

Abschlussbericht zum Projektantrag 03/13

„Etablierung LC-MS/MS basierter, altersabhängiger pädiatrischer Referenzintervalls für Konzentrationen von Monoamin-Metaboliten in Plasma und Urin zur Diagnostik monoamin-produzierender Neuroblastome“

Antragsteller:

Dr. rer. nat. Mirko Peitzsch

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin

Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der TU Dresden

Nebenantragsteller:

Prof. Dr. Angela Hübner

Fachbereich Endokrinologie und Diabetologie

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin am

Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der TU Dresden

Prof. Graeme Eisenhofer (PhD)

Klinische Neurochemie

Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin

Universitätsklinikum Carl Gustav Carus an der TU Dresden

Projektlaufzeit:

**01.05.2013 – 30.04.2015 (bis 31.12.2016 mit kostenneutraler
Verlängerung)**

Zusammenfassung:

Hintergrund: Neuroblastome sind extra-kranielle solide Tumore im Kindesalter, welche ca. 8,5% aller malignen Erkrankungen darstellen. Diese Tumore produzieren wie auch Phäochromozytome Katecholamine, die aufgrund begrenzter Kapazität zur Lagerung und Sekretion weitgehend in den Tumorzellen metabolisiert werden. Katecholaminmetabolite stellen daher die Basis für die laborchemische Diagnostik dar, wobei speziell in diesem Fall seit langem die Stoffwechselprodukte Vanillinmandelsäure (VMS) und Homovanillinsäure (HVS) im Urin trotz begrenzter diagnostischer Sensitivität verwendet werden. Im Gegensatz dazu zeigen die O-methylierten Metabolite Normetanephrin (NMN), Metanephrin (MN) und 3-Methoxytyramin (MTY) bei der Diagnostik von Phäochromozytomen gegenüber anderen Markersubstanzen eine überlegene Sensitivität. Dies sollte auch für die laborchemische Diagnose von Neuroblastomen zutreffen.

Methoden: Plasmakonzentrationen von NMN, MN und MTY wurden in 3 Patientengruppen gemessen: 1) Kinder ohne Anzeichen eines katecholaminproduzierenden Tumors als Referenzgruppe (265 Mädchen und 268 Jungen im Alter zwischen 2 Tagen und 18 Jahren), 2) 54 Kinder mit bestätigter Neuroblastomdiagnose und 3) 31 Kinder mit initialem Verdacht auf Neuroblastom, aber ausgeschlossener Diagnose.

Ergebnisse: Unter Verwendung der altersabhängigen, kontinuierlichen Referenzbereiche konnte bei 53 von 54 Neuroblastompatienten eine Erhöhung von NMN und/oder MTY oberhalb der Referenzbereichsgrenzen festgestellt und damit eine diagnostische Sensitivität von 98,1% in Verbindung mit einer Spezifität von 96,8% beobachtet werden. Im Gegensatz dazu, wurde für die Urinmarker VMS und HVS eine Sensitivität von 89,5% sowie eine Spezifität von 91,3% beobachtet. Die Beurteilung mittels einer *Receiver-operating-characteristic*-Kurvenanalyse zeigte die Überlegenheit von NMN/MTY gegenüber VMS/HVS mit Flächen unter der Kurve von 0,998 gegenüber 0,947 ($P < 0,05$).

Schlussfolgerung: NMN und MTY im Plasma als Biomarker zur Diagnose von Neuroblastomen erscheinen den üblicherweise verwendeten Biomarkern im Urin VMS und HVS in der diagnostischen Leistungsfähigkeit überlegen. Diese Überlegenheit muss in zukünftigen, prospektiven Studien hinsichtlich Diagnostik und Therapiekontrolle von Neuroblastompatienten bestätigt werden.

1. Hintergrund

Die Interpretation klinisch-chemischer Untersuchungsergebnisse bzw. deren Verwendung als Tumormarker/Biomarker basiert üblicherweise auf Vergleichen zwischen Wertebereichen gesammelt in gesunden Personengruppen und den jeweiligen Patienten, die im Verdacht stehen, an einer bestimmten Erkrankung zu leiden. In dem o.g. Projekt ging es um die Etablierung solcher altersabhängiger, pädiatrischer Referenzbereiche für Monoamin-Metabolite mittels der modernen Flüssigchromatographie-Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS), welche bei der diagnostischen Beurteilung von Erkrankungen bezüglich eines Monoamin-produzierenden Tumors verwendet werden sollen.

Im Wesentlichen handelt es sich hierbei um Neuroblastome, welche als extrakranielle solide Tumore mit ca 8,5 % aller malignen Erkrankungen bei Patienten unter 15 Jahren auftreten (1). Neben diesen gibt es weiterhin die Phäochromozytome, die, wie auch die Neuroblastome durch eine Überproduktion von Katecholaminen gekennzeichnet sind.

