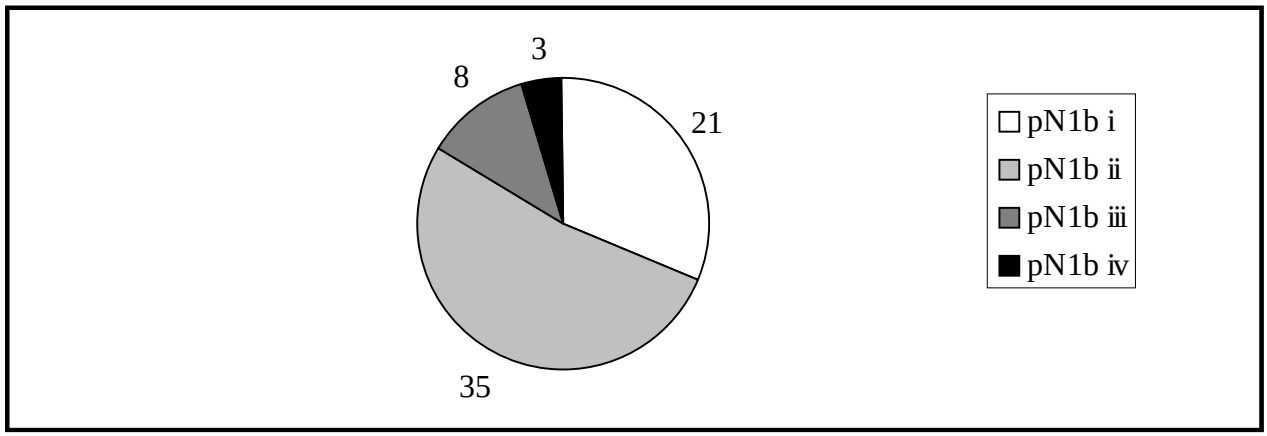

Abbildung 3: Patientinnen mit Makrometastasen (pN1b) in den verschiedenen Stadien

c) Fernmetastasen (**pM**)

Die Mehrheit der Patientinnen (n = 139) war zum Zeitpunkt der pTNM-Klassifizierung frei von Fernmetastasen (pM0). Bei 16 Patientinnen mit Mammakarzinom konnten Knochenmetastasen nachgewiesen werden.

3.1.2 Einschlußkriterien und Ausschlußkriterien

3.1.2.1 Einschlußkriterien

- histologisch gesichertes Mammakarzinom
- Operation des Mammakarzinoms an der Frauenklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen oder an auswärtigen Krankenhäusern
- verfügbare Befunde aus Laboruntersuchungen, Knochenszintigraphie, Röntgen und klinischen Untersuchungen
- zeitlicher Abstand zwischen den Befunden aus Labor, Röntgen und Knochenszintigraphie maximal 3 Monate

- bei Verlaufspatientinnen zeitlicher Abstand zwischen den Befundungszeitpunkten von mindestens einem halben Jahr

3.1.2.2 Ausschlußkriterien

- Unvollständigkeit und Unauswertbarkeit der Befunde aus Laboruntersuchungen, Knochenszintigraphie, Röntgen und klinischen Untersuchungen
- Zweitmalignom mit Knochenassoziation (beispielsweise Plasmozytom, Bronchialkarzinom)
- extraossäre Metastasen

3.1.3 Beobachtungszeitpunkte

Als Grundlage zur Definition der Beobachtungszeitpunkte diente der Zeitpunkt der Blutentnahme am Patienten zur Bestimmung der Laborparameter knochenalkalische Phosphatase, alkalische Phosphatase, carbohydrates Antigen und carcinoembryonales Antigen im Rahmen der Mammatumor-Nachsorge. Entsprechend diesem Zeitpunkt wurden die Befunde aus Knochenszintigraphie und Röntgen bei der Erkennung von Knochenmetastasen retrospektiv den Krankenakten entnommen. Dabei sollte die zeitliche Differenz zwischen den Befunden aus den bildgebenden Verfahren und den laborchemischen Verfahren maximal 3 Monate betragen (siehe Einschlußkriterien, Seite 20). Innerhalb der Testvergleichstudie sowie der Logitudinalstudie wurden nach dem ersten Beobachtungszeitpunkt weitere Befunde nach den oben genannten Kriterien aus laborchemischen und bildgebenden Verfahren zu späteren Beobachtungszeitpunkten erhoben. Als Minimalabstand zwischen den aufeinander folgenden Beobachtungszeitpunkten wurden 6 Monate definiert (siehe Einschlußkriterien, Seite 20). Tabelle 2 zeigt die Verteilung der Beobachtungszeitpunkte in der Testvergleich- und Longitudinalstudie bezogen auf die entsprechenden Patientenkollektive.

