

Aus der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. U. Göbel

**Prognosefaktoren bei Kindern und Jugendlichen mit ALL:  
Myeloische Antigenexpression und klinisch-chemische  
Untersuchungen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
vorgelegt von

Lars Hoof

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. U. Göbel

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. U. Germing

Meinen Eltern

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis	VIII
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Fragestellung .....	6
<b>2 Patienten und Methoden</b>	<b>7</b>
2.1 Patienten .....	7
2.2 Zytostatische Therapie .....	7
2.3 Klinische und hämatologische Basisdiagnostik .....	8
2.3.1 Zytomorphologie .....	9
2.4 Durchflusszytometrie und Immunphäotypisierung .....	9
2.4.1 Untersuchungsmaterial .....	10
2.4.2 Probenaufbereitung .....	10
2.4.3 Markierung membranständiger Antigene .....	11
2.4.4 Zytoplasmatische Färbungen .....	11
2.4.5 Durchflusszytometrie .....	13
2.4.6 Klassifikation .....	13
2.4.6.1 B-Vorläuferzell-ALL .....	13
2.4.6.2 T-Zell-ALL .....	14
2.4.6.3 Koexpression myeloischer Antigene .....	14
2.5 Statistische Methoden .....	16
2.5.1 Methodisches Vorgehen und Patientengruppierung .....	17
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>18</b>
3.1 Patientencharakteristik .....	18
3.2 Immunphäotypisierung .....	21
3.2.1 Immunologische Klassifikation nach Subtyp .....	21
3.2.2 Koexpression myeloischer Antigene .....	21
3.2.3 Klinische Bedeutung des immunologischen Subtyps .....	22
3.2.4 Klinische Bedeutung der Koexpression myeloischer Differenzierungsantigene .....	25
3.2.5 Koexpression in Abhängigkeit von Prognosefaktoren .....	27
3.2.6 Korrelationen hämatologischer und klinisch-chemischer Laborparameter .....	27
3.3 Therapieergebnisse .....	29
3.3.1 Untersuchungskollektiv .....	29
3.3.2 Prognostische Bedeutung der Koexpression myeloischer Antigene .....	31
3.3.3 Prognostische Bedeutung des immunologischen Subtyps .....	35
3.3.4 Prognostische Bedeutung weiterer klinischer und labordiagnostischer Parameter .....	37

3.3.5 Säuglinge.....	43
<b>4 Diskussion</b>	<b>44</b>
4.1 Koexpression myeloischer Antigene .....	44
4.2 Immunologischer Subtyp .....	47
4.3 Laktatdehydrogenase .....	49
<b>5 Literaturverzeichnis</b>	<b>52</b>

---

## Abkürzungsverzeichnis

ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
CD	Cluster of Differentiation
COALL	Multizentrische Therapiestudie zur Behandlung von Kindern mit ALL
CR	komplette Remission (Complete Remission)
cy	zytoplasmatisch
DOC	Dead of Complication
DOD	Dead of Disease
EGIL	European Group for the immunological characterization of leukemias
pEFS	Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überleben
FAB	French-American-British
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HLA	Human Leukocyte Antigen
HR	High Risk
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LDH	Laktatdehydrogenase
LFU	Lost to follow-up
LR	Low Risk
m	männlich
n.s.	nicht signifikant
PE	R-Phycoerythrin
PR	Partial Remission
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a-Protein
REZ	Rezidiv
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SE	Standardfehler (standard error)
TdT	Terminale Desoxyribonucleotidyl-Transferase
t	Translokation
w	weiblich

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Anerkannte Prognosefaktoren bei ALL .....	4
Tabelle 2-1: Initiale Risikostratifizierung nach dem COALL-06-97 Therapieprotokoll....	8
Tabelle 2-2: Wichtige Zytostatika der ALL-Therapie .....	8
Tabelle 2-3: Im Rahmen der initialen Leukämietypisierung aktuell verwendetes ..... Färbeprotokoll unter Berücksichtigung der Fluoreszenzfarbstoffe R-Phycoerythrin (PE), Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Peridin-Chlorophyll-a-Protein (PerCP)	12
Tabelle 2-4: Immunologische Klassifikation der Leukämien vom B-Zelltyp .....	14
Tabelle 2-5: Immunologische Klassifikation der Leukämien vom T-Zelltyp .....	14
Tabelle 2-6: Kategorisierung intervallskalierter Parameter in einen niedrigen,..... mittleren und höheren Bereich	17
Tabelle 3-1: Patientencharakteristika des Untersuchungskollektivs ..... (>12 Monate, n=115) zum Zeitpunkt der Erstpräsentation	20
Tabelle 3-2: Häufigkeiten der immunologischen Subtypen.....	21
Tabelle 3-3: Leukämie-Subtyp und Koexpression myeloischer Antigene .....	22
Tabelle 3-4: Vergleich der Subtypen bezogen auf hämatologische und ..... klinisch-chemische Laborparameter	23
Tabelle 3-5: Klinische Relevanz des immunologischen Subtyps.....	24
Tabelle 3-6: Vergleich von My+ ALL und My- ALL bezogen auf hämatologische ..... und klinisch-chemische Parameter zum Zeitpunkt der Diagnose	25
Tabelle 3-7: Klinische Relevanz der myeloischen Koexpression.....	26
Tabelle 3-8: Koexpression myeloischer Antigene in Abhängigkeit von ..... anerkannten Prognosefaktoren	27
Tabelle 3-9: Prognostische Bedeutung biologischer, hämatologischer und ..... klinisch-chemischer Parameter	40
Tabelle 3-10: Patientencharakteristika in Abhängigkeit zum initialen LDH-Wert ..... bei Niedrigrisikopatienten (Low Risk, n=58)	41
Tabelle 3-11: Patientencharakteristika in Abhängigkeit zum initialen LDH-Wert ..... bei Hochrisikopatienten (High Risk, n=55)	42

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der normalen B-Zell-Reifung . . . . .	3
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung der normalen T-Zell-Reifung . . . . .	3
Abbildung 2-1: Zuordnung verschiedener linienspezifischer Antigene . . . . . innerhalb der Hierarchie der Hämatopoese	15
Abbildung 3-1: Altersverteilung des Untersuchungskollektivs >12 Monate (n=115) . .	18
Abbildung 3-2: Streudiagramme . . . . .	28
Abbildung 3-3: Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS) bei 115 . . Patienten mit ALL	30
Abbildung 3-4: Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens in Abhängigkeit . . von der Koexpression myeloischer Antigene	32
Abbildung 3-5: Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens in Abhängigkeit . . von der Koexpression myeloischer Antigene bei Niedrigrisiko- (A) und Hochrisikopatienten (B)	33
Abbildung 3-6: Bedeutung der Expression von CD15 im Vergleich zur . . . . . Patientengruppe ohne Koexpression myeloischer Antigene	34
Abbildung 3-7: Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS) . . . . . in Abhängigkeit vom immunononologischen Subtyp	35
Abbildung 3-8: Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens in . . . . . Abhängigkeit vom Subtyp innerhalb der Risikozweige	36
Abbildung 3-9: Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit vom initialen . . . . . LDH-Wert nach Risikogruppen stratifiziert	39
Abbildung 3-10: Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens der . . . . . Patienten im ersten Lebensjahr (n=11) im Vergleich zu älteren Patienten (n=115)	43

# 1 Einleitung

Bösartige Erkrankungen im Kindesalter sind insgesamt selten. In Deutschland betrug die Inzidenz 13,9/100.000 Kinder (<15 Jahre) pro Jahr im Zeitraum zwischen 1992 und 2001. Leukämien werden mit 30-40% am häufigsten diagnostiziert (Kaatsch und Spix 2002; Creutzig et al. 2003). Von diesen stellen akute lymphoblastische Leukämien mit 75% die häufigste Form dar, 15% sind akute myeloische Leukämien. Die übrigen entfallen auf akute Hybridleukämien, akute undifferenzierte und chronisch myeloische Leukämien (Göbel 2003).

Ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Leukämien wird bei Chromosomenanomalien wie der Trisomie 21 (Avet-Loiseau et al. 1995), Ataxia teleangiectatica (Taylor et al. 1996), Bloom-Syndrom (Passarge 1991) oder der Fanconi-Anämie (Pui und Evans 1998) beobachtet.

Leukämien entstehen durch unkontrollierte Proliferation wenig differenzierter lymphatischer oder myeloischer Vorläuferzellen, die durch die maligne Transformation einem Differenzierungs- bzw. Ausreifungsstopp unterlegen sind (Greaves 1986). Die maligne Transformation von Zellen unterschiedlicher Differenzierungsreihen und Differenzierungsstufen führt zu unterschiedlichen Formen der Leukämie, die sich in ihrem biologischen und klinischen Erscheinungsbild deutlich voneinander unterscheiden (Pui et al. 1990b; Pui 1995).

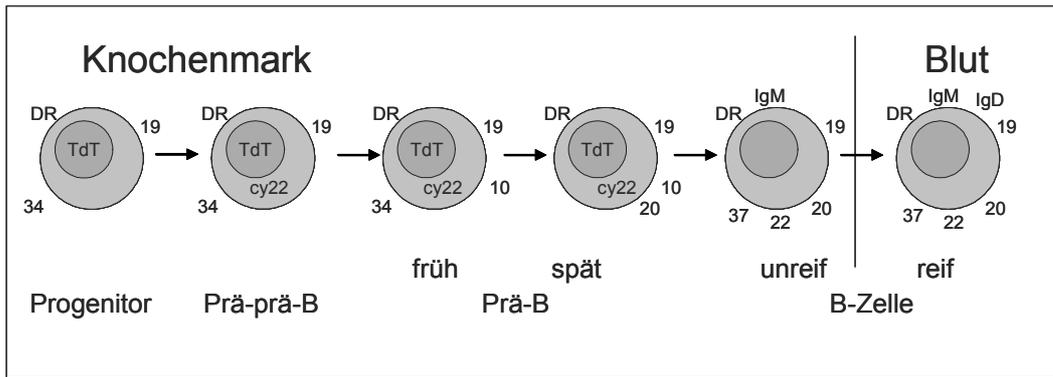
Die Prognose der ALL hat sich in den vergangenen Jahrzehnten durch den kooperativen Einsatz intensiver risikoadaptierter Kombinationschemotherapieprotokolle entscheidend verändert. In den 50er Jahren war die Prognose der ALL noch infaust. Die Patienten überlebten im Mittel lediglich wenige Monate die Diagnosestellung. Durch die Einführung der intensiven Kombinationschemotherapien können heute bei Patienten mit ALL Heilungsraten von 80% und von 50% bei AML erzielt werden (Creutzig et al. 2003).

Die Diagnostik und Klassifikation erfolgt heute mehrstufig und umfasst die Beurteilung der Zytochemie und Zytomorphologie von Knochenmarkausstrichen, die Immunphänotypisierung und zyto- bzw. molekulargenetische Untersuchungen. Der zytomorphologischen Untersuchung und Klassifikation nach den FAB-Kriterien (Bennett et al. 1976), die für die weitere Differenzierung der akuten myeloischen Leukämien erforderlich ist, sind bei der Subklassifikation der lymphatischen Leukämie Grenzen gesetzt. Hier nimmt die Immunphänotypisierung einen zentralen Stellenwert ein (Ludwig et al. 1994b).

Die immunologische Diagnostik akuter Leukämien beschränkte sich Anfang der siebziger Jahre auf den Nachweis von Immunglobulin auf der Zelloberfläche der leukämischen Blasten mittels Antisera und der Untersuchung der Rosettenbildung mit Schaferythrozyten (Sen und Borella 1975). Das 1975 erstmals beschriebene Verfahren zur Herstellung großer Mengen monoklonaler Antikörper mit einer bestimmten Spezifität gegen ein bestimmtes Antigen (Köhler und Milstein 1975), eröffnete erstmals die Möglichkeit, verschiedene zelluläre Antigene auf leukämischen Blasten hochspezifisch nachzuweisen und offenbarte eine deutlich größere Heterogenität der maligne veränderten Zellen, als mit den bis dahin zur Verfügung stehenden zytomorphologischen Färbungen anzunehmen war. Die monoklonalen Antikörper wurden in internationalen Konferenzen anhand deren Bindungseigenschaften charakterisiert und in Gruppen eingeteilt (Clusterdesigna-tion), in denen alle, das gleiche Antigen erkennende Antikörper zusammengefasst werden (Schmidt 1994). Es konnte gezeigt werden, dass die Subtypen der ALL weitgehend den Phänotyp normaler lymphatischer Vorläuferzellen unterschiedlicher Differenzierungsstufen widerspiegeln (Greaves 1986). Anhand von Untersuchungen an leukämischen Blasten und normalen Leukozyten konnten verschiedene Antigenprofile oberflächlicher und zytoplasmatischer Antigene nachgewiesen und unterschiedlichen Reifungsstufen der normalen Lymphozytenentwicklung zugeordnet werden (Foon und Todd 1986; LeBien und Villablanca 1990).