Diese Überproduktion an Katecholaminen macht man sich zu Nutze, um o.g. Tumorentitäten labordiagnostisch zu identifizieren. Hierbei profitieren derzeit vor allem Erwachsene aus den Erfahrungen der letzten Jahre, wo mehrfach gezeigt werden konnte, dass zur Diagnostik des Phäochromozytoms die O-methylierten Katecholamin-Metabolite Normetanephrin (NMN; Metabolit von Noradrenalin), Metanephrin (MN; Metabolit von Adrenalin) und 3-Methoxytyramin (MTY; Metabolit von Dopamin), den „Mutterkatecholaminen“, aber auch anderen Metaboliten wie Homovanillinsäure (HVS) und Vanillinmandelsäure (VMS) im Urin in Sensitivität und Spezifität überlegen sind (2). Im Gegensatz dazu werden zur laborchemischen Diagnostik des Neuroblastoms bei Kindern weiterhin die Endprodukte des Katecholamin-Stoffwechsels HVS (Metabolit von Dopamin) und VMS (Metabolit von Noradrenalin und Adrenalin) eingesetzt, obwohl zahlreiche Studien seit nunmehr 50 Jahren zeigen, dass die diagnostische Sensitivität mit $\leq 80\%$ dieser Stoffwechselendprodukte unzureichend ist (3-6).

Ziel des Projektes war es primär, altersabhängige pädiatrische Referenzbereiche für die O-methylierten Katecholaminmetabolite NMN, MN und MTY in Blutplasma und Urin zu erstellen, sowie sekundär die diagnostische Sensitivität und Spezifität der neu zu etablierenden Biomarker/Tumormarker abzuschätzen.

Hierfür wurden stationär und ambulant behandelte Patienten der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Dresden für die Teilnahme gewonnen sowie jugendliche gesunde Freiwillige an Dresdner Schulen rekrutiert. Diese Handlungsweise wurde durch die Ethikkommission der TU Dresden genehmigt (EK 113042013). Grundsätzlich waren für die Teilnahme die im Studienprotokoll (Pediatric Reference Intervals for Monoamine Metabolites and Steroids, PRIMMS) genannten Ein- und Ausschlusskriterien zu beachten. Außerdem musste in jedem Fall eine entsprechende Einverständniserklärung der Eltern bzw. der Sorgeberechtigten vorliegen.

2. Ergebnisse

Zwischen September 2013 und Oktober 2016 wurden insgesamt 620 Kinder, 300 Mädchen und 322 Jungen, im Alter zwischen 2 Tagen und 18 Jahren in die Studie eingeschlossen. Hierbei handelte es sich um 71 gesunde Freiwillige aus Dresdner Schulen und 551 stationär und ambulant behandelte Patienten der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Universitätsklinikums Dresden, inklusive 6 Patienten mit einem katecholamin-produzierenden Tumor (1 Phäochromozytom, 13,9 Jahre, männlich; 4 Neuroblastome, 3 Tage, 4 Monate, 11,6 Monate und 3,9 Jahre, männlich; 1 Ganglioneurom, 5,7 Jahre, weiblich) und 31 Patienten (13 Mädchen im Alter zwischen 11,5 Monaten und 16,3 Jahren; 18 Jungen im Alter zwischen 5 Tagen und 16,8 Jahren), mit initialem Verdacht auf einen katecholamin-produzierenden Tumor. 50 Patienten (20 Mädchen im Alter von 2 Tagen bis 12,2 Jahre, 30 Jungen im Alter von 2 Tagen bis 10,4 Jahre) wurden nachträglich aus der Studie ausgeschlossen, da Probenmaterial fehlte bzw. in ungenügenden Mengen zur Verfügung stand.

Zur Ermittlung der altersangepassten Referenzbereiche von NMN, MN und MTY im Plasma als primäres Projektziel wurden letztlich Proben von 533 Kindern im Alter zwischen 2 Tagen und 17,9 Jahren verwendet. Hierfür wurde eine im Haus etablierte LC-MS/MS - basierte Methode zur Bestimmung dieser Parameter verwendet (7;8).

Zur Beurteilung der diagnostischen Sensitivität der erstellten Referenzbereiche als sekundärem Ziel wurden die o.g. Tumorpatienten sowie Probenmaterial von 22 Neuroblastompatienten vom St. Jude Children Research Hospital Memphis (TN), USA (Kooperationspartner Dr. Barry Shulkin), und 29 weiteren Neuroblastompatienten aus der Neuroblastomstudie des Universitätsklinikums Köln (Kooperations-partner Dr. Frank

Berthold und Dr. Barbara Hero) verwendet. Die diagnostische Spezifität wurde mittels der o.g. Patienten mit Verdacht auf Neuroblastom überprüft.