Tabelle 2: Verteilung der Beobachtungszeitpunkte

Testvergleichstudie (n = 12)				
Patientinnen	**Beobachtungszeitpunkte**	**Abstand zwischen den Beobachtungszeitpunkten**		
		Minimum (Monate)	***Maximum (Monate)***	***Mittelwert (Monate)***
12	2	8	19	12
Longitudinalstudie (n = 46)				
35	2	6	21	9
10	3	6	21	8
1	4	6	12	8

3.1.4 Datenerfassung

Die strukturierte Erfassung der Patientendaten erfolgte mit Hilfe des im Anhang (Seite 112-115) dargestellten Erhebungsbogens. Neben den Befunden aus den Nachsorgeuntersuchungen wurde er um wichtige Punkte für die Erkennung von Knochenmetastasen erweitert. Hierbei lag der Schwerpunkt vor allem auf Röntgen, Knochenszintigraphie und Laboruntersuchungen.

Die Laborparameter alkalische Phosphatase (Labor der Klinischen Chemie), carbohydrates Antigen 15-3 und carzinoembryonales Antigen (Labor der Universitätsfrauenklinik) wurden routinemäßig innerhalb der Universitätsklinik Gießen analysiert. Sie wurden den Krankenakten entnommen. Die Bestimmung der alkalischen Knochenphosphatase erfolgte vom Verfasser aus asservierten, tiefgefrorenen Serumproben bei den Behring-Werken in Marburg. Detailierte Angaben zu den einzelnen apparativen und nonapparativen diagnostischen Verfahren sind den Kapiteln Diagnostik und Analytische Methoden zu entnehmen (Seite 26-37).

3.1.4 Studieneinteilung und Patientenkollektive

3.1.4.1 Studien

a) Testvergleichstudie

Innerhalb der Testvergleichstudie wurde bei 12 Patientinnen mit knochenszintigraphisch und röntgenologisch sicher nachgewiesenen Knochenmetastasen die knochenalkalische Phosphatase mit 4 verschiedenen Testverfahren (Test Alkphase-B, Test Opus, Test Ostase, Test Syva) zu 2 Beobachtungszeitpunkten gemessen. Ziel war die Überprüfung der Wertigkeit der einzelnen Verfahren bei der Erkennung von Knochenmetastasen.

b) Querschnittstudie

Innerhalb der Querschnittstudie wurden die Laborparameter CA 15-3, CEA, AP und BALP von 155 Patientinnen vor dem Hintergrund von Knochenszintigraphie und Röntgen zu einem Beobachtungszeitpunkt retrospektiv auf ihre Wertigkeit bei der Erkennung von Knochenmetastasen analysiert.

c) Longitudinalstudie

Innerhalb der Longitudinalstudie wurden die Laborparameter CA 15-3, CEA, AP und BALP von 46 Patientinnen vor dem Hintergrund von Knochenszintigraphie und Röntgen zu mindestens 2 Beobachtungszeitpunkten (siehe Material und Methoden, Seite 21 und 22) retrospektiv auf ihre Wertigkeit bei der Erkennung von Knochenmetastasen im Verlauf überprüft. Die Longitudinalstudie sollte darüber Auskunft geben, mit welcher Sicherheit die Laborparameter auch bei wiederholten Messungen eine Knochenmetastasierung dokumentieren oder ausschließen.

3.1.4.2 Patientenkollektive

Sowohl in der Querschnittstudie als auch in der Longitudinalstudie erfolgte aufgrund der bildgebenden Verfahren eine Einteilung der Patientinnen in das Kollektiv der

knochenmetastasenfreien Patientinnen und in das Kollektiv der Patientinnen mit Skelettmetastasen.

I. Patientenkollektiv ohne Knochenmetastasen (Spezifität)

Patientinnen dieses Kollektivs wiesen zu keinem Zeitpunkt weder röntgenologisch noch szintigraphisch sichere Knochenmetastasen auf.

II. Patientenkollektiv mit Knochenmetastasen (Sensitivität)

Patientinnen dieses Kollektivs wiesen zu jedem Zeitpunkt in mindestens beiden bildgebenden Verfahren knochenmetastasenverdächtige Befunde oder in einem der Verfahren sicher befundete Knochenmetastasen auf.

3.1.6 Bewertungskriterien (Signifikanzkriterien)

Die Studie bedient sich zur Bewertung der Laborparameter BALP, AP, CA 15-3 und CEA bei der Erkennung von Knochenmetastasen der Validitätsparameter Sensitivität und Spezifität.

Die Sensitivität beschreibt in dieser Studie die Wahrscheinlichkeit, mit der ein Laborparameter positiv ist, wenn Knochenmetastasen vorliegen.

Die Spezifität entspricht in dieser Arbeit der Wahrscheinlichkeit, mit der sich ein Laborparameter im Normalbereich befindet, wenn keine Knochenmetastasen vorliegen.