Zur Verdeutlichung der spezifischen Veränderungen in der Zelle und auf der Zellmembran während des Reifungsprozesses pluripotenter Stammzellen soll der folgende Exkurs beitragen.

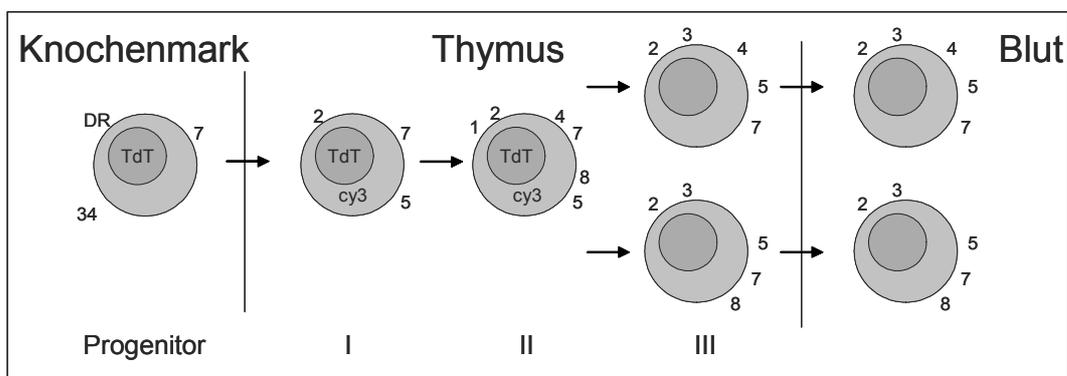
Während der normalen B-Zellentwicklung (Abbildung 1-1) im Knochenmark erscheinen und verschwinden, abhängig vom Reifungsgrad der Zellen, charakteristische Antigene im Zytoplasma und auf der Oberfläche der Zellen. Auf CD34 und HLA-DR positiven Vorläuferzellen erscheint als erstes und bis zur ausgereiften Plasmazelle immer auf der Oberfläche vorhandene Antigen CD19. Im Zytoplasma dieser, als Prä-prä-B-Zelle bezeichneten Reifungsstufe lässt sich intrazytoplasmatisch das, für B-Zellen ebenfalls spezifische Antigen CD22 nachweisen. Auf der nächsten, als Prä-B-Zelle bezeichneten Reifungsstufe, wird als nächster Marker CD10, das so genannte common-ALL-Antigen, exprimiert. Prä-B-Zellen lassen sich durch den zytoplasmatischen Nachweis der schweren Kette des Immunglobulin IgM weiter in eine frühe und späte Form unterteilen.



**Abbildung 1-1:** Schematische Darstellung der normalen B-Zell-Reifung (Hanenberg et al. 1994).

Auf späten, zytoplasmatisch  $\mu$ -positiven Prä-B-Zellen lässt sich dann oberflächlich zusätzlich CD20 nachweisen. Die nächste als unreife B-Zelle bezeichnete Differenzierungsstufe exprimiert dann oberflächlich IgM und zusätzlich die Antigene CD22 und CD37. Die reife B-Zelle exprimiert zusätzlich IgD und erscheint im peripheren Blut.

T-Zellen (Abbildung 1-2) entstehen im Knochenmark aus multipotenten HLA-DR und CD34 positiven Stammzellen, bei denen als erstes Zeichen einer lymphatischen Differenzierung das Enzym Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase (TdT) nachweisbar ist. Auf T-Vorläuferzellen im Knochenmark wird CD7 als erstes T-Zell-assoziiertes Antigen auf der Oberfläche exprimiert. Im Thymus, in dem die weitere Ausdifferenzierung stattfindet, tragen die Zellen zusätzlich CD2 und CD5, als so genannte Pan-T-Antigene bezeichnete und bis zur vollständigen Ausreifung auf der Oberfläche vorhandene Antigene.



**Abbildung 1-2:** Schematische Darstellung der normalen T-Zell-Reifung (Hanenberg et al. 1994).

Im Zytoplasma lässt sich auf derselben Reifungsstufe das für T-Zellen spezifische Antigen CD3 nachweisen. Auf der nächsten Entwicklungsstufe exprimieren die Zellen das Antigen CD1a, welches nur auf Zellen im Thymus nachweisbar ist und zusätzlich CD4 und CD8. Auf der folgenden Entwicklungsstufe verlieren die Zellen CD1a wieder und werden nun entweder CD4- (T-Helferzelle) oder CD8-positiv (T-Suppressorzelle). Der T-Zellrezeptor (TCR) und CD3 sind nun ebenfalls auf der Oberfläche der Zellen nachweisbar.

Nicht immer entspricht der immunologische Phänotyp der Leukämiezellen dem normaler Reifungsstadien. So hat der Einsatz weiterer monoklonaler Antikörper zur immunologischen Charakterisierung der Leukämien eine gleichzeitige Expression myeloischer Antigene auf lymphatischen Blasten und umgekehrt gezeigt (Ludwig et al. 1988; Ludwig et al. 1994b). Die Koexpression myeloischer Differenzierungsantigene auf ansonsten typischen Lymphoblasten wird seit Anfang der 80er Jahre beobachtet (Smith et al. 1983; Mirro et al. 1985). Bei erwachsenen Patienten mit ALL konnte eine Assoziation zwischen Koexpression myeloischer Antigene und ungünstigen Therapieergebnissen gezeigt werden (Sobol et al. 1987; Guyotat et al. 1990). Diese Eigenschaft der Lymphoblasten hat das Interesse zu weiteren Untersuchungen angeregt, da der Koexpression myeloischer Antigene möglicherweise ein biologisch abweichendes Verhalten zugrunde liegt. In einigen früheren Untersuchungen war die Koexpression myeloischer Antigene mit ungünstigen Therapieergebnissen assoziiert (Cantu-Rajoldi et al. 1991; Kurec et al. 1991; Wiersma et al. 1991; Fink et al. 1993). Andere Untersuchungen hingegen konnten dies nicht bestätigen (Pui et al. 1990a; Drexler et al. 1991; Uckun et al. 1997; Putti et al. 1998).

Für die risikoadaptierte Therapie der ALL werden einige allgemein anerkannte Risikokriterien herangezogen, die das Alter der Patienten, die initiale Leukozytenzahl, den immunologischen Subtyp und Chromosomenaberrationen einschließen (Janka-Schaub et al. 1999). Entsprechend dieser Risikostratifizierung erfolgt die Behandlung der Patienten nach dem jeweils gültigen Therapieprotokoll.

**Tabelle 1-1: Anerkannte Prognosefaktoren bei ALL (Janka-Schaub et al. 1999)**

Prognosefaktor	Niedriges Risiko	Hohes Risiko
Alter bei Diagnose (Jahre)	1 - 9	≥ 10
Immunologischer Subtyp	C-ALL o. Prä-B-ALL	Prä-prä-B-ALL o. T-ALL
Initiale Leukozytenzahl (n/μl)	< 25.000	≥ 25.000

Bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom haben sich hohe Werte der initial gemessenen Aktivität der Laktatdehydrogenase als prognostisch ungünstig erwiesen (Aul et al. 1992). Berichten zufolge konnte dies auch bei Erwachsenen (Fanin et al. 1989) und Kindern (Pui et al. 1985) mit ALL gezeigt werden. Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, neben anderen hämatologischen und klinisch-chemischen Laborparametern, insbesondere die Bedeutung der Koexpression von myeloischen Markern und der Höhe des initial gemessenen LDH-Wertes für die Prognose der Patienten zu untersuchen, die mit den COALL-Protokollen der Gesellschaft für pädiatrische Onkologie und Hämatologie in Düsseldorf behandelt worden sind.

## 1.1 Fragestellung

Wesentliche Untersuchungsziele der vorliegenden Arbeit sind:

- Die Untersuchung der Koexpression myeloischer Antigene auf lymphatischen Blasten im Hinblick auf deren klinische und prognostische Bedeutung
- Die Untersuchung der klinischen und prognostischen Bedeutung des immunologischen Subtyps
- Die Untersuchung der prognostischen Bedeutung weiterer klinischer und diagnostischer Parameter, die initial erhoben wurden

Um diese Fragen so weit wie möglich bearbeiten zu können, wurden folgende Daten zum Zeitpunkt der Erstpräsentation erfasst:

Patientenbezogene Parameter:

- Geschlecht
- Alter bei Diagnose

Therapiebezogene Daten:

- Therapieprotokoll
- Initiale Risikostratifizierung (Low Risk / High Risk)
- Überlebenszeiten und Ereignisse

Immunphänotypisierung:

- Immunologischer Subtyp
- Koexpression myeloischer Antigene (CD11b, CD13, CD15, CD33)

Klinisch körperliche Untersuchungsbefunde:

- Hautblutung (Petechien / Hämatome)
- Leber- und Milzgröße (in cm unter dem Rippenbogen)
- oberflächlich tastbare Lymphknoten

Hämatologische und klinisch-chemische Laborparameter:

- Hämoglobin
- Leukozytenzahl
- Thrombozytenzahl
- Harnsäure
- LDH

Bildgebende Diagnostik:

- Röntgenthorax
- Abdomensonografie
- computertomographische Befunde

Liquordiagnostik

- ZNS-Befall

Zyto-/Molekulargenetik

## **2 Patienten und Methoden**

### **2.1 Patienten**

Im Zeitraum zwischen dem 01.01.1990 und dem 31.12.1997 wurden an der Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie der Heinrich-Heine-Universität insgesamt 169 Patienten mit Akuter Leukämie initial diagnostiziert und anschließend behandelt. Von diesen waren 134 ALL (79,2 %) und 35 (20,8%) AML. Die vorliegende Untersuchung bezieht sich auf ein Patientenkollektiv von insgesamt 126 Patienten mit ALL, von denen ein vollständiger Befund der initialen Immunphänotypisierung vorlag. Von der Untersuchung wurden 6 Patienten mit unvollständigem bzw. anderenorts erstellten immunologischen Befund und 2 Patienten mit reifzelliger B-ALL ausgeschlossen. Die mediane Beobachtungszeit des gesamten Untersuchungskollektivs betrug 6,1 Jahre (0,1 - 11,3 Jahre). Stichtag der letzten Stuserhebung war der 18.06.2002.

### **2.2 Zytostatische Therapie**

Nach Diagnosestellung und Ausschluss von Kontraindikationen wurden alle Patienten zytostatisch therapiert. Die Behandlung der Patienten im ersten Lebensjahr (n=11) erfolgte nach modifizierten Protokollen für B-Zell-Neoplasien (NHL-BFM 90 bzw. NHL-BFM 95). Bei allen anderen Patienten erfolgte die Therapie nach Protokollen der COALL-Studiengruppe, deren Grundlagen von der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie festgelegt wurden (Studienleitung: Frau Prof. Dr. G. Janka-Schaub, Universitäts-Kinderklinik Eppendorf in Hamburg). Entsprechend dem Protokoll COALL-04-89 wurden 23 (20%) Patienten, nach COALL-05-92 wurden 88 (76,5%) und nach COALL-06-97 wurden 4 (3,5%) Patienten des Untersuchungskollektivs behandelt.