2.1 Erstellung altersabhängiger Referenzbereiche

Innerhalb der Referenzgruppe waren die Mädchen etwas älter als die Jungen (medianes Alter 9,9 Jahre vs. 7,2 Jahre, $P \leq 0,0001$). Die medianen Plasmakonzentrationen von MTY, NMN und MN wurden jeweils 1,2-, 1,3- und 1,2-fach höher ($P \leq 0,0001$) in der Gruppe der Jungen bestimmt, was sich ebenso innerhalb der unterschiedlichen Altersgruppen zeigte (Tabelle 1). Die tatsächlich beobachteten Konzentrationsbereiche der Plasma-Metanephrine waren allerdings sehr ähnlich bei Jungen und Mädchen. Aus diesem Grund wurde eine evtl. Geschlechtsabhängigkeit bei der Erstellung der Referenzbereiche nicht in die Auswertung der Daten einbezogen. Dies steht im Einklang mit der Herangehensweise zur Etablierung von Referenzbereichen für Plasma-Metanephrine bei Erwachsenen (9).

Weiterhin wurde eine deutliche Altersabhängigkeit der Plasmakonzentrationen beobachtet. Für NMN wurde bei Neugeborenen eine mediane Konzentration von 259 pg/mL bestimmt, welche innerhalb des ersten Lebensjahres sehr stark abgefallen ist, und schließlich bei Jugendlichen zwischen 13 und 18 Jahren mit 59 pg/mL bestimmt wurde (Tabelle 1, Abbildung 1). Ein ähnliches Bild wurde ebenso für MTY mit 28 pg/mL bei Neugeborenen und 4 pg/mL bei Jugendlichen beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde MN bei Neugeborenen eher niedriger bestimmt, welches dann über die weiteren Altersgruppen angestiegen ist.

Abschlussbericht – Projekt 3/13

Etablierung LC-MS/MS basierter, altersabhängiger pädiatrischer Referenzbereiche

Tabelle 1: Mediane und Konzentrationsbereiche freier Metanephrine im Plasma [pg/mL]

	N	age (range)	NMN (range)	MN (range)	MTY (range)
All subjects	533	8.7y (0.005 - 17.9)	74 (16 - 544)	39 (<4 - 153)	6 (<4 - 132)
girls	265	9.9y ^a (0.005 - 17.9)	64 ^a (16 - 484)	36 ^a (<4 - 147)	6 ^a (<4 - 132)
boys	268	7.2y (0.005 - 17.7)	86 (18 - 544)	42 (<4 - 153)	7 (<4 - 69)
1 to 30 days	29	3d (2 - 17)	255 ^e (102 - 544)	29 ^e (<4 - 82)	28 ^e (<4 - 132)
girls	10	3d (2 - 10)	257 (102 - 484)	29 (<4 - 75)	36 (<4 - 132)
boys	19	3d (2 - 17)	258 (135 - 544)	29 (<4 - 82)	28 (<4 - 69)
1 to < 6 months	22	2.3m (1.2 - 5.9)	217 ^e (96 - 447)	22 ^e (<4 - 153)	16 ^e (<4 - 39)
girls	7	2.5m (1.5 - 3.8)	155 (96 - 447)	28 (13 - 44)	16 (<4 - 25)
boys	15	2.2m (1.2 - 5.9)	252 (116 - 370)	21 (<4 - 153)	16 (<4 - 39)
6 to < 12 months	18	9.9m (6.3 - 11.8)	140 ^e (88 - 290)	43 ^e (23 - 97)	14 ^e (<4 - 27)
girls	6	7.2m (6.6 - 11.5)	186 (110 - 290)	43 (33 - 62)	15 (<4 - 25)
boys	12	10.5m (6.3 - 11.8)	135 (88 - 217)	41 (23 - 97)	14 (<4 - 27)
1 to < 3 years	72	1.9y (1.0 - 2.9)	96 ^e (36 - 261)	43 ^e (<4 - 99)	10 ^e (<4 - 25)
girls	30	2.2y (1.1 - 2.9)	93 (36 - 218)	39 (24 - 85)	10 (5 - 22)
boys	42	1.7y (1.0 - 2.9)	101 (54 - 261)	46 (<4 - 99)	10 (<4 - 25)
3 to < 6 years	58	4.6y (3.1 - 5.9)	72 ^e (31 - 257)	46 ^e (9 - 107)	7 ^e (<4 - 24)
girls	31	4.3y (3.0 - 5.9)	59 ^a (31 - 119)	45 ^e (9 - 107)	7 (<4 - 13)
boys	27	4.6y (3.1 - 5.9)	90 (31 - 257)	55 (26 - 105)	6 (<4 - 24)
6 to < 13 years	171	9.6y (6.0 - 12.9)	66 ^e (24 - 234)	42 ^e (5 - 147)	6 ^e (<4 - 22)
girls	80	9.4y (6.0 - 12.9)	62 (24 - 234)	40 ^d (17 - 147)	6 (<4 - 14)
boys	91	10.0y (6.0 - 12.9)	70 (24 - 169)	47 (5 - 109)	6 (<4 - 22)
13 to < 18 years	163	15.4y (13.1 - 17.9)	59 ^e (16 - 142)	33 ^e (9 - 76)	4 ^e (<4 - 26)
girls	101	15.6y (13.1 - 17.9)	56 ^e (16 - 142)	31 ^b (9 - 76)	4 (<4 - 14)
boys	62	14.9y (13.1 - 17.9)	66 (18 - 138)	36 (12 - 72)	5 (<4 - 26)