Aus den im Verlauf des Testvergleichs zu beiden Beobachtungszeitpunkten ermittelten Sensitivitäten der einzelnen Testverfahren wurde zur besseren Vergleichbarkeit und zur Diskussion mit den Ergebnissen eine mittlere Zeitpunktsensitivität ermittelt.

$$\text{Mittlere Zeitpunktsensitivität} = \frac{\text{Sensitivität Zeitpunkt 1} + \text{Sensitivität Zeitpunkt 2}}{2}$$

Innerhalb der Testvergleich- sowie Longitudinalstudie wurde vom Verfasser eine Verlaufssensitivität und –spezifität definiert.

Verlaufssensitivität:

Wahrscheinlichkeit, mit der ein Laborparameter im gesamten Verlauf pathologisch erhöht ist, wenn gemäß den bildgebenden Verfahren im gesamten Verlauf Knochenmetastasen vorliegen.

Verlaufsspezifität:

Wahrscheinlichkeit, mit der ein Laborparameter im gesamten Beobachtungszeitraum normalwertig ist, wenn gemäß den bildgebenden Verfahren im gesamten Verlauf keine Knochenmetastasen vorliegen.

Um die innerhalb der Querschnitt- und Longitudinalstudie ermittelten Werte für Sensitivität und Spezifität besser vergleichen zu können, wurde vom Verfasser eine Gesamtspezifität und Gesamtsensitivität für die Laborparameter sowie die Parameterkombinationen definiert:

$$\text{Gesamtsensitivität} = \frac{\text{Sensitivität + Verlaufssensitivität}}{2}$$

$$\text{Gesamtspezifität} = \frac{\text{Spezifität + Verlaufsspezifität}}{2}$$

3.2 Diagnostik

3.2.1 Skelettszintigaphie

Die Skelettszintigraphie wurde mit einer Ganzkörper-Gammakamera (Firma Siemens, Typ Body Scan) im Zentrum für Radiologie, Abteilung Nuklearmedizin (Leitung: Prof. Dr. Dr. R. Bauer), der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

3.2.2 Röntgendiagnostik

Die röntgenologische Untersuchung der Patientinnen mit Mammakarzinom erfolgte mit dem Gerät Multix-UH von Siemens in der Abteilung Radiologische Diagnostik (Leiter: Prof. Dr. Rau) im Zentrum für Radiologie der Justus-Liebig-Universität in Gießen.

Technische Angaben

Röntgen der Hals-, Brust- und Lendenwirbelsäule in anterior-posteriorem Strahlengang:

Betriebsspannung = 75 kV

Röntgen der Hals-, Brust- und Lendenwirbelsäule in seitlichem Strahlengang:

Betriebsspannung = 70 kV

Röntgen des Beckens in anterior-posteriorem und lateralem Strahlengang:

Betriebsspannung = 70 kV

3.3 Analytische Methoden

3.3.1 Carbohydrates Antigen 15-3 (CA 15-3) und carcinoembryonales Antigen (CEA)

3.3.1.1 Blutentnahme und Aufbewahrung der Proben

Den Patientinnen wurde ca. 10 ml venöses Blut entnommen. Die Vollblutproben gelangten umgehend und bei Raumtemperatur in das Tumorlabor der Frauenklinik, wo sie in einer Kühlzentrifuge über einen Zeitraum von 5 Minuten zentrifugiert und der aliquotierte Überstand (Serum) bei -20 ° C eingefroren wurde.

3.3.1.2 Carbohydrates Antigen (CA 15-3)

Testhersteller

DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland

Methodik

Das CA 15-3 wurde bis zum 30.6.1994 innerhalb eines Radio-Immuno-Assays (RIA) quantitativ erfaßt. Hierbei wird das CA 15-3 durch einen monoklonalen Antikörper an eine Festphase gebunden. Ein weiterer radioaktiv (Jod 125) markierter monoklonaler Antikörper bindet an das CA 15-3. Die resultierende Radioaktivität, gemessen mit dem Gamma-Counter, ist der Aktivität des CA 15-3 direkt proportional.

Ab 1.7.1994 erfolgte die Bestimmung der Konzentrationen von CA 15-3 im Serum nach der Festphasen-Sandwich-Chemilumineszenz-Methode, wobei hier das CA 15-3-Antigen an einen Ligand-markierten monoklonalen (Maus) Anti-CA 15-3-Antikörper gebunden wird. Ein zweiter, mit alkalischer Phosphatase markierter, monoklonaler CA 15-3-Antikörper bindet an das gebundene CA 15-3. Zugegebenes Chemilumineszenz-Substrat (PPD) wird durch das Enzym umgesetzt, wodurch eine Lichtemission ausgelöst wird, die der CA 15-3-Antigen-Konzentration der Proben direkt proportional ist.