Für jeden Patienten erfolgte zunächst eine Stratifizierung in die beiden Risikozweige Low-Risk und High-Risk. Die Stratifizierungsmerkmale sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

**Tabelle 2-1: Initiale Risikostratifizierung nach dem COALL-06-97 Therapieprotokoll**

Parameter	Low Risk (*)	High Risk(**)
Alter bei Diagnose (Jahre)	≥ 1 - <10	≥ 10
Immunologischer Subtyp	C-ALL o. Prä-B-ALL	Prä-prä-B-ALL o. T-ALL
Initiale Leukozytenzahl (n/μl)	< 25.000	≥ 25.000
Remissionsstatus (Tag 29)	komplette Remission (M1-Mark)	keine komplette Remission
Translokation t(9;22) oder t(4;11)	nicht vorhanden	vorhanden

(\*) „Und“-Verknüpfung aller Merkmale

(\*\*) „Oder“-Verknüpfung aller Merkmale

**Tabelle 2-2: Wichtige Zytostatika der ALL-Therapie**

Behandlungsteil	Zytostatika
I. Induktionstherapie	Prednison, Vincristin (VCR), Daunorubicin (DNR), Asparaginase (L-ASP), Methotrexat (MTX), Cyclophosphamid (CPM), Cytarabin (ARA-C), 6-Mercaptopurin (MP), VM26
II. Konsolidierungstherapie	MP, MTX
III. Reinduktionstherapie	Dexamethason (DEXA), L-ASP, Doxorubicin (DOX), VCR, ARA-C, CPM, Thioguanin (TG)
IV. Erhaltungstherapie	MP (oder TG), MTX

### 2.3 Klinische und hämatologische Basisdiagnostik

Alle Patienten wurden zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme körperlich untersucht. Als leukämieassoziierte Merkmale wurden periphere Blutungszeichen im Sinne von Petechien oder Hämatomen, Leber- und Milzvergrößerung und oberflächliche Lymphknotenvergrößerung dokumentiert.

Aus den Ergebnissen der labordiagnostischen Routineuntersuchungen wurden aus dem initialen Blutbild die Werte für die Hämoglobinkonzentration, die Leukozytenzahl und die Thrombozytenzahl ausgewertet. Aus der quantitativen Serumanalyse wurde speziell die Aktivität der LDH und die Harnsäurekonzentration ausgewertet.

Um eine Aussage über extramedulläre Manifestationsorte der Erkrankung machen zu können, wurden bei den Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme Röntgenaufnahmen des Thorax und Computertomogramme des Schädels angefertigt. Der Befund der sonografischen Untersuchung des Abdomens sollte über die Organgrößen von Leber und Milz, die Infiltration abdomineller Organe und über abdominelle Lymphome Aufschluss geben. Über das Vorliegen einer Meningeosis leucämica wurde mittels Lumbalpunktion und anschließender zytologischer Untersuchung des Liquors entschieden. Ein ZNS Befall lag vor, bei mehr als 5 Zellen/ $\mu\text{l}$  nach unblutiger Lumbalpunktion.

### **2.3.1 Zytomorphologie**

Die Diagnose Akute Leukämie wurde primär durch zytomorphologische Differenzierungen aus Knochenmarksaspiraten in Verbindung mit dem Blutbild gestellt. Blut- und Knochenmarkausstriche wurden nach Standardmethoden gefärbt. Zur Beurteilung der Einzelzellmorphologie lagen panoptische Färbungen nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) vor. Die Sicherung der Diagnose und die Abgrenzung der verschiedenen ALL-Subtypen erfolgte mittels durchflusszytometrischer Immunphänotypisierung.

## **2.4 Durchflusszytometrie und Immunphänotypisierung**

Zur Immunphänotypisierung wurde ein Durchflusszytometer eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein opto-elektronisches Messsystem, welches optische Signale, wie Lichtstreuung und Fluoreszenzsignale von Partikeln, z.B. einzelnen Zellen, detektiert. Es ermöglicht eine schnelle Analyse größerer Zellzahlen in einer Zellsuspension.

Als Lichtquelle wird im allgemeinen eine Quecksilberdampfampe oder ein Laser verwendet. Durch Überdruck wird die Zellsuspension in die Messkammer, die so genannte Durchflusszelle (Flow-Cell), transportiert. Dort werden die Zellen durch hydrodynamische Fokussierung mittels einer Mantelflüssigkeit zu einer "perlschnurartigen" Kette formiert. Auf diese Weise werden die Zellen zentral durch eine Kapillare geführt, in der sie an einer definierten Stelle senkrecht vom Laserstrahl getroffen werden (Messpunkt). Tritt eine Zelle in den Laserstrahl ein, streut sie das Laserlicht, sowohl nach vorn ( $35^\circ$ , FSC, Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht) als auch zur Seite ( $90^\circ$ , SSC, Side Scatter, Seitwärtsstreulicht). Das am Messpunkt resultierende Streulicht sowie die Fluoreszenzsignale werden von einem opto-elektronischen Detektionssystem aufgenommen. Es besteht aus einer optischen Filterbank und mehreren parallel geschalteten Photomultiplier Tubes (PMT, Lichtverstärkerröhren). Diese PMTs detektieren das von den Zellen

gestreute oder von Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht unterschiedlicher Wellenlängen, wandeln es in elektrische Signale um und verstärken es über eine Elektronenkaskade (Dynodenprinzip). Die elektrischen Signale werden digitalisiert, vom Computer erfaßt und grafisch dargestellt.

#### **2.4.1 Untersuchungsmaterial**

Das Untersuchungsmaterial für die immunologische Diagnostik bestand aus antikoaguliertem Vollblut (EDTA) oder heparinisiertem Knochenmark, das durch Beckenkamm-punktion entnommen wurde. Die Isolierung mononukleärer Zellen erfolgte mittels Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation.

#### **2.4.2 Probenaufbereitung**

Heparinisiertes Knochenmark bzw. Vollblut wurde unter Lichtschutz 15 Minuten lang mit immunfluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation erfolgte die Elimination von Erythrozyten durch Zugabe von 2 ml Lyse-lösung (FACS™ Lysing Solution, Becton Dickinson) über 5-10 Minuten. Danach erfolgte die Trennung nukleärer Zellen von Erythrozyten mittels Zentrifugation bei 1800 U/min für weitere 10 Minuten. Nach Zentrifugation wurde der Überstand über den abgesunkenen Zellen abpipettiert. Um restliche Zellfragmente zu beseitigen, wurden die gewonnenen Zellen im nächsten Schritt mit PBS-Lösung (CellWash, Becton Dickinson) gewaschen. Nach einer zweiten Zentrifugation wurde der Überstand erneut abpipettiert und die Zellen mit 200µl PBS-Puffer resuspendiert.

### 2.4.3 Markierung membranständiger Antigene

Nach der Aufbereitung wurden die Proben abhängig von der Morphologie der pathologischen Zellen und der klinischen Verdachtsdiagnose mit Hilfe eines Panels monoklonaler Antikörper untersucht. Die verwendeten Antikörper waren direkt mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluoresceinisothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE) und Peridin-Chlorophyll-a-Protein (PerCP) konjugiert. Bei jedem Patienten wurden Negativkontrollen des jeweiligen Panels durchgeführt. Es wurden Doppel- und Dreifachmarkierungen vorgenommen für folgende, über die „Cluster of Differentiation“ (CD) (Kishimoto et al. 1997) definierte membranständige Antigene:

CD1a (BL6, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD2 (39C1.5, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD3 (UCHT1, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD4 (13B8.2, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD5 (BL1a, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD7 (8H8.1, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD8 (B9.11, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD10 (ALB2; Coulter-Immunotech Diagnostics), CD11b (BEAR1, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD13 (SJ1D1, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD14 (RMO52, Coulter-Immunotech Diagnostics; MOP9 Becton Dickinson), CD15 (80H5, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD19 (J4119, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD20 (B9E9L27, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD22 (SHCL1, Becton Dickinson), CD24 (ALB9, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD33 (D3HL60.251, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD34 (QBEnd10, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD36 (OKM5, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD37 (BL14, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD45 (2D1, Becton Dickinson), CD56 (N901, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD61 (Y2/51, DAKO), CD64 (Clone22, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD65 (88H7, Coulter-Immunotech Diagnostics), CD66b (80H3, Coulter-Immunotech Diagnostics).

### 2.4.4 Zytoplasmatische Färbungen

Färbungen zytoplasmatischer und bisher nicht CD-klassifizierter Antigene wurden entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt für: CD3 (Sk7, Becton Dickinson), CD22 (SHCL1, Becton Dickinson), CD33 (D3HL60.251, Coulter-Immunotech Diagnostics), TdT (HT6, Dako), MPO (CLB-MPO-1, Coulter-Immunotech Diagnostics), MPO/Laktoferrin (CLB-MPO-1/CLB13.17, Coulter-Immunotech Diagnostics), Glycophorin A (D2.10, Coulter-Immunotech Diagnostics), IgM(GaH) (Southern Bio).

Die Tabelle 2-3 zeigt das im Rahmen der initialen Leukämietypisierung aktuell verwendete Färbeprotokoll.

**Tabelle 2-3: Im Rahmen der initialen Leukämietypisierung aktuell verwendetes Färbeprotokoll unter Berücksichtigung der Fluoreszenzfarbstoffe R-Phycoerythrin (PE), Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Peridin-Chlorophyll-a-Protein (PerCP)**

		PE	FITC	PerCP
Leukämien und Lymphome der B-Zell-Reihe (Abgrenzung zur myeloischen Zellreihe)	1.	CD19	CD10	CD20
	2.	CD22	CD37	CD20
	3.	CD20	slg	HLA-DR
	4.	CD14	CD15	CD3
	5.	CD34	CD19	HLA-DR
	6.	CD24	CD13	CD3
	7.	CD33	CD65	CD45
	8.	CD14	CD66b	CD3
Leukämien und Lymphome der T-Zell-Reihe	1.	CD2	CD1a	
	2.	CD3	TCR $\alpha\beta$	
	3.	CD3	TCR $\gamma\delta$	
	4.	CD5	CD7	
	5.	CD4	CD8	
Leukämien der myeloischen Zellreihe	1.	Glycophorin A	CD36	CD45
	2.	CD56	CD64	CD4
	3.	C-Kit	CD11b	
	4.	LEU-M3	CD61	
Zytoplasmatische Färbungen	1.	CD22	IgM-FITC(GaH)	CD3
	2.	CD22	MPO	CD3
	3.	Laktoferrin	MPO	CD3
	4.	CD33	TdT	
Negativkontrolle (alle Färbungen)		IgG1	IgG1	IgG1

Die Tabelle zeigt die verwendeten monoklonalen Antikörper und die jeweilige Kombination in den einzelnen Färbeschritten

### **2.4.5 Durchflusszytometrie**

Immunphänotypisierungen wurden nach Standardmethoden im Labor für Stammzelltransplantation und für Experimentelle Hämatologie der Klinik für Kinderonkologie, -Hämatologie und -Immunologie mittels direkter Immunfluoreszenz durchgeführt. Durchflusszytometrische Messungen erfolgten an einem FACScan-Durchflusszytometer (Becton-Dickinson, Mountain View, USA). Die Auswertung der Daten erfolgte rechnergestützt mit Hilfe des Programms CellQuest (Becton Dickinson). Die Messungen bezogen sich auf 10.000-20.000 Ereignisse. Unspezifische Antikörperbindungen wurden initial durch die Isotypen-Kontrolle ausgeschlossen. Ein positiver Antigennachweis galt für Oberflächenantigene bei Expression auf  $\geq 20\%$ , für zytoplasmatische Antingene bei  $\geq 10\%$  der untersuchten Zellen.

### **2.4.6 Klassifikation**

Entsprechend den Empfehlungen des europäischen Konsensusprotokolls (Bene et al. 1995) erfolgte die Linienzuordnung und Subklassifikation der ALL. Bei den ALL erfolgte zunächst die Zuordnung zur Zellreihe in B- und T-Zell-Leukämien. Entsprechend dem physiologischen Reifungsschema im Knochenmark wurden Leukämien vom B-Vorläuferzell-Typ anhand ihrer Reifungsstufe in Prä-prä-B-, Common-, Prä-B-ALL und reife B-ALL eingeteilt. Bei Leukämien vom T-Zell-Typ erfolgte die Einteilung in frühe- (prothymozytäre), intermediäre- und reife T-ALL.