^a, ^b, ^c, ^d indicate differences between girls and boys ($P \leq 0.0001$, $P \leq 0.001$, $P \leq 0.01$ and $P < 0.05$, respectively), ^e indicates differences between age groups (tested by nonparametric comparisons for each pair using the Wilcoxon Method; refer to suppl. table 4). Nine and 102 of 533 values of MN and MTY, respectively, were determined below the limit of quantification (4 pg/mL). For MN those belong to age groups 1-30 days ($n = 7$), 1 month to < 6 months ($n = 1$) and 1 year to < 3 years ($n = 1$). For MTY, 4, 3, 4, 2, 5, 25 and 59 values were observed below the limit of quantification in the respective age groups.

Abschlussbericht – Projekt 3/13

Etablierung LC-MS/MS basierter, altersabhängiger pädiatrischer Referenzbereiche

Levels of statistical significance for differences of plasma free NMN concentrations between age-groups*

	1-30d	1-6m	6-12m	1-3y	3-6y	6-13y	13-18y
1-30d							
1-6m	n.s.						
6-12m	<0.0001	0.008					
1-3y	<0.0001	<0.0001	0.0004				
3-6y	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0002			
6-13y	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	n.s.		
13-18y	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0104	0.0305	

Levels of statistical significance for differences of plasma free MN concentrations between age-groups*

	1-30d	1-6m	6-12m	1-3y	3-6y	6-13y	13-18y
1-30d							
1-6m	n.s.						
6-12m	0.0216	0.0009					
1-3y	0.0011	<0.0001	n.s.				
3-6y	0.0009	<0.0001	n.s.	n.s.			
6-13y	0.0009	<0.0001	n.s.	n.s.	n.s.		
13-18y	n.s.	0.0075	0.0083	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

Levels of statistical significance for differences of plasma free MTY concentrations between age-groups*

	1-30d	1-6m	6-12m	1-3y	3-6y	6-13y	13-18y
1-30d							
1-6m	0.0178						
6-12m	0.0045	n.s.					
1-3y	<0.0001	<0.0001	0.0256				
3-6y	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001			
6-13y	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0130		
13-18y	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

Abbildung 1: Statistische Signifikanzniveaus für multiple Vergleiche von Metabolit-Konzentrationen gemessen in unterschiedlichen Altersgruppen der Referenzgruppe (Nichtparametrische Vergleiche für alle Paare nach Wilcoxon)

Diese starke Altersabhängigkeit der Plasmakonzentrationen von NMN, MN und MTY macht deutlich, dass tatsächlich altersangepasste Referenzbereiche, wie im Projekttitel genannt, dringend notwendig sind.

Die Altersabhängigkeit von Referenzbereichen ist in der Literatur häufig durch die Angabe von Referenzbereichen für einzelne Altersgruppen gelöst, welches die Entscheidungsfindung hinsichtlich einer entsprechenden Diagnose im Grenzbereich zwischen zwei Altersgruppen und bei Vorliegen grenzwertiger biochemischer Analysedaten erschweren kann. Aus diesem Grund wurde hier die Erstellung kontinuierlicher, altersabhängiger Referenzbereiche nach der