Meßwertgruppen des CA 15-3

Aufgrund der Anwendung von 2 verschiedenen Tests zur Messung des CA 15-3 wurden zur deskriptiven Auswertung innerhalb der Querschnitt- und Längsschnittstudie 2 Meßwertgruppen definiert. Eine Meßwertgruppe umfaßte die Werte des CA 15-3, die innerhalb eines Radio-Immuno-Assays gemessen wurden. Eine andere Meßwertgruppe beinhaltete Werte des CA 15-3, die mit einem Chemilumineszenztest gemessen wurden. Im Ergebnisteil dieser Arbeit erfolgte die deskriptive Auswertung für beide Meßwertgruppen separat, so daß für das CA 15-3 in den Ergebnistabellen für die Lage- und Häufigkeitsparameter jeweils 2 Werte angegeben sind. In den Tabellen wurde die

Zugehörigkeit der Lage- und Häufigkeitsparameter zu den entsprechenden Meßwertgruppen vom Autor durch ein hochgestelltes „**a“** (RIA-Test-Meßwertgruppe) und **„b“** (Chemilumineszenz-Test-Meßwertgruppe) gekennzeichnet. Durch eine Legende unterhalb der Tabelle wurde noch einmal auf diese Zugehörigkeit hingewiesen.

Normalwerte

Der Cut-Off -Wert betrug für Proben, die mit dem RIA-Test gemessen wurden, 21,2 U/ml und für Proben, die mit dem Chemilumineszenz-Test gemessen wurden, 51 U/ml.

3.3.1.3 Carcinoembryonales Antigen (CEA)

Testhersteller

DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland

Methodik

Das CEA wurde nach der Festphasen-Sandwich-Chemilumineszens-Methode bestimmt. Das Testprinzip beruht darauf, daß zunächst das CEA an die Festphase (Spezifischer monoklonaler CEA-Antikörper der Maus) bindet, um später eine weitere Bindung mit einem mit alkalischer Phosphatase markierten polyklonalen CEA-Antikörper (Kaninchen) einzugehen. Mit Zugabe des Chemilumineszenz-Substrates (PPD) wird eine Lichtemission ausgelöst, die der CEA-Konzentration in den Proben direkt proportional ist.

Normalwerte

Der allgemein akzeptierte Cut-Off-Wert betrug 5 ng/ml.

3.3.2 Alkalische Phosphatase (AP)

3.3.2.1 Testhersteller

Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland

3.3.2.2 Blutentnahme und Aufbewahrung der Proben

Patientinnen venös entnommenes Blut wurde im Zentrallabor der Justus-Liebig-Universität (Klinische Chemie, Leiter Prof. Katz) über einen Zeitraum von 5 Minuten bei 24 °C zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der alkalischen Phosphatase im Serum.

3.3.2.3 Methodik

Die Aktivität der AP im Plasma wurde durch einen Testsatz der Firma Boehringer, Mannheim, bestimmt („Optimierte Standardmethode der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie“). Bei einer Wellenlänge von 405 nm wird die Extinktionsänderung pro Minute gemessen, die durch die Reaktion von p-Nitrophenylphosphat und Wasser zu Phosphat und p-Nitrophenol ausgelöst wird. Die Extinktion pro Zeiteinheit nimmt proportional mit der Höhe der Aktivität der AP zu.

3.3.2.4 Normalwerte

60-170 U/l im Serum Erwachsener bei einer Betriebstemperatur des Gerätes von 25 °C.

3.3.3 Knochenalkalische Phosphatase (BALP)

3.3.3.1 Blutentnahme und Aufbewahrung der Proben

Die Blutentnahme und die Zubereitung der Proben erfolgte wie in dem in Punkt 3.3.1.1 beschriebenen Verfahren. Das nach der Bestimmung des CEA und CA-15-3 verbliebene Restserum wurde bei -20 °C eingefroren. Im Rahmen einer Kooperation übernahmen die Behring-Werke in Marburg die weitere anonyme Aufbewahrung der Serumproben. Die Lagerungstemperatur betrug hierbei -70 °C. 24 Stunden vor Testdurchführung wurden die Proben von einer Temperatur von -70 °C auf eine Temperatur von 2-8 °C gebracht, um sie dann unmittelbar vor Testbeginn auf Raumtemperatur zu temperieren. Zur Vermeidung von Aktivitäts- beziehungsweise Konzentrationsverlusten bei Mehrfachmessungen ein und derselben Serumproben erfolgte die Aufbewahrung dieser Proben bei einer Temperatur von 2-8 ° C, wobei sich an der allgemein anerkannten Aufbewahrungsfrist von 5 Tagen orientiert wurde. Tiefgefrorene Proben wurden nicht mehr als maximal 3 Mal aufgetaut und eingefroren *(PANIGRAHI et al., 1994)*. Zur quantitativen Bestimmung der knochenalkalischen Phosphatase kamen vier verschiedene Tests zur Anwendung.