#### **2.4.6.1 B-Vorläuferzell-ALL**

Allen Subtypen gemeinsam ist die Expression des zytoplasmatischen Markers CD22 und der Expression des Pan-B-Markers CD19 als B-Linien-spezifische Merkmale. Zellen vom Prä-prä-B-Phänotyp sind gekennzeichnet durch die Expression der Stammzell-Antigene HLA-DR und CD34, sowie der, im Reifungsprozess von B-Zellen erstmalig auftretenden Expression von zytoplasmatischem CD22 (cyCD22) und oberflächlichem CD19. Prä-B-Zellen unterscheiden sich von Prä-prä-B-Zellen durch die zusätzliche Expression von CD10 (CALLA). Eine weitere Abgrenzung zwischen frühen (common-ALL) und späten Prä-B-Zellen (Prä-B-ALL) erfolgt durch den Nachweis von zytoplasmatischem IgM und CD20 auf der Oberfläche, sowie dem Fehlen von CD34 auf späten Prä-B-Zellen. Reife B-Zellen sind gekennzeichnet durch die Expression von HLA-DR, CD19 CD20, CD22, CD37 und membranständigem IgM und IgD.

**Tabelle 2-4: Immunologische Klassifikation der Leukämien vom B-Zelltyp**

Typ	Bezeichnung	CD19	CD34	CD22	CD10	CD20	IgM	CD37	IgD
I	Prä-Prä-B	+	+	_1	-	-	-	-	-
II	C-ALL	+	+	_1	+	-	-	-	-
III	Prä-B-ALL	+	_2	_1	+	+	_1	-	-
IV	B-ALL	+	-	+	+/- <sup>3</sup>	+	+	+	+/- <sup>3</sup>

<sup>1</sup> zytoplasmatisch positiv, <sup>2</sup> meistens, <sup>3</sup> variabel

#### 2.4.6.2 T-Zell-ALL

Allen Subtypen gemeinsam ist das Vorkommen des T-Zell-spezifischen Markers CD3. T-ALL vom Typ I (prothymozytär) sind positiv für die zytoplasmatischen Marker TdT und CD3, oberflächlich exprimieren sie CD7, CD2 und CD5. Auf der Reifungsstufe vom Typ II (intermediär) finden sich zusätzlich, als Zeichen intrathymischer Entwicklung die Antigene CD1a bei gleichzeitiger Koexpression von CD4 und CD8. Reife T-ALL (Typ III) sind gekennzeichnet durch den Verlust von CD1a und die Ausreifung zu CD4- oder CD8-positiven Zellen.

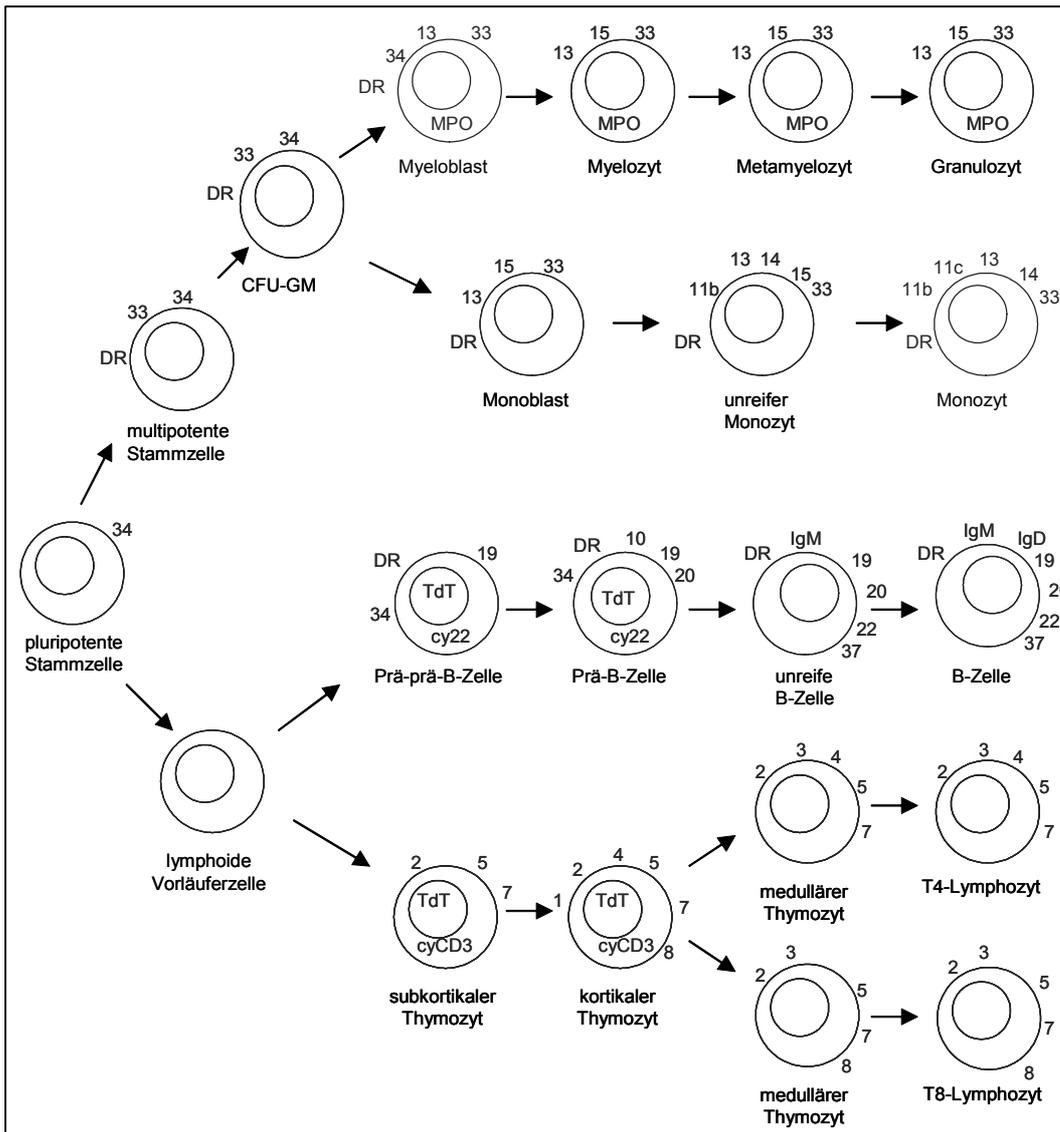
**Tabelle 2-5: Immunologische Klassifikation der Leukämien vom T-Zelltyp**

Typ	Bezeichnung	CD7	CD2	CD5	CD1	CD4	CD8	CD3	TCR
I	prothymozytär	+	+ <sup>1</sup>	+ <sup>1</sup>	-	-	-	_2	-
II	intermediär	+	+	+	+	+	+	_2	-
III	reif	+	+	+	-	+/- <sup>3</sup>	+/- <sup>3</sup>	+	+

<sup>1</sup> meistens, <sup>2</sup> zytoplasmatisch positiv, <sup>3</sup> entweder CD4- oder CD8 positiv

#### 2.4.6.3 Koexpression myeloischer Antigene

Ein Teil der akuten Leukämien exprimiert gleichzeitig Antigene, die charakteristisch für mehr als eine Zellreihe sind. So kann die aberrante Koexpression sowohl von myeloischen Differenzierungsantigenen auf Lymphoblasten (My<sup>+</sup> ALL) als auch umgekehrt lymphatischen Differenzierungsantigenen auf Blasten der myeloischen Zellreihe (Ly<sup>+</sup> AML) beobachtet werden. Die Abbildung 2-1 zeigt die Antigenprofile von Reifungsstadien lymphatischer und myelomonozytärer Zellen.



**Abbildung 2-1:** Zuordnung verschiedener linienspezifischer Antigene innerhalb der Hierarchie der Hämatopoese. Ziffern entsprechend der CD-Klassifikation; DR, HLA-DR; MPO, Myeloperoxidase. (Modifiziert nach Drexler et al. 1988; Freund und Queißer 1991).

## 2.5 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Patientendaten erfolgte rechnergestützt unter Einsatz des Statistikprogramms SPSS (Version 11, SPSS Inc. Chicago Illinois). Dabei wurden zunächst alle diagnostischen Parameter mittels Kolmogorov-Smirnov-Test bezüglich ihrer Verteilungsform untersucht. Normalverteilte Werte werden im Folgenden als Mittelwert +/- Standardabweichung, nicht-normalverteilte Werte werden durch Median und Bereich dargestellt.

Dichotome Variablen wurden mit intervallskalierten Variablen bei fehlender Normalverteilung unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Tests, bei Normalverteilung mittels t-Test nach Student miteinander verglichen. Die Korrelation intervallskalierter Variablen mit anderen intervallskalierten Variablen erfolgte bei Nicht-Normalverteilung der Werte mit Hilfe des Spearman-Tests. Dichotome Variablen wurden mit anderen dichotomen Variablen unter Verwendung des Chi-Quadrat-Tests miteinander verglichen. Bei Gruppenhäufigkeiten  $n < 5$  kam der exakte Test nach Fischer zur Anwendung.

Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten wurde nach dem von Kaplan und Meier (Kaplan und Meier 1958) beschriebenen Verfahren geschätzt. Das Gesamtüberleben der Patienten wurde berechnet vom Zeitpunkt der Diagnose bis zum Datum des Todes. Patienten, die zum Ende des Beobachtungszeitraumes noch lebten wurden zensiert. Patienten, bei denen der Status zum Ende des Beobachtungszeitraumes unbekannt war, wurden zum Zeitpunkt der letzten möglichen Beobachtung zensiert. Die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS) wurde berechnet vom Diagnosedatum bis zum Datum des ersten Ereignisses. Als Ereignis wurden das Fehlen der kompletten Remission nach Induktionstherapie (Tag 28), Rezidiv, Zweitmalignom oder Tod gewertet. Unterschiede bezüglich der Überlebenszeiten wurden mittels Log-Rank-Test auf Signifikanz geprüft. Ein signifikanter Unterschied wurde bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$  angenommen.

### 2.5.1 Methodisches Vorgehen und Patientengruppierung

Die Untersuchung des gesamten Patientenkollektivs (N=126) erfolgt getrennt für Patienten im ersten Lebensjahr (n=11) und ältere Patienten (n=115). Als Untersuchungskollektiv werden im folgenden die Gruppe der Patienten >12 Monate bezeichnet. Patienten im ersten Lebensjahr werden im letzten Kapitel des Ergebnisteils als eigene Gruppe behandelt.

Patienten mit Koexpression von mindestens einem oder mehreren der myeloischen Antigene CD11b, CD13, CD15, CD33 werden fortan als My<sup>+</sup> ALL bezeichnet, Patienten ohne myeloische Koexpression entsprechend als My<sup>-</sup> ALL.

Für intervallskalierte Variablen erfolgte für das Untersuchungskollektiv (n=115) eine Kategorisierung der Werte in einen *niedrigen*, *mittleren* und *höheren* Bereich. Die Intervallgrenzen wurden dabei auf der Grundlage von Perzentilen und Häufigkeitsverteilungen so gewählt (Tabelle 2-6), dass drei Gruppen mit etwa gleich großem Stichprobenumfang entstanden (Donadieu et al. 2000).

Im Hinblick auf anerkannte Prognosefaktoren wurde das Untersuchungskollektiv in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Intervallgrenzen dazu sind in (Tabelle 1-1) aufgeführt (Janka-Schaub et al. 1999).