Methode von Royston und Wright (10) durchgeführt, welche die biostatistische Modellierung jeweiliger Perzentilen aus Datenverteilungen zulässt. Aufgrund der Komplexität dieser Modellierungen soll in diesem Bericht nur das Ergebnis der Erstellung der Referenzbereiche gezeigt werden. Bei weiterem Interesse an der Methodik ist auf die o.g. Publikation von Royston und Wright verwiesen worden, sowie auf eine derzeit in Vorbereitung befindliche Publikation unsererseits (11). Für die laborchemische Diagnostik katecholaminproduzierender Tumore ist die obere Grenze des Referenzbereichs entscheidend. Bei nicht-normalverteilten Daten werden üblicherweise die 97.5 Perzentilen der Datenverteilungen verwendet. Die folgenden 3 Gleichungen stellen die Berechnungsgrundlage der altersangepassten oberen Referenzbereiche für NMN, MN und MTY dar (Abbildung 2), wobei x das Alter in Jahren bezeichnet:

$$\text{NMN: } q_{97.5}^{\text{NMN}} = 354.3 \cdot e^{-1.23 \cdot x} + 161.8 \cdot e^{-0.0119 \cdot x}$$

$$\text{MN: } q_{97.5}^{\text{MN}} = 0.033 \cdot x^3 - 1.193 \cdot x^2 + 10.07 \cdot x + 77.93$$

$$\text{MTY: } q_{97.5}^{\text{MTY}} = 62.83 \cdot e^{-1.319 \cdot x} + 17.47 \cdot e^{-0.01801 \cdot x}$$

2.2 Bewertung der Leistungsfähigkeit der erstellten Referenzbereiche

Wie oben erwähnt, wurde die diagnostische Leistungsfähigkeit der ermittelten Referenzbereiche durch den Vergleich mit Plasmakonzentrationen von NMN, MN und MTY überprüft. In Plasma-Proben von 42, 14 und 52 von insgesamt 54 Neuroblastompatienten zeigten sich Konzentrationen der jeweiligen Parameter oberhalb der altersentsprechenden Referenzbereichsgrenzen (Abbildung 2) und damit diagnostische Sensitivitäten von 77,7%, 26,1% und 96,3%. Bei Kombination der Testbiomarker NMN und MTY konnte sogar bei 53 von 54 Patienten eine Erhöhung oberhalb der Referenzbereichsgrenze für wenigstens eine der beiden Markersubstanzen festgestellt werden und somit eine diagnostische Sensitivität von 98,1% erreicht werden.