3.3.3.2 Test SYVA (Hersteller: Syva Company, Kalifornien, USA)

Methodik

Auf eine mit Streptavidin versehene Festphase wird ein biotinylierter Antikörper aufgetragen, der eine Bindung mit dem Antigen (BALP) eingeht. Bei Zugabe eines enzymmarkierten zweiten Antikörpers und eines Chromogens kommt es zur Bildung eines blauen Farbkomplexes, dessen Lichtemission, abgestoppt mit einer Stoplösung (1N H_2SO_4) und gemessen bei einer Wellenlänge von 450 nm, der Konzentration der knochenalkalischen Phosphatase direkt proportional ist.

Material (Mengen bezogen auf einen Testkit a 48 Proben in Doppelbestimmung)

A) 1 Streptavidin beschichtete Polystyren Mikrotiterplatte

B) 10x Dulbecco's Phosphate Buffer Salt:
2 g KCL + 2 g KH_2SO_4 + 80 g NaCL + 2,16 g Na_2HPO_4 in 1l dest. Wasser, pH = 7,0

C) 1X Dulbecco's Phosphate Buffer Salt (1x DPBS):
100 ml 10x DPBS + 900 ml dest. Wasser

D) 3% BSA:
0,6 g BSA (Sigma Fraction V) + 20 ml 1x DPBS

E) 1% Tween-20:
5 ml Tween-20 + 495 ml 1x DPBS

F) 0,1% Tween-20:
100 ml 1% Tween-20 + 900 ml 1x DPBS

G) 1N H_2SO_4:
13,6 ml (98%) H_2SO_4 + 486 ml dest. Wasser

H) Antikörper Mixtur:
5,5 ml Assay Puffer + 96 µl HBR-1 + 1,0 µl 4G6-Biotin + 2,2 µl 3b2-HRP

I) Assay Puffer:
5 ml 3% BSA (Rinderserumalbumin) + 1,5 ml 1% Tween-20 + 8,5 ml 1x DPBS

J) Meßgerät: Behring ELISA Prozessor II (BEP II)

Procedere

1. Streptavidin Mikrotiter Platten 3x mit etwa 320 µl 0,1% Tween-20 pro Kammer waschen. Nach letzter Wäsche Platte mit Papierhandtuch abtrocknen.
2. 10 µl Probe oder Standard in jedes Fach.
3. 40 µl AP in jedes Fach.
4. 50 µl Antikörper- Mixtur in jedes Fach.
5. Schütteln der Platte per Hand über 20 Sekunden.
6. Inkubation der Platte bei Raumtemperatur über 60 Minuten.
7. Entfernung des Assay-Inhaltes eines jeden Faches mit dem Multikanal-Pipettierer.
8. Platte 5x mit 320 µl 0,1% Tween-20-Waschlösung pro Fach waschen. Nach letzter Wäsche mit Papiertuch trocknen.
9. 100 µl TMB-Chromogen-Lösung in jedes Fach.

10. Platte per Hand über 20 Sekunden schütteln.
11. Abdecken der Platte und Inkubation bei Raumtemperatur über 15-20 Minuten.
12. 100 µl 1n H_2SO_4 in jedes Fach.
13. Ablesen der Extinktion durch Gerät BEP II.

Auswertung

Die Quantifizierung der gemessenen Absorptionswerte erfolgte anhand der Standard-BALP-Kurve innerhalb eines computergestützten Auswertungsprogramms von Behring mit Hilfe einer 4-Parametergleichung.

Normalwerte

Als Normbereich wurde die 5-95 Perzentile der an einem Normalkollektiv gemessenen BALP-Werte ermittelt. Serumwerte größer als 9,9 ng/ml galten als pathologisch.

3.3.3.3 OPUS-Test (Hersteller: Behring, Marburg, Deutschland)

Methodik

Der Test funktionierte nach der gleichen Methode wie der oben beschriebene Test Syva. Allerdings minimierte sich innerhalb dieses Tests der manuelle Aufwand insofern, daß bis auf das Pipettieren der Seren in die Probenfächer der gesamte Test durch das Gerät OPUS-Plus von Behring durchgeführt wird.

Materialien

Es werden die gleichen Materialien wie innerhalb des Tests Syva verwendet.

Procedere

Das Gerät OPUS-Plus wird einerseits mit den Probenfächern, die jeweils 100 µl der Patientenseren enthalten, und andererseits mit sogenannten Modulen bestückt. Die Module beinhalten alle Substanzen, die im Verlauf des Tests mit der knochenalkalischen Phosphatase in Reaktion treten (Antikörper, Chromogen, Stoplösung). Die schließlich entstehende Lichtemission rechnet das Gerät anhand der vorher ermittelten und gespeicherten Standardkurve in die BALP-Konzentration um.

Auswertung

Die Quantifizierung der gemessenen Absorptionswerte erfolgte anhand der Standard-BALP-Kurve innerhalb eines computergestützten Auswertungsprogramms von Behring mit Hilfe einer 4-Parametergleichung.

Normalwerte

Als Normbereich wurde die 5-95 Perzentile von Serumproben eines Normalkollektivs ermittelt. BALP-Werte größer als 9,8 ng/ml wurden als pathologisch definiert.