Bei der Untersuchung der prognostischen Bedeutung der Untersuchungsparameter war die Zielgröße die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS). Dabei wurde die pEFS jeweils nach 2 bzw. 6 Jahren berechnet. Der Zeitraum bis 2 Jahre sollte dabei die laufende, der Zeitraum nach 6 Jahren die Langzeittherapie erfassen. Im Text ist, sofern nicht anders erwähnt, die pEFS nach 6 Jahren angegeben

**Tabelle 2-6: Kategorisierung intervallskalierter Parameter in einen *niedrigen*, *mittleren* und *höheren* Bereich**

Parameter	Gruppe I	Gruppe II	Gruppe III
Hämoglobin (g/dl)	< 6,5	6,5 - 8,6	> 8,6
Thrombozyten (n/μl)	< 24.000	24.000 - 71.000	> 71.000
Harnsäure (mg%)	< 4,2	4,2 - 5,8	> 5,8
Lactatdehydrogenase (U/l)	< 350	350 - 600	> 600

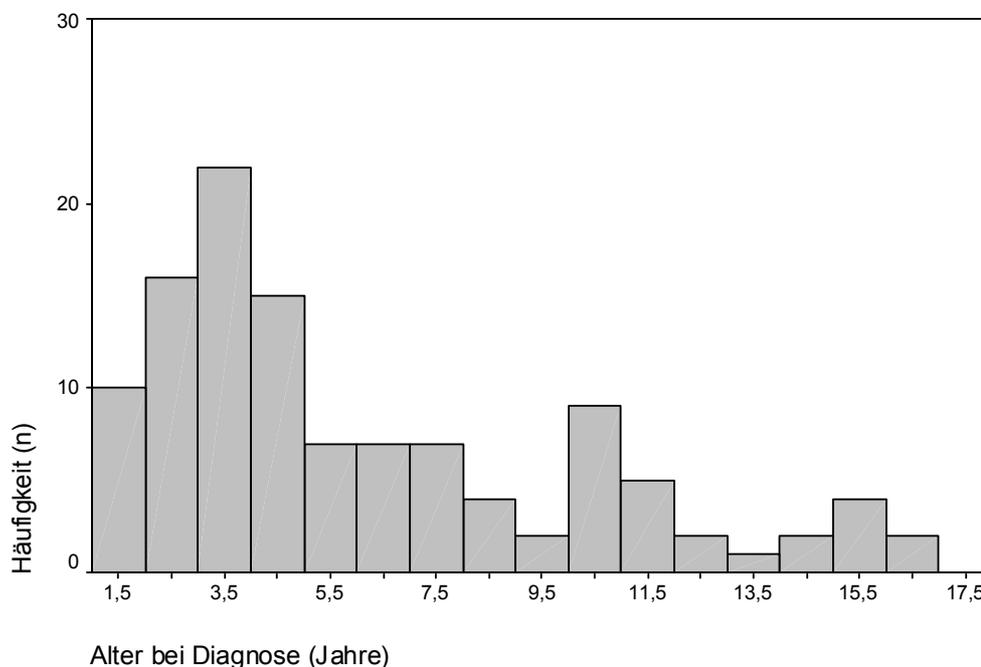
### 3 Ergebnisse

Die Auswertung der Patienten im ersten Lebensjahr (n=11) erfolgte als eigene Gruppe und wird in Kapitel 3.5.5 behandelt. Die nun folgenden Ergebnisse beziehen sich auf ein Patientenkollektiv von 115 Patienten >12 Monate.

#### 3.1 Patientencharakteristik

Der Altersmedian des Patientenkollektivs betrug 4,6 Jahre mit einem Minimum von 1,29 Jahren und einem Maximum von 16,6 Jahren. 25 Patienten waren älter als 10 Jahre. Bei der Geschlechtsverteilung überwiegen männliche Patienten (56,5%) leicht gegenüber weiblichen Patienten (43,5%) mit einem Quotienten von 1,3.

Alle Patienten wurden zytostatisch behandelt. Die Therapie erfolgte nach dem Therapieprotokoll COALL-05-92 (n=88), COALL-04-89 (n=23) und COALL-06-97 (n=4). Die initiale Risikostratifizierung erfolgte für 58 Patienten in den Niedrigrisikoarm (Low Risk) und für 57 Patienten in den Hochrisikoarm (High Risk) des Therapieprotokolls.



**Abbildung 3-1:** Altersverteilung des Untersuchungskollektivs >12 Monate (n=115).

Im Rahmen der klinisch körperlichen Untersuchung fielen bei 55 Patienten Hautblutungen im Sinne von Petechien oder Hämatomen auf. Oberflächliche Lymphknotenschwellungen hatten 56 Patienten. Eine tastbare Lebervergrößerung von mehr als 4 cm unter dem Rippenbogen wurde bei 16, eine entsprechende Milzvergrößerung bei 19 Patienten dokumentiert.

Im Rahmen der hämatologischen und klinisch-chemischen Labordiagnostik erhobene Befunde bezüglich des Blutbildes, dem Spiegel der Serum-Harnsäure und der Enzymaktivität der Laktatdehydrogenase sind in Tabelle 3-1 als Median mit den zugehörigen Bereichswerten dargestellt.

Bei 2 Patienten wurde zum Aufnahmezeitpunkt eine ZNS-Beteiligung festgestellt. Eine Mediastinalverbreiterung konnte röntgenologisch bei 7 Patienten festgestellt werden. Lokalisierte Lymphome fanden sich mittels bildgebender Verfahren bei 11 Patienten. Die Leber war in der sonographischen Untersuchung des Abdomens bei 65 Patienten, die Milz in 83 Fällen über den altersentsprechenden Normwert vergrößert.

In keinem Fall konnte ein BCR/ABL-Rearrangement (**breakpoint cluster region/Abelson**), das der Translokation t(9;22) äquivalent ist nachgewiesen werden, wobei der Befund der molekulargenetischen Untersuchung lediglich für 75 Patienten vorlag. Von diesen war die Befundung in 17 Fällen mangels Materialmenge bzw. Materialqualität nicht möglich.

In der zytogenetischen Untersuchung, die bei 24 Patienten vorlag, konnte in einem Fall die Translokation t(4;11) nachgewiesen werden, ein weiterer Patient hatte einen hyperdiploiden Chromosomensatz mit 51 Chromosomen, die übrigen Patienten hatten einen unauffälligen Karyotyp. Bei weiteren 12 Patienten war die Befundung nicht möglich. Für molekulargenetische und zytogenetische Befunde erfolgten aufgrund der geringen Fallzahlen keine Berechnungen.

**Tabelle 3-1: Patientencharakteristika des Untersuchungskollektivs (>12 Monate, n=115) zum Zeitpunkt der Erstpräsentation**

Parameter		
<b>Geschlecht</b>	m	65 (56,5%)
	w	50 (43,5%)
<b>Alter bei Diagnose</b>	Median (Bereich)	4,6 (1,2 - 16,6)
	1-9 Jahre	90 (78,3%)
	>10 Jahre	25 (21,7%)
<b>Therapieprotokoll</b>	COALL-04-89	23 (20%)
	COALL-05-92	88 (76,5%)
	COALL-06-97	4 (3,5%)
<b>Risikostratifizierung (initial)</b>	Low Risk	58 (50,4)
	High Risk	57 (49,6)
<b>Klinisch körperl. Untersuchung</b>	Hautblutung	55 (48,7%)
	Lebergröße (>4cm)	16 (15,5%)
	Milzgröße (>4cm)	19 (18,6%)
	Lymphknoten (palpatorisch)	56 (49,6%)
<b>Labordiagnostik (Median und Bereichswerte)</b>	Hb (g/dl)	7,8 (2,7 - 14,7)
	Leukozyten (n/µl)	11.900 (800 - 1.258.000)
	Thrombozyten (n/µl)	37.000 (5.000 - 842.000)
	Harnsäure (mg%)	5,3 (1,6 - 13,0)
	LDH (U/l)	461 (149 - 6.282)
<b>Organmanifestationen</b>	Mediastinum*	7 (6,25%)
	Lymphome (Bildgebung)**	11 (9,6%)
	ZNS-Befall	2 (1,7%)
	Hepatomegalie (Sonographie)	65 (58%)
	Splenomegalie (Sonographie)	83 (73,5%)
<b>Zyto-/Molekulargenetik</b>	kein BCR/ABL-Rearrangement	58 / 75 (77,3%)
	Translokation	1 / 24 (4,2%)
	Hyperdiploidie	1 / 24 (4,2%)

Die Prozentzahlen beziehen sich auf die Gesamtzahl der mit der jeweiligen Methode untersuchten und auswertbaren Patienten.

\*=Röntgen-Thorax

\*\*=mittels bildgebender Verfahren lokalisierte Lymphome (Sonographie, Röntgen oder CT)

## 3.2 Immunphänotypisierung

### 3.2.1 Immunologische Klassifikation nach Subtyp

Bezüglich der Linienzugehörigkeit überwogen B-Vorläuferzell-ALL (n=106; 92,2%) gegenüber T-Vorläuferzell-ALL (n=9; 7,8%). Die B-Vorläuferzell-ALL wurden in absteigender Häufigkeit folgendermaßen weiter subklassifiziert: 60(56,6%) Prä-B-ALL, 42(39,6%) C-ALL und 4(3,8%) Prä-prä-B-ALL.

**Tabelle 3-2: Häufigkeiten der immunologischen Subtypen**

Subtyp	n (%)
Prä-Prä-B-ALL	4 (3,5)
Prä-B-ALL	60 (52,2)
C-ALL	42 (36,5)
T-ALL	9 (7,8)
Gesamt	115 (100)

### 3.2.2 Koexpression myeloischer Antigene

Insgesamt konnte die Koexpression von mindestens einem der Antigene CD11b, CD13, CD15 oder CD33 in 46 (40%) Fällen nachgewiesen werden. Die Antigene CD 11c und CD14 wurden in keinem Fall koexprimiert.

Im einzelnen wurden die Antigene in absteigender Häufigkeit folgendermaßen exprimiert: CD13 (n=28; 24,3%), CD33 (n=21; 18,3%), CD15 (n=14; 12,2%), CD11b (n=7; 6,1%). Die myeloischen Antigene wurden sowohl einzeln, als auch in Kombination koexprimiert. Ein einziges Antigen exprimierten 25(21,7%) Patienten von 115 Patienten, 16(13,9%) Patienten exprimierten gleichzeitig 2 und 5(4,3%) Patienten gleichzeitig 3 myeloische Antigene.

Bezogen auf die Zelllinie der ALL waren My<sup>+</sup> ALL prozentual häufiger in der Gruppe der B-Vorläuferzell-ALL vertreten, als in der Gruppe der T-ALL.

Innerhalb der B-Vorläuferzell-ALL wurden myeloische Antigene prozentual am häufigsten bei Patienten mit Prä-B-ALL und C-ALL nachgewiesen (54,3% bzw. 39,1%). Bei Patienten mit T-ALL waren es 2 von 9 Patienten (Tabelle 3-3).

**Tabelle 3-3: Leukämie-Subtyp und Koexpression myeloischer Antigene**

	n=115	My <sup>+</sup> ALL <sup>(a)</sup> n=46	CD11b <sup>+</sup> n=7	CD13 <sup>+</sup> n=28	CD15 <sup>+</sup> n=14	CD33 <sup>+</sup> n=21
<b>Prä-Prä-B-ALL</b>	4 (3,5)	1 (2,2%)		1 (3,6%)		1 (4,8%)
<b>C-ALL</b>	42 (36,5)	18 (39,1%)	4 (57,1%)	13 (46,4%)	4 (28,6%)	8 (38,1%)
<b>Prä-B-ALL</b>	60 (52,2)	25 (54,3%)	3 (42,9%)	14 (50,0%)	9 (64,3%)	11 (52,4%)
<b>T-ALL</b>	9 (7,8)	2 (4,3%)			1 (7,1%)	1 (4,8%)

Den Subtypen sind die Koexpression insgesamt (My<sup>+</sup> ALL), sowie die myeloischen Antigene im einzelnen gegenübergestellt.

<sup>(a)</sup>= Expression von mindestens einem der myeloischen Antigene CD11b, CD13, CD15 oder CD33

### 3.2.3 Klinische Bedeutung des immunologischen Subtyps

Bezogen auf das Geschlecht unterschieden sich die immunologischen Subtypen nicht signifikant. Bei Patienten mit T-ALL als auch bei Patienten mit C-ALL fiel auf, dass prozentual etwa doppelt so viele Patienten männlichen Geschlechts waren (p=n.s.).

Bei der statistischen Analyse der Beziehung zwischen dem Lebensalters zum Zeitpunkt der Diagnose und der immunologischen Zuordnung zur Zellreihe zeigte sich, dass das mediane Lebensalter bei Patienten mit T-ALL signifikant höher war, als bei Patienten mit B-Vorläufer-Zell-ALL (10,3 Jahre vs. 4,3 Jahre; p<0.01).