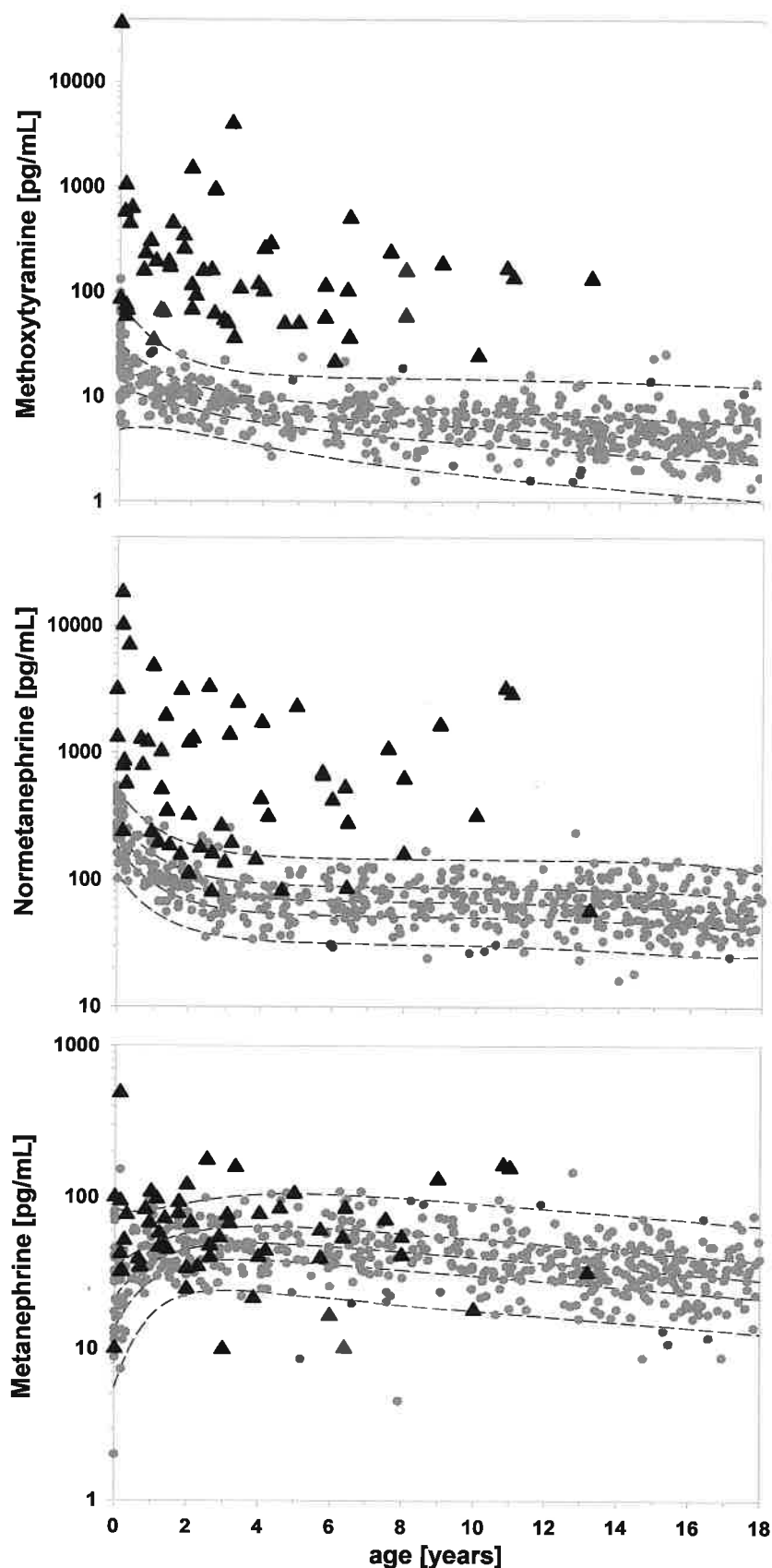


Abbildung 2: Konzentrationen von MTY, NMN und MN in der Referenzgruppe (graue, gefüllte Kreise) sowie in Patienten mit Neuroblastom (schwarz gefüllte Dreiecke); gestrichelte Linien stellen die 2,5, 25, 50, 75 und 97,5 Perzentilen dar.

Die o.g. Patientin mit Ganglioneurom, eine sogenannte „ausgereifte“, meist benigne Form eines Tumors des sympathischen Nervensystems, zeigte im Vergleich mit den entsprechenden

Referenzbereichen keine Erhöhung von NMN, MTY und MN an. Hierbei ist allerdings anzumerken, dass nur ca. 40% der Ganglioneurome tatsächlich Katecholamine produzieren (12). Für den Patienten mit Phäochromozytom konnten mit Konzentrationen von 5138 pg NMN/mL (RI < 137.2 pg/mL), 28 pg MN/mL (RI < 77 pg/mL) und 58 pg MTY/mL (RI < 13.6 pg/mL) deutliche Erhöhungen oberhalb der Referenzbereichsgrenzen nachgewiesen werden.

2.3 Vergleich der diagnostischen Leistungsfähigkeit freier Metanephrine im Plasma vs. VMS und HVS im Urin

Die Leistungsfähigkeit eines diagnostischen Tests lässt sich weiterhin anhand von „Receiver Operating Characteristic (ROC)“-Kurven bestimmen, welche grundsätzlich die Beziehung zwischen Sensitivität und Spezifität eines diagnostischen Tests beschreiben.

Für MTY, NMN und MN wurden dabei „Flächen unterhalb der Kurve“ (*area under curve*, AUC) von jeweils 0.998, 0.951 und 0.747 im Vergleich zur o.g. Patientengruppe mit initialem Verdacht auf Vorliegen eines Neuroblastoms aber ausgeschlossener Erkrankung (n=31) bestimmt. In diese Patientengruppe wurden u.a. sechs Patienten mit Neuroblastomen und 10 Patienten mit Symptomen einer Katecholaminüberproduktion, wie Hypertonie, Herzrasen, Kopfschmerz und Hitzewallungen sowie weitere 15 Patienten mit anderen Tumorerkrankungen eingeschlossen.

Im Gegensatz dazu wurden für die üblicherweise verwendeten Biomarker VMS und HVS AUC's von 0.933 und 0.921 bestimmt, welche hauptsächlich durch eine verminderte Sensitivität von 73.7% (28/38) und 86.8% (33/38) gegenüber NMN (77.7%, 42/54) und MTY (96.3%, 52/54) charakterisiert waren.

Bei Verwendung der jeweiligen Biomarker-Paare NMN/MTY und VMS/HVS bei der ROC-Kurvenanalyse wurde für NMN/MTY eine bessere diagnostische Leistungsfähigkeit bestimmt (0.998 vs. 0.947, $P = 0.024$, Abbildung 3). Sensitivität und Spezifität wurden jeweils mit 98.1% (53/54) gegenüber 89.5% (34/38) sowie 96.8% (30/31) gegenüber 91.3% (21/23) bestimmt. Da in der ROC-Kurvenanalyse die Altersabhängigkeit der Referenzbereiche nicht einbezogen wird, wurden die Daten für diese Analyse zusätzlich nach Normalisierung als Vielfache der oberen Referenzbereichsgrenzen verwendet. Auch hier zeigte sich eine

diagnostische Überlegenheit von NMN und MTY gegenüber VMS und HVS mit AUCs von 1.000 und 0.929 ($P = 0.031$, Abbildung 3).