3.3.3.4 Alkphase-B-Test (Hersteller: Metra Biosystems, Inc., Kalifornien, USA)

Methodik

Der Test ist ein Enzym-Immuno-Assay zur quantitativen Bestimmung der Aktivität des knochenspezifischen Isoenzyms der alkalischen Phosphatase. In einem ersten Schritt bindet das BALP der Proben an die monoklonalen Antikörper der Festphase. Anschließend zugegebenes Substrat, p-Nitrophenylphosphat (pNPP), wird vom gebundenen Enzym zu einem farbigen Endprodukt umgesetzt. Die Abstoppung der Reaktion erfolgt durch Zugabe einer Stop-Lösung (1N NaOH). Die bei einer Wellenlänge

von 450 nm gemessene optische Dichte der Lösung ist der Aktivität der Probe direkt proportional.

Materialien

A) Anti-BALP-beschichtete Mikrostrips für 96 Bestimmungen
B) BALP-Standards mit den Aktivitäten: 0, 2, 20, 50, 80 und 140 U/l gebrauchsfertig
C) Assaypuffer, gebrauchsfertig
D) Substratpuffer, gebrauchsfertig
E) Waschpuffer, Konzentrat
F) p-Nitrophenyl-Phosphat (pNPP)-Tabletten
G) BAP-Kontrollen, gebrauchsfertig
H) Stoplösung (1N NaOH), gebrauchsfertig
I) Mikrostrip-Rahmen

Procedere

1. Entsprechende Anzahl von Mikrostrips zum Ansatz von Standards des Testsystems, Kontrollen und Proben in Doppelbestimmungen vorbereiten.
2. Jeweils 125 µl Assaypuffer auf den Boden der Fächer pipettieren.
3. 20 ml der Standards, Kontrollen und Proben entsprechend der Plattenbelegung in die Mikroküvetten pipettieren.
4. Mikrostrips abdecken und 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
5. Dekantieren und 4x mit jeweils 250 ml verdünntem Waschpuffer waschen. Zur Entfernung der gesamten Waschflüssigkeit sind die Mikrostrips nach jedem Waschschritt umzudrehen und auf Fließpapier abzuklopfen.
6. 150 µl Substratlösung in jede Mikroküvette pipettieren.
7. Mikrostrips abdecken und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
8. 100 µl Stoplösung (1N NaOH) zu jeder Mikroküvette zugeben.
9. Messung der optischen Dichte aller Proben im Spektralphotometer (BEP II) bei 405 nm.

Auswertung

Die Auswertung des Alkphase-B-Assays erfolgte durch eine quadratische Kurvenanpassung. Innerhalb eines von Behring entwickelten standardisierten statistischen Auswertungsprogrammes wurden die optischen Dichten der Standards linear (logarhythmisch) gegen die BALP-Aktivitäten aufgetragen. Über die optischen Dichten der Proben konnten die entsprechenden BALP-Aktivitäten aus der Standardkurve ermittelt werden.

Normalwerte

Als Normbereich wurde die 5-95 Perzentile von Serumproben eines Normalkollektivs ermittelt. Werte über 25,3 U/l galten als pathologisch.

3.3.3.5 Ostase-Test (Hersteller: Hybritech, Belgien)

Methodik

BALP-haltige Proben werden mit einer Plastikkugel (Festphase) zur Reaktion gebracht, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen das BALP-Molekül beschichtet ist. Ein weiterer radioaktiv markierter monoklonaler Antikörper bindet an die knochenalkalische Phosphatase. Die resultierende Radioaktivität der Kugeln wird mit einem Gamma-Counter gemessen. Sie ist direkt proportional der Konzentration der knochenalkalischen Phosphatase in der Probe.

Materialien

A) Markierter Antikörper (2 x 5 ml)
   Monoklonales Maus-IgG (gegen BALP) in einer Rinderprotein-/Pferde-Serummatrix mit weniger als 222 kBq (6µCi) 125 J pro Fläschchen, blauem Farbstoff und 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel.

B) Beschichtete Kugeln (1 x 100 Kugeln)
   Plastikkugeln mit monoklonalem Maus-IgG (gegen BALP) beschichtet, in Puffer mit 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel
C) Nullstandard/Verdünner (A) (1 x 10 ml)
   Rinderprotein-Matrix ohne meßbaren (0 µg BALP/l) Anteil an BALP und 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel.
D) BALP-Standards (B-F) (5 x 1 ml)
   Rinderprotein-Matrix mit etwa 15, 30, 45, 60 und 120 µg BALP/l, blauem Farbstoff und 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel.
E) Niedrige Kontrolle (1 x 1 ml)
   Mit etwa 20 µg BALP/L in einer Rinderprotein-Matrix, blauem Farbstoff und 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel.
F) Hohe Kontrolle (1 x 1 ml)
   Mit etwa 90 µg BALP/l in einer Rinderprotein-Matrix, blauem Farbstoff und 0,1% Natriumazid als Konservierungsmittel.
G) Waschkonzentrat (2 x 18 ml)
   Detergenz-Lösung mit 0,3% Natriumazid als Konservierungsmittel.