Patienten mit T-ALL waren zum Diagnosezeitpunkt im Vergleich zu den anderen Subtypen älter (10,3 Jahre; 0-16,7), Patienten mit Prä-prä-B-ALL am jüngsten (0,6 Jahre; 0-14,4). Patienten mit C-ALL und Prä-B-ALL waren etwa gleich alt (Prä-B-ALL:4,3 Jahre; 0,6-15,8 und C-ALL:4,2; 1,0-16,2).

Die immunologischen Subklassen unterschieden sich hinsichtlich initialer Laborparameter signifikant bezüglich des initialen Hämoglobinwert (p<0.05), der initialen Leukozytenzahl (p<0.001) und der Harnsäurekonzentration (p<0.01). Der initiale Wert der Laktatdehydrogenase und die Thrombozytenzahl waren zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen den Subklassen nicht signifikant unterschiedlich.

**Tabelle 3-4: Vergleich der Subtypen bezogen auf hämatologische und klinisch-chemische Laborparameter**

Parameter	Prä-Prä-B (n=4)	C-ALL (n=42)	Prä-B (n=60)	T-ALL (n=9)	p=
<b>Hämoglobin (g/dl)</b>	7,3 (4,8-9,4)	7,4 (4,3-14,0)	7,1 (2,7-13,0)	10,1 (8,1-14,7)	<0.05
<b>Leukozyten (n/<math>\mu</math>l)</b>	36.500 (27.500- 229.000)	11.600 (1.800- 1.258.000)	6.600 (800-150.000)	46.000 (6.500-773.000)	<0.001
<b>Thrombozyten (n/<math>\mu</math>l)</b>	35.500 (26.000- 241.000)	35.500 (5.000-842.000)	37.000 (7.000-194.000)	56.000 (15.000- 177.000)	n.s.
<b>Harnsäure (mg%)</b>	5,4 (5,3-7,0)	5,2 (1,6-11,2)	4,5 (1,6-13,0)	10,2 (5,3-13,0)	<0.01
<b>LDH (U/l)</b>	538 (355-2.229)	480 (156-6.282)	406 (149-5.520)	1.392 (214-5.181)	n.s.

Angegeben als Median und Bereich. Signifikante Unterschiede ergaben sich bezüglich der initialen Leukozytenzahl und der Harnsäure

Bei der Korrelation von Befunden aus der initialen klinisch-körperlichen Untersuchung unterschieden sich die immunologischen Subgruppen hinsichtlich der Leber- ( $p < 0.01$ ) und Milzgröße ( $p < 0.01$ ) signifikant. Dabei hatten Patienten mit Prä-prä-B-ALL und Patienten mit T-ALL prozentual häufiger eine tastbare Leber- oder Milzvergrößerung (>4cm unter dem Rippenbogen), als Patienten mit C-ALL oder Prä-B-ALL. In der abdominalsonographischen Untersuchung fielen diese Unterschiede weder für die Lebergröße ( $p = n.s.$ ), noch für die Milzgröße auf ( $p = n.s.$ ). Prozentual hatten Patienten mit T-ALL häufiger eine vergrößerte Leber (77%) als Patienten mit Prä-prä-B-ALL (50%), C-ALL (49%) oder Prä-B-ALL (61%). Bei der Milzgröße waren die Verhältnisse annähernd gleich.

Im Hinblick auf Hautblutungen oder oberflächlich tastbarer Lymphknotenvergrößerung waren die Unterschiede zwischen den immunologischen Subgruppen nicht signifikant.

Patienten mit T-ALL hatten signifikant häufiger mittels bildgebender Verfahren diagnostizierte Lymphome ( $n=4$ ; 44,4%), als Patienten mit C-ALL ( $n=2$ ; 4,7%) oder Prä-B-ALL ( $n=5$ ; 8,3%) ( $p < 0.01$ ).

Einen initialen ZNS-Befall hatten ein Patient mit T-ALL und ein Patient mit C-ALL.

**Tabelle 3-5: Klinische Relevanz des immunologischen Subtyps**

Parameter	n	Prä-Prä-B n=4 (%)	C-ALL n=42 (%)	Prä-B n=60 (%)	T-ALL n=9 (%)	p=
<b>Geschlecht</b>						
m	65	2 (50%)	29 (69%)	28 (46,6%)	6 (66,7%)	n.s.
w	50	2 (50%)	13 (31%)	32 (53,4%)	3 (33,3%)	
Alter bei Diagnose in Jahren (Bereich)	4,6 (1,2-16,6)	11,0 (4,4 - 14,4)	4,5 (1,3 - 16,1)	4,3 (1,2 - 15,8)	10,2 (3,1 - 16,6)	<0.05
<b>Risikostratifizierung (1)</b>						
Low Risk	58		17 (40,5%)	41 (68,3%)		
High Risk	57	4 (100%)	25 (59,5%)	19 (31,7%)	9 (100%)	
<b>Klinisch körperl. Untersuchung</b>						
Hautblutung <sup>(2)</sup>	55		21 (50%)	28 (46,6%)	6 (66,6%)	n.s.
Lebergröße (>4cm) <sup>(3)</sup>	16	1 (25%)	7 (16,6%)	4 (6,6%)	4 (44,4%)	<0.01
Milzgröße (>4cm) <sup>(3)</sup>	19	1 (25%)	4 (9,4%)	9 (15,0%)	5 (55,5%)	<0.01
Lymphknoten (palpatorisch)	56		16 (38%)	34 (56,6%)	6 (66,6%)	
<b>Organbefall</b>						
Mediastinum	7		1 (2,3%)		6 (66,6%)	<0.001
Lymphome <sup>(4)</sup> (Bildgebung)	11		2 (4,7%)	5 (8,3%)	4 (44,4%)	<0.01
ZNS-Befall	2		1 (2,3%)		1 (11,1%)	n.s.
Hepatomegalie (Sonographie)	65	2 (50%)	20 (47,6%)	36 (60,0%)	7 (77,7%)	n.s.
Splenomegalie (Sonographie)	83	4 (100%)	27 (64,2%)	44 (73,3%)	8 (88,9%)	n.s.

(1) = Phänotyp Prä-prä-B bzw. T-ALL per Definition High Risk-Zweig (Signifikanz nicht berechnet)

(2) = Petechien bzw. Hämatome

(3) = in cm unter Rippenbogen

(4) = mittels bildgebender Verfahren lokalisierte Lymphome (Sonographie, Röntgen o. CT)

### 3.2.4 Klinische Bedeutung der Koexpression myeloischer Differenzierungsantigene

Bezogen auf das Geschlecht ließ sich bei Patienten mit Expression myeloischer Antigene kein signifikanter Unterschied zu Patienten mit fehlender Expression feststellen. Das Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Patienten war annähernd ausgeglichen. Von 46 My<sup>+</sup> ALL waren 24 männlich und 22 weiblich. Das Lebensalter zum Zeitpunkt der Diagnose war nicht signifikant unterschiedlich. My<sup>+</sup> ALL waren im Median 4,8(1,5-16,6) Jahre alt gegenüber My<sup>-</sup> ALL mit 4,4(1,2-16,1).

Patienten mit Expression myeloischer Antigene unterschieden sich nicht signifikant von Patienten ohne myeloische Koexpression bezüglich Hautblutungen, Lebergröße, Milzgröße oder oberflächlichen Lymphknoten.

Bezogen auf prätherapeutisch erhobene Laborbefunde unterschieden sich My<sup>+</sup> ALL gegenüber My<sup>-</sup> ALL nicht signifikant. Insgesamt lagen die Medianwerte der Laborparameter bei My<sup>+</sup> ALL geringfügig niedriger als bei My<sup>-</sup> ALL.

**Tabelle 3-6: Vergleich von My<sup>+</sup> ALL und My<sup>-</sup> ALL bezogen auf hämatologische und klinisch-chemische Parameter zum Zeitpunkt der Diagnose**

Parameter	My <sup>+</sup> ALL (n=46)	My <sup>-</sup> ALL (n=69)	p=
Hämoglobin (g/dl)	7,5 (2,7 - 14,0)	7,9 (4,5 - 14,7)	n.s.
Leukozyten (n/μl)	9.550 (800 - 216.000)	13.400 (1.200 - 1.258.000)	n.s.
Thrombozyten (n/μl)	35.000 (5.000 - 241.000)	43.000 (5.000 - 842.000)	n.s.
Harnsäure (mg%)	4,8 (1,7 - 12,6)	5,3 (1,6 - 13,0)	n.s.
LDH (U/l)	451 (184 - 6.282)	466 (149 - 5.520)	n.s.

Angegeben sind jeweils der Median und Bereich des entsprechenden Parameters.

**Tabelle 3-7: Klinische Relevanz der myeloischen Koexpression**

Parameter	n	My <sup>+</sup> ALL n=46 (%)	My <sup>-</sup> ALL n=69 (%)	p=
<b>Geschlecht</b>				
m	65	24 (52,2)	41 (59,4)	n.s.
w	50	22 (47,8)	28 (40,6)	n.s.
Alter bei Diagnose in Jahren (Bereich)	4,6 (1,2-16,6)	4,8 (1,56 - 16,6)	4,4 (1,29 - 16,1)	n.s.
<b>Risikostratifizierung</b>				
Low Risk	58	19 (41,3)	39 (56,5)	n.s.
High Risk	57	27 (58,7)	30 (43,5)	n.s.
<b>Klinisch körperliche Untersuchung</b>				
Hautblutung <sup>(1)</sup>	55	23 (50)	32 (46,3)	n.s.
Lebergröße (>4cm) <sup>(2)</sup>	16	7 (15,2)	9 (13)	n.s.
Milzgröße (>4cm) <sup>(2)</sup>	19	6 (13)	13 (18,8)	n.s.
Lymphknoten (palpatorisch)	56	26 (56,5)	30 (30,4)	n.s.
<b>Organbefall</b>				
Mediastinum	7	2 (4,3)	5 (7,2)	n.s.
Lymphome (Bildgebung)	11	2 (4,3)	9 (13)	n.s.
ZNS-Befall	2	1 (2,1)	1 (1,4)	n.s.
Hepatomegalie (Sonographie)	65	29 (63)	36 (52,1)	n.s.
Splenomegalie (Sonographie)	83	36 (78,2)	47 (68,1)	n.s.

<sup>(1)</sup> = Petechien bzw. Hämatome

<sup>(2)</sup> = in cm unter dem Rippenbogen

### 3.2.5 Koexpression in Abhängigkeit von Prognosefaktoren

Um mögliche Assoziationen der Koexpression myeloischer Antigene mit bekannten Risikogruppen zu untersuchen, wurden My<sup>+</sup> ALL und My<sup>-</sup> ALL den jeweiligen Risikogruppen gegenübergestellt. Es waren keine Unterschiede in der Verteilung zwischen My<sup>+</sup> ALL und My<sup>-</sup> ALL feststellbar. Ein geringgradig höherer Anteil der Patienten mit My<sup>+</sup> ALL befand sich in der Gruppe der Patienten mit einem Lebensalter  $\geq 10$  Jahre.