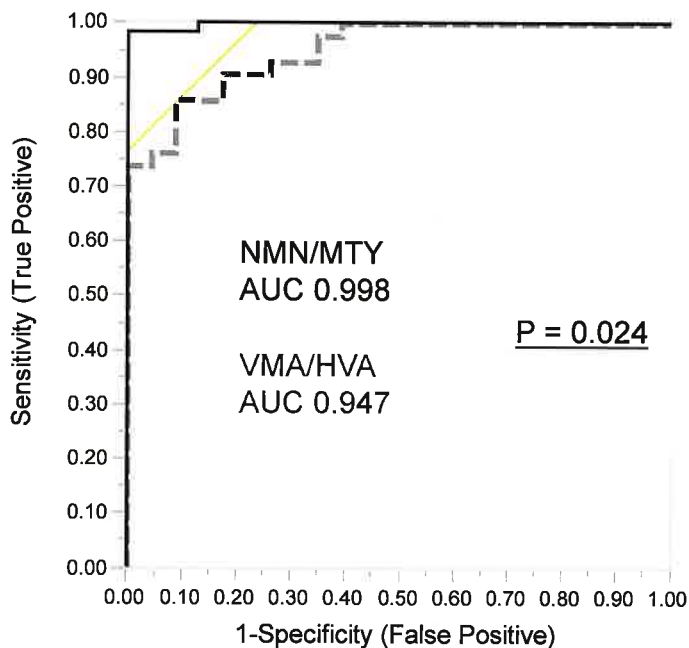
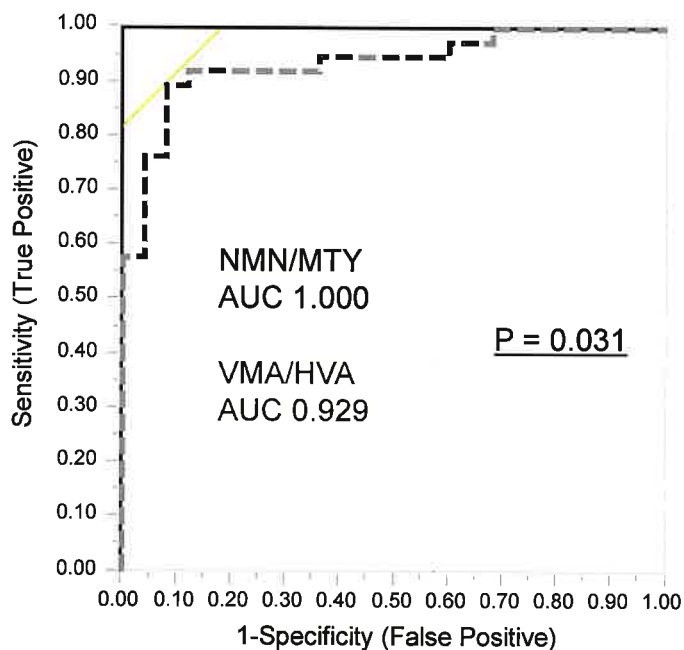


Abbildung 3: ROC-Kurven für NMN und MTY im Plasma (schwarz) und VMS und HVS im Urin (grau gestrichelt), oben: unter Verwendung tatsächlich analysierter Konzentrationen, unten: nach Normalisierung der analysierten Konzentrationen als Vielfache der entsprechenden Referenzbereichsgrenzen



3. Schlussfolgerungen und Ausblick

Die beobachtete starke Altersabhängigkeit der Plasmakonzentrationen von NMN, MN und MTY in der Referenzpopulation mit relativ hohen Konzentrationen von NMN und MTY bei Neugeborenen im Gegensatz zu relativ niedrigeren MN-Konzentrationen in dieser

Abschlussbericht – Projekt 3/13

Etablierung LC-MS/MS basierter, altersabhängiger pädiatrischer Referenzbereiche

Altersgruppe und der mit zunehmenden Alter erfolgten Normalisierung machen die Notwendigkeit altersabhängiger Referenzbereiche für diese biochemischen Tumormarker deutlich.