Procedere

1. 100 µl Standards (A-H), Kontrollen (1-2) und Proben gemäß Beschriftung in die Teströhrchen pipettieren.
2. 100 µl Tracer-Antikörper in jedes Teströhrchen pipettieren.
3. Teströhrchenständer von Hand 15 Sekunden schütteln, um Reagentien zu mischen.
4. In jedes Teströhrchen eine Kugel geben.
5. Teströhrchenständer von Hand 15 Sekunden schütteln.
6. Teströhrchen abdecken und bei 2-8 °C im Kühlschrank über 19 Stunden inkubieren lassen.
7. Nach der Inkubation den Ständer wieder in Umgebung mit Raumtemperatur überführen und die Kugeln dreimal waschen.
8. Teströhrchen im Gamma-Counter messen.

Auswertung

Innerhalb eines von Behring entwickelten standardisierten statistischen Auswertungsprogrammes wurden die Counts pro Minute der Standards linear (logarhythmisch) gegen die BALP-Konzentrationen aufgetragen. Über die Counts der Proben errechneten sich die entsprechenden BALP-Aktivitäten aus der Standardkurve.

Normalwerte

Als Normwert wurde ein vom Testhersteller an gesunden Populationen Erwachsener ausgetesteter Wert zugrunde gelegt. Demnach waren alle gemessenen Werte über 21,3 µg/l pathologisch.

3.3 Methoden der deskriptiven Statistik und Korrelation von Meßdaten

3.3.1 Deskriptive Statistik

Die deskriptive Statistik diente dem Autor zur Beschreibung, Darstellung und Strukturierung der in der Testvergleich-, Querschnitt- und Logitudinalstudie zu den entsprechenden Patientenkollektiven ermittelten Meßdaten der Laborparameter BALP, AP, CA 15-3 und CEA. Im Rahmen dieser Statistik wurde die für die weitere Auswertung wichtige Frage geklärt, ob innerhalb der einzelnen Studien eine Normalverteilung der Meßwerte der Laborparameter vorlag.

3.4.1.1 Beschreibung der Meßwerte durch repräsentative Größen

Innerhalb dieser Arbeit erfolgte die Unterteilung der Meßwerte der Laborwerte in **„normal“** und **„pathologisch“**. Voraussetzung war die Definition eines **Cut-off-Levels**, das heißt einer definierten Grenze zwischen normalen und pathologischen Meßwerten. Die Cut-off-Level der einzelnen Laborparameter können dem Kapitel Analytische Methoden (Seite 26-37) entnommen werden.

3.4.1.2 Minimum und Maximum der Meßwerte

Um die Spannweite der Meßwerte der Laborparameter darzustellen, wurde der **größte und kleinste gemessene Wert** der Laborparameter ermittelt. **Minimum und Maximum** der Meßwerte wurden im Verlauf dieser Arbeit bei der tabellarischen Auflistung mit **„MIN“** und **„MAX“** abgekürzt.

3.4.1.3 Häufigkeiten

Zur Beschreibung der Meßwertdaten wurden vom Verfasser **absolute Häufigkeiten** ermittelt. Normalerweise werden hierbei gleiche Merkmalsausbildungen ausgezählt. Da es sich aber bei den Meßwerten der Laborparameter um stetige Merkmale handelte, war es sinnvoll, die Meßwerte in **Meßwertgruppen (Meßwertklassen)** zusammenzufassen. Um die Klassenanzahl festzulegen, kam folgende Formel zur Anwendung:

$$\textbf{Klassenanzahl } k \approx 1 + 3{,}22 * \log_{10}(n)$$

3.4.1.4 Graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Meßwerte

Innerhalb dieser Arbeit kamen 2 Formen der graphischen Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Meßwerte der Laborparameter zur Anwendung, das

Häufigkeitpolygon in der Testvergleichsstudie und das **Histogramm** in der Querschnitt- und Longitudinalstudie. Voraussetzung für beide Darstellungsformen war die Ermittlung der Meßwertklassen der Laborparameter und die Berechnung der **Klassenmitten** der Meßwertklassen nach folgender Formel:

$$\textbf{Klassenmitte} = \frac{\textbf{Summe der Meßwerte pro Klasse}}{\textbf{Anzahl der Meßwerte pro Klasse}}$$

Die Klassenmitten wurden auf der X-Achse und die absoluten Häufigkeiten auf der Y-Achse aufgetragen. Innerhalb des Histogramms entstanden Blöcke. Im Häufigkeitspolygon wurden die Punkte durch Geraden verbunden.

3.4.1.5 Beurteilung der graphischen Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Meßwerte

Zur Beschreibung der Häufigkeitspolygona und Histogramme bediente sich der Verfasser der Anzahl und Lage des Maximums der absoluten Häufigkeit. Nach der Anzahl der Maxima werden uni- und multimodale (ein- und mehrgipflige) Verteilungen, nach der Lage der Maxima linksgipflige und rechtsgipflige Verteilungen unterschieden. Aus der Anzahl und Lage der Meßwerte im Häufigkeitspolygon und im Histogramm läßt sich eine Aussage über die Art der Häufigkeitsverteilung treffen. So stellt sich ein Häufigkeitspolygon und ein Histogramm innerhalb einer **Normalverteilung** der Meßwerte als unimodal und symmetrisch (glockenförmig) dar. Symmetrisch bedeutet, daß die Fläche unter der Verteilungskurve in 2 spiegelbildliche Flächen unterteilt werden kann.

3.4.1.6 Lageparameter der Meßwerte

Lageparameter sollen möglichst den Meßwert angeben, der in der Mitte aller beobachteten Meßwerte liegt. Zur Beschreibung dieser zentralen Tendenz dienten dem

Autor die Parameter Modus, Median und arithmetischer Mittelwert. Der **Modus** gibt den Meßwert mit der größten Häufigkeit an. Der **Median** teilt die Menge der Meßwerte in zwei anteilsmäßig gleichgroße Teile. Das bedeutet 50 % der Meßwerte sind kleiner beziehungsweise größer als der Median. Der **arithmetische Mittelwert** berechnet sich aus der Summe aller Meßwerte dividiert durch die Anzahl der Meßwerte.

3.4.1.6 Zusammenhang zwischen den Lageparametern der Meßwerte

Es bestehen Zusammenhänge zwischen den Lageparametern Modus, Median und arithmetischem Mittelwert, die Einfluß auf die Häufigkeitsverteilung der Meßwerte der Laborparameter und damit auf die graphische Darstellung der Verteilungskurve der Meßwerte (Histogramm, Häufigkeitspolygon) haben. Diese Beziehungen der Lageparameter untereinander stellen sich folgendermaßen dar:

a) Unimodale symmetrische Verteilung **(Normalverteilung)**
   Modus ≈ Median ≈ Arithmetischer Mittelwert

b) Linksgipflige Verteilung
   Modus < Median < Arithmetischer Mittelwert

c) Rechtsgipflige Verteilung
   Arithmetischer Mittelwert < Median < Modus

3.3.2 Korrelation der Meßwerte

3.4.2.1 Korrelation der Meßwerte

Eine Korrelation wird durchgeführt, um den Grad des Zusammenhangs verschiedener Merkmale zu untersuchen. Um den Grad der Korrelation festzulegen, wurde der **Korrelationsquotient** berechnet. Die Werte des Korrelationsquotienten bewegen sich in einem Bereich zwischen –1 und +1. Je mehr sich der Wert des Quotienten von Null

entfernt, desto stärker ist die Korrelation. Da die Meßwerte der Laborparameter sowohl in der Testvergleich- als auch in der Querschnittstudie keiner Normalverteilung unterlagen, wurde zur Errechnung der Korrelationskoeffizienten das **Verfahren nach Spearman** verwendet. Die Korrelation galt als signifikant, wenn der Korrelationskoeffizient eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner oder gleich 0,05 aufwies.

3.4.2.2 Graphische Darstellung der Korrelation der Meßwerte

Die Korrelationen der Meßwerte der Laborparameter in der Testvergleich- und Querschnittstudie wurden in dieser Arbeit als Punktwolkendiagramme mit Regressionsgeraden graphisch dargestellt. Innerhalb der Testvergleichstudie erfolgte die Auftragung der Meßwerte der BALP der zu korrelierenden Testverfahren an der X- beziehungsweise Y-Achse. In der Querschnittstudie wurden die Meßwerte von 2 Laborparametern an X- und Y-Achse gegeneinander aufgetragen. Graphisch entstanden so Punkte, die in ihrer Gesamtheit eine **Punktwolke** ergaben. Unter der Annahme, daß ein linearer Zusammenhang zwischen den Meßwerten bestand, wurde eine **Regressionsgerade** durch die Punktwolke gelegt. Regressionsgeraden sind eindeutig bestimmte Geraden, die der Bedingung genügen, daß die Summe der Abstandsquadrate der Punkte zur Geraden minimal wird. Die Streuung der Punkte um die Regressionsgerade ist ein Spiegelbild für den Grad der Korrelation zweier Merkmale.

3.4 Datenverarbeitung

Die Datenerfassung sowie die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit den Software-Programmen Excel (Microsoft), Version 7.0 (später Version 8.0) und dem statistischen Auswertungsprogramm SPSS, 7.5.0. Die Korrelationen in dieser Arbeit wurden nach dem Spearman-Verfahren mit Unterstützung von SPSS durchgeführt.