**Tabelle 3-8: Koexpression myeloischer Antigene in Abhängigkeit von anerkannten Prognosefaktoren**

Prognosefaktor	My <sup>+</sup> ALL (n=46)	My <sup>-</sup> ALL (n=69)	p=
<b>Alter bei Diagnose (Jahre)</b>			
$\geq 1$ und $< 10$	33 (71,7%)	57 (82,6%)	n.s.
$\geq 10$	13 (28,3%)	12 (17,4%)	
<b>Immunologischer Subtyp</b>			
C-ALL o. Prä-B-ALL	43 (93,5%)	59 (85,5%)	n.s.
Prä-prä-B-ALL o. T-ALL	3 (6,5%)	10 (14,5%)	
<b>Initiale Leukozytenzahl</b>			
Leukozyten $< 25.000$	31 (67,4%)	44 (63,8%)	n.s.
Leukozyten $\geq 25.000$	15 (32,6%)	25 (36,2%)	

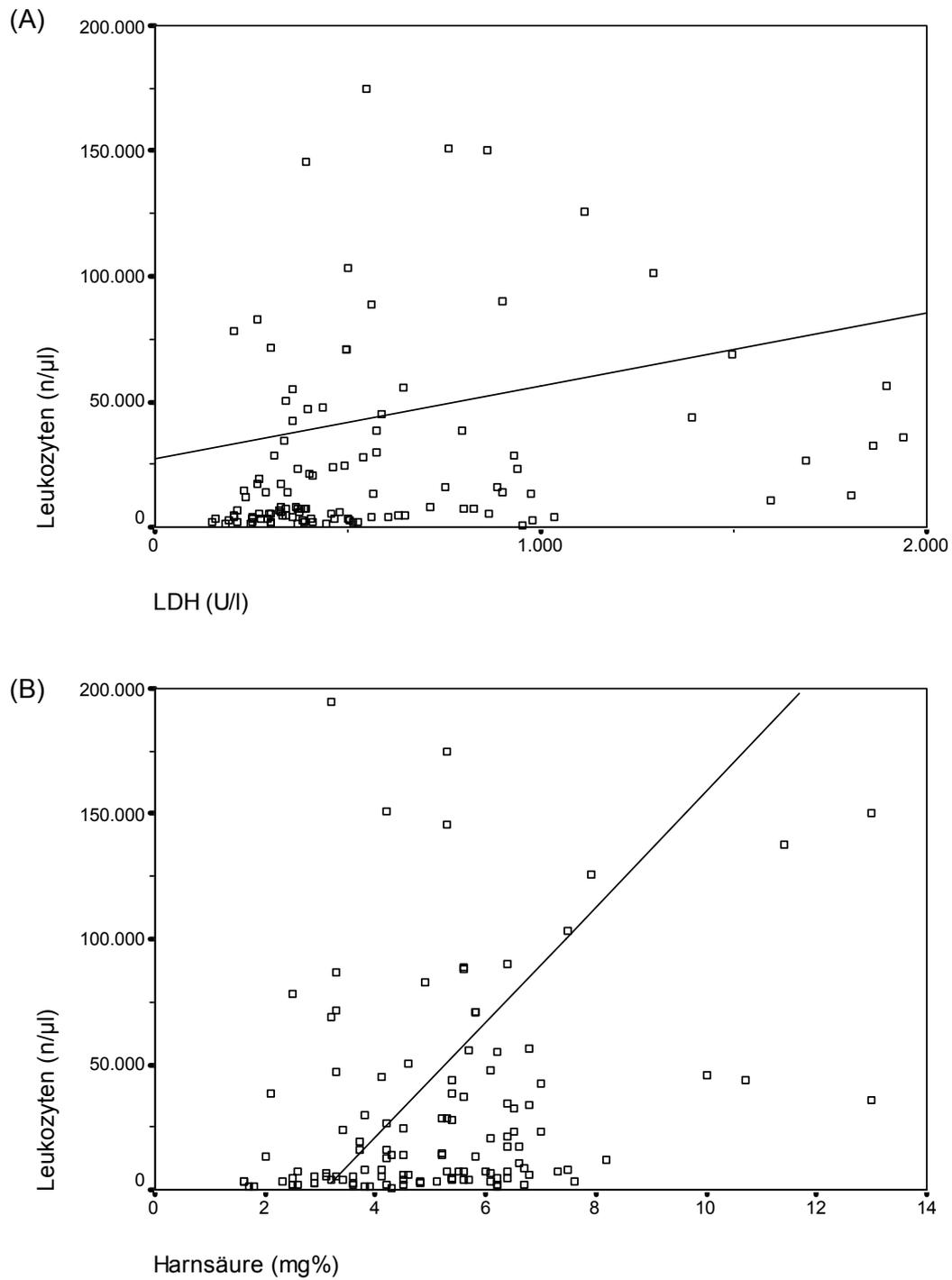
### 3.2.6 Korrelationen hämatologischer und klinisch-chemischer Laborparameter

#### Initiale Leukozytenzahl

Der Wert der initialen Leukozytenzahl korrelierte signifikant mit dem Wert der Serum-Harnsäure ( $p < 0.001$ ;  $r = 0,38$ ), mit der Aktivität der Laktatdehydrogenase ( $p < 0.001$ ;  $r = 0,45$ ) und invers mit der initialen Thrombozytenzahl ( $p < 0.05$ ;  $r = -0,21$ ).

#### Lactatdehydrogenase

Statistisch korrelierte der initiale Wert der LDH-Aktivität in geringem Maße positiv mit dem initialen Hämoglobinwert ( $p < 0.05$ ;  $r = 0,21$ ) und in hohem Maße mit den Werten für die initiale Leukozytenzahl ( $p < 0.001$ ;  $r = 0,45$ ) und der Harnsäure ( $p < 0.01$ ;  $r = 0.27$ ). Zur Thrombozytenzahl bestand keine Korrelation.



**Abbildung 3-2:** Streudiagramme. Korrelation zwischen initialer Leukozytenzahl und Laktatdehydrogenase ( $p < 0.001$ ;  $r = 0.45$ ) (A) bzw. initialer Leukozytenzahl und Harnsäure ( $p < 0.001$ ;  $r = 0.38$ ) (B).

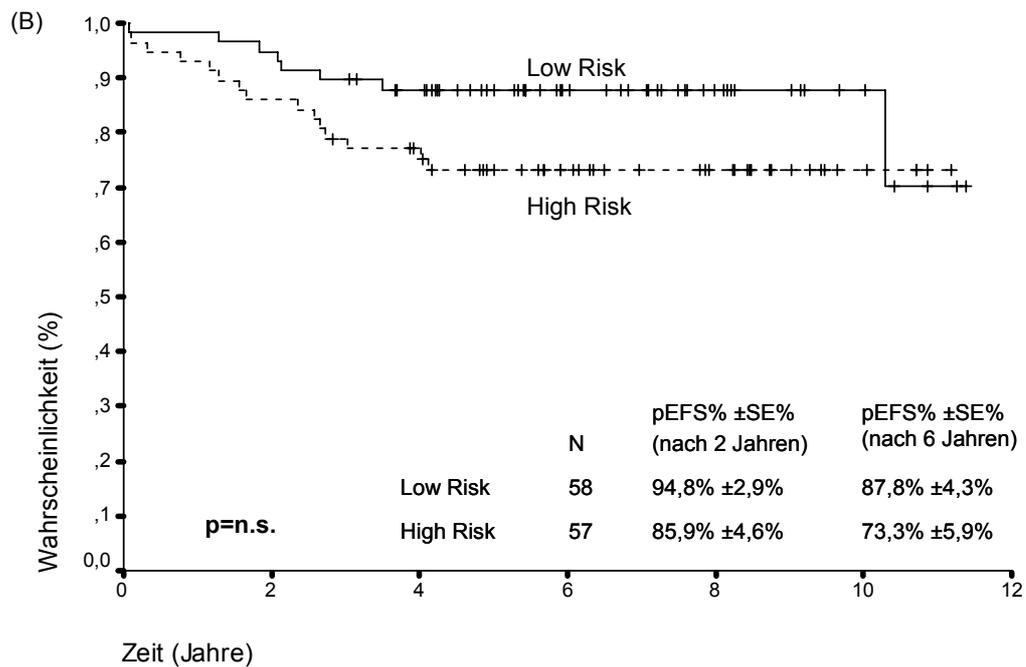
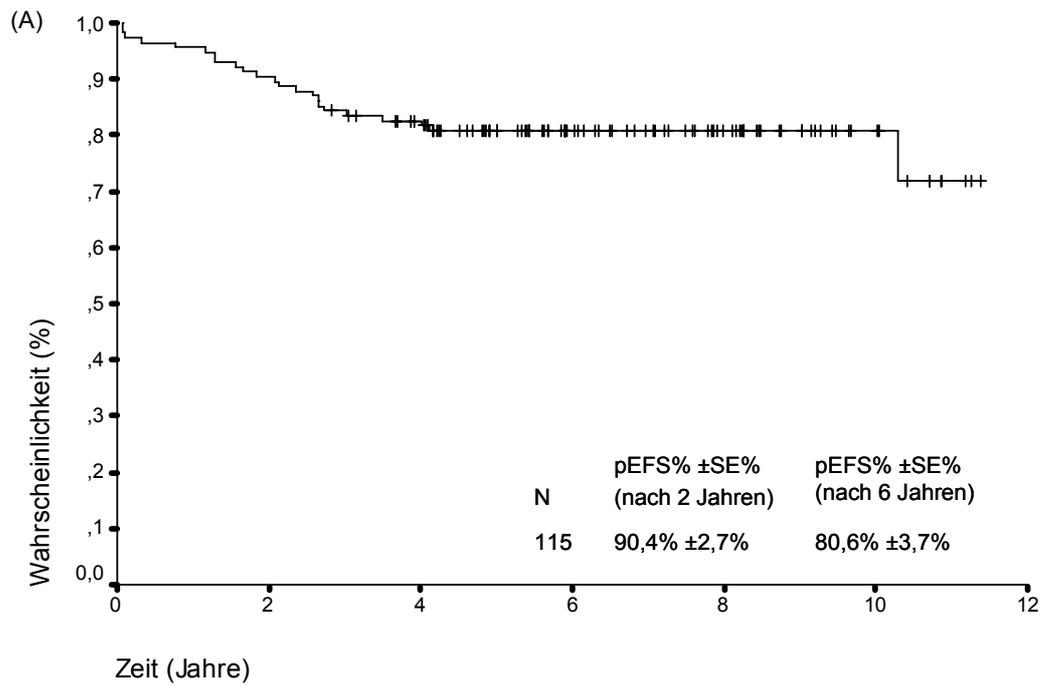
### 3.3 Therapieergebnisse

#### 3.3.1 Untersuchungskollektiv

Zum Zeitpunkt der letzten Stuserhebung befanden sich 95 (82,6%) Patienten in kompletter Remission. Bei einem Patienten wurde ein Spätrezidiv nach 10,3 Jahren diagnostiziert. Insgesamt waren 9 Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraumes verstorben, dabei war die Todesursache in 6 Fällen krankheitsbedingt (DOD) und in 3 Fällen komplikationsbedingt (DOC). Nach der Induktionstherapie erreichten 113 (98,3%) Patienten eine Vollremission. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes trat bei 18 (15,7%) Patienten ein Rezidiv (REZ) auf, ein Patient (0,9%) entwickelte ein Zweitmalignom (2TU), zwei Patienten sind komplikationsbedingt verstorben und bei 9 Patienten war eine Stuserhebung nicht möglich (Lost to follow-up, LFU). 83 (72,2%) Patienten überlebten ereignisfrei in kompletter Remission. 8 (7%) Patienten wurden einer Knochenmarktransplantation zugeführt.

Nach einer medianen Beobachtungszeit von 6,1 Jahren (0,1-11,3 Jahre) betrug die Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit des Untersuchungskollektivs nach 6 Jahren 91,8%  $\pm$  2,4%. Die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS) lag nach 6 Jahren bei 80,6%  $\pm$  3,7%.

Niedrigrisikopatienten (n=58) hatten gegenüber Hochrisikopatienten (n=57) insgesamt ein günstigeres Auskommen (pEFS 87,8%  $\pm$  4,3% vs. 73,3%  $\pm$  5,9% nach 6 Jahren). Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.



**Abbildung 3-3:** Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS) bei 115 Patienten mit ALL. Ereignisfreies Überleben aller Patienten des Untersuchungskollektivs (n=115)(A) und nach Risikozweigen (Low Risk u. High Risk) getrennt (B).

### 3.3.2 Prognostische Bedeutung der Koexpression myeloischer Antigene

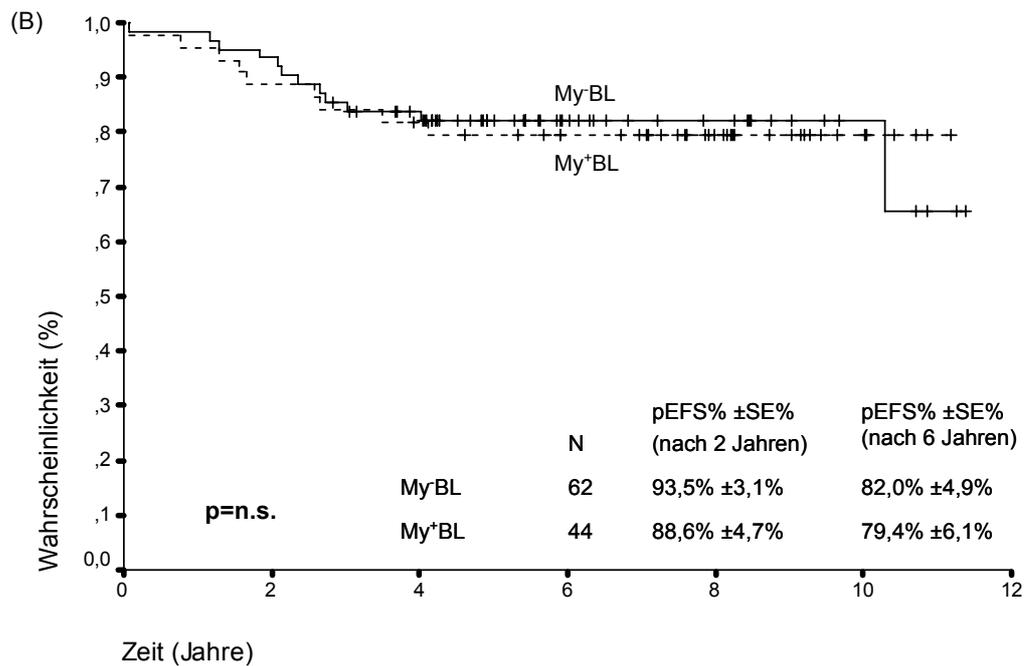
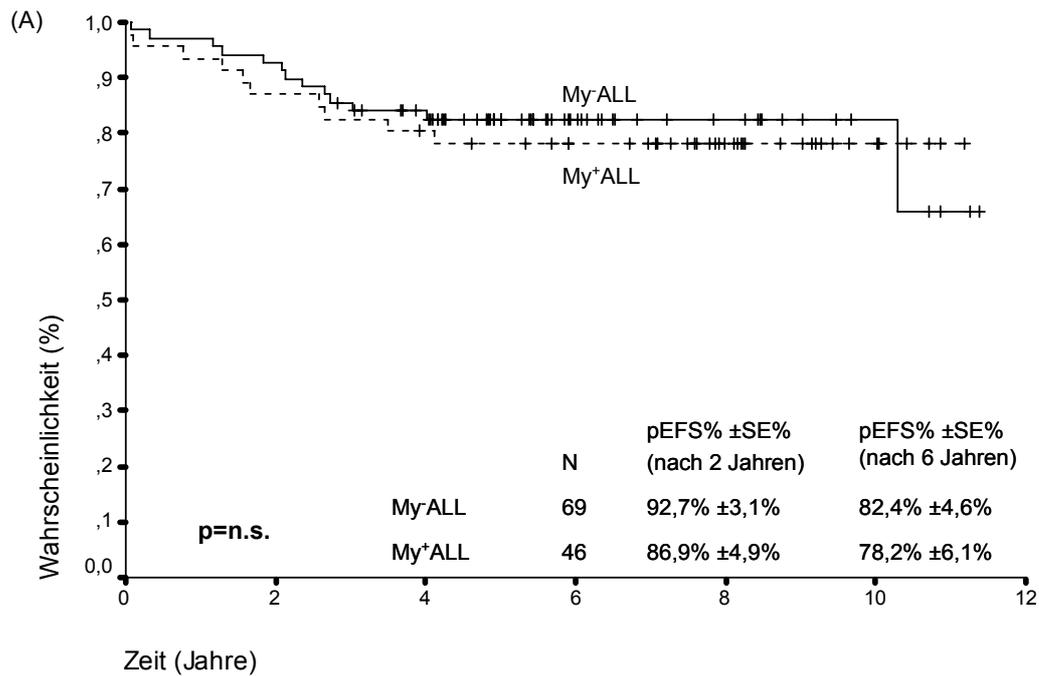
Patienten mit My<sup>+</sup> ALL (n=46) hatten im Vergleich zu Patienten mit My<sup>-</sup> ALL (n=69) ähnliche Therapieergebnisse bezogen auf die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (78,2±6,1% vs. 82,4±4,6% nach 6 Jahren, p=n.s.).

Innerhalb der Gruppe der Patienten mit B-Vorläuferzell-ALL war unter Ausschluss von 9 Patienten mit T-ALL kein Unterschied bezogen auf die pEFS erkennbar. Nach 6 Jahren überlebten Patienten mit My<sup>+</sup>BL (n=44) mit einer pEFS von 79,4%±6,1% gegenüber 82,0%±4,9% in der Gruppe der Patienten mit My<sup>-</sup>BL (n=62). Der Unterschied war statistisch nicht signifikant.

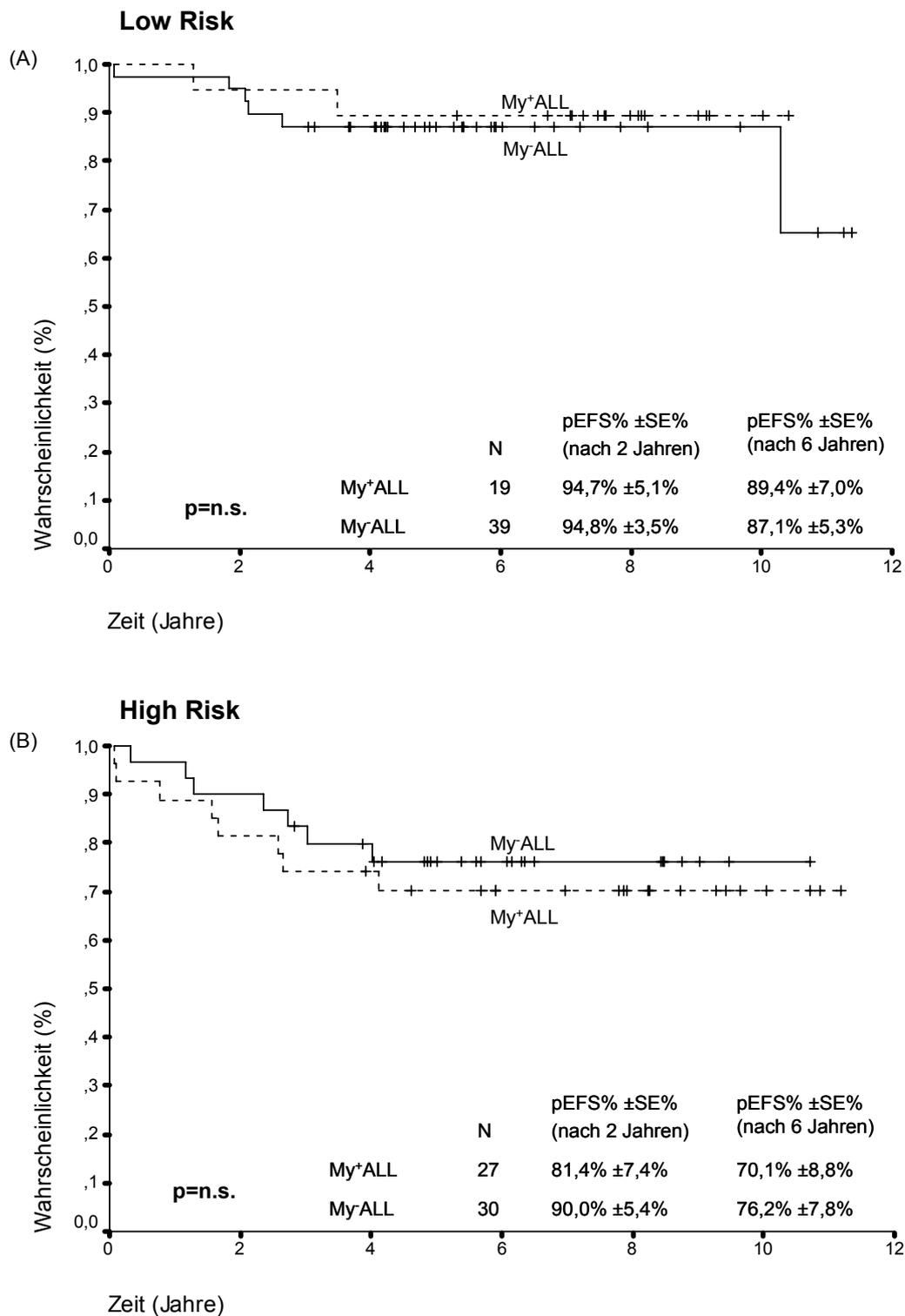
Das ereignisfreie Überleben von My<sup>+</sup> ALL war gegenüber My<sup>-</sup> ALL auch innerhalb der Risikozweige (Low Risk bzw. High Risk) nicht signifikant unterschiedlich (pEFS nach 6 Jahren; Low Risk: My<sup>+</sup> ALL 89,4%±7,0% vs. My<sup>-</sup> ALL 87,1%±5,3%, High Risk: My<sup>+</sup> ALL 70,1%±8,8% vs. My<sup>-</sup> ALL 76,2%±7,8%).

Die Untersuchung der myeloischen Antigene im Einzelnen ließ keine Unterschiede bezüglich der pEFS im Vergleich zu Patienten mit My<sup>-</sup> ALL erkennen. My<sup>-</sup> ALL überlebten ereignisfrei mit einer pEFS von 82,4%±4,6% gegenüber CD11<sup>+</sup>-positiven Fällen (n=7; 100%±0%), 78,5%±7,7% bei CD13-positiven Fällen (n=28), 85,7%±9,3% bei CD15-positiven (n=14) und 71,4%±9,8 bei CD33-positiven ALL (n=33). Hier muss erwähnt werden, dass die Antigene koinzident exprimiert wurden, so dass Überschneidungen bei den Patientengruppen vorkamen. Die Abbildung 3-6 zeigt den Vergleich zwischen CD15-positiven Fällen und der Patientengruppe ohne Koexpression myeloischer Marker exemplarisch für alle anderen untersuchten myeloischen Antigene.

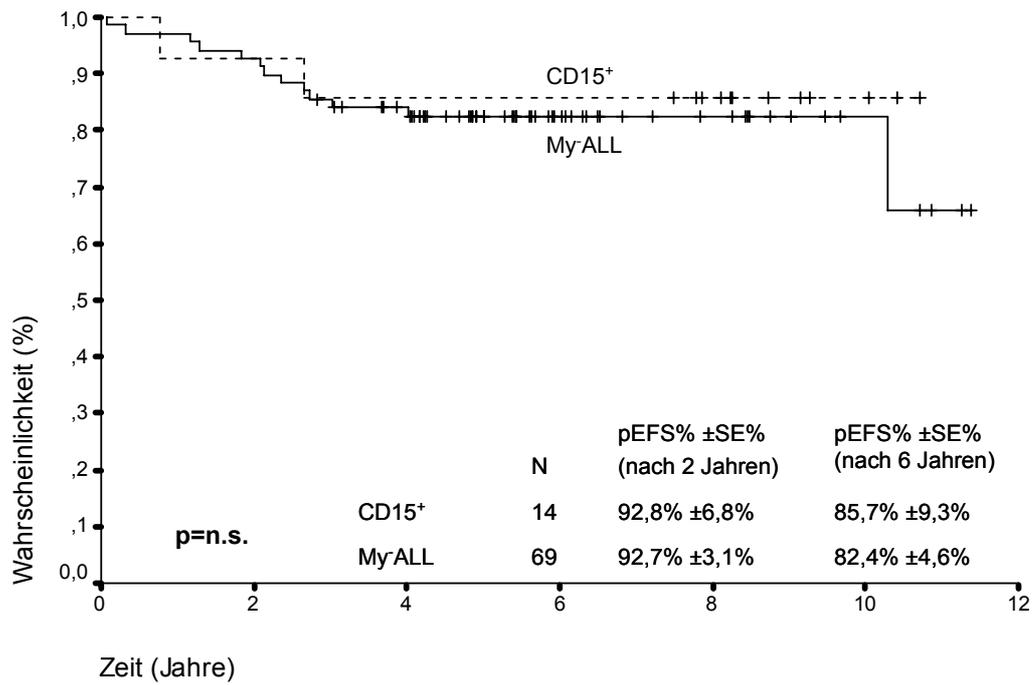
Die Anzahl gleichzeitig koexprimierter myeloischer Antigene auf den Lymphoblasten war nicht mit dem Therapieergebnis assoziiert. Patienten mit Koexpression eines myeloischen Antigens (