Nach erfolgreicher Erstellung altersangepasster, kontinuierlicher pädiatrischer Referenzbereiche für NMN, MN und MTY im Plasma und deren Anwendung zur laborchemischen Diagnostik von Neuroblastomen erscheinen vor allem MTY und NMN den üblicherweise verwendeten Katecholaminstoffwechselprodukten VMS und HVS im Urin sowohl in Sensitivität und Spezifität überlegen.

Mit der Verfügbarkeit dieser Referenzbereiche, eine Voraussetzung für eine adäquate Interpretation labordiagnostischer Analysen, ist es nun möglich, das in den letzten Jahrzehnten erlangte verbesserte Verständnis hinsichtlich des Katecholaminstoffwechsels als auch den Fortschritt laborchemischer Messtechnik in der Diagnostik pädiatrischer Neuroblastome einzusetzen, wie es seit langem für katecholaminproduzierende Tumore bei Erwachsenen möglich ist.

Der erfolgreiche Abschluss dieses Projektes liefert nun die Grundlage für zukünftig folgende prospektive Studien zur Identifizierung der bestmöglichen Biomarker zur Neuroblastomdiagnostik und Therapiekontrolle.

Anmerkung: Im Ergebnisbericht wurden ausschließlich die Blut-Plasma-Konzentrationen von NMN, MN und MTY bedacht. Neben diesen wurden die Konzentrationen dieser Katecholaminmetabolite ebenfalls im Spontan-Urin bestimmt mit ähnlichen Abhängigkeiten hinsichtlich des Alters. Diese werden in o.g. zukünftigen Studien ebenfalls zum Einsatz kommen.

Referenzen:

1. Maris JM. Medical Progress: Recent Advances in Neuroblastoma. *New England Journal of Medicine* 2010;362:2202-11.
2. Lenders JWM, Pacak K, Walther MM, Linehan WM, Mannelli M, Friberg P et al. Biochemical diagnosis of pheochromocytoma - Which test is best? *Jama-Journal of the American Medical Association* 2002;287:1427-34.
3. Labrosse EH, Com-Nougué C, Zucker JM, Comoy E, Bohuon C, Lemerle J, Schweisguth O. Urinary excretion of 3-Methoxy-4-hydroxymandelic acid and 3-Methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid by 288 patients with neuroblastoma and related neural crest tumors. *Cancer Research* 1980;40:1995-2001.
4. Schilling FH, Spix C, Berthold F, Erttmann R, Klein G, Sanders J, Treuner J. Neuroblastoma screening at one year of age in Germany. A cancer screening study with unexpected results. *Monatsschrift Kinderheilkunde* 2002;150:934-+.
5. Smith SJ, Diehl NN, Smith BD, Mohny BG. Urine catecholamine levels as diagnostic markers for neuroblastoma in a defined population: implications for ophthalmic practice. *Eye* 2010;24:1792-6.
6. Barco S, Gennai I, Reggiardo G, Galleni B, Barbagallo L, Maffia A et al. Urinary homovanillic and vanillylmandelic acid in the diagnosis of neuroblastoma: Report from the Italian Cooperative Group for Neuroblastoma. *Clinical Biochemistry* 2014;47:848-52.
7. Peitzsch M, Prejbisz A, Kroiss M, Beuschlein F, Arlt W, Januszewicz A et al. Analysis of plasma 3-methoxytyramine, normetanephrine and metanephrine by ultra performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry: utility for diagnosis of dopamine-producing metastatic phaeochromocytoma. *Annals of Clinical Biochemistry* 2013;50:147-55.
8. Peitzsch M, Adaway J, Eisenhofer G. Interference from 3-O-Methyldopa with Ultra-High Performance LC-MS/MS Measurements of Plasma Metanephrines: Chromatographic Separation Remains Important. *Clin Chem* 2015;61:993-6.
9. Eisenhofer G, Lattke P, Herberg M, Siegert G, Qin N, Darr R et al. Reference intervals for plasma free metanephrines with an age adjustment for normetanephrine for optimized laboratory testing of phaeochromocytoma. *Ann Clin Biochem* 2013;50:62-9.
10. Royston P, Wright EM. A method for estimating age-specific reference intervals ('normal ranges') based on fractional polynomials and exponential transformation. *Journal of the Royal Statistical Society Series A-Statistics in Society* 1998;161:79-101.
11. Peitzsch M, Pyper A, Mangelis A, Butch E, Lovorn E, Furman W, Santana VM, Hero B, Berthold F, Eisenhofer G, Huebner A. Diagnosis of neuroblastoma using plasma free 3-methoxytyramine and normetanephrine. in preparation 2017.
12. Georger B., Hero B, Harms D., Grebe J., Scheidhauer K., Berthold F. Metabolic activity and clinical features of primary ganglioneuromas. *Cancer* 2001;91:1905-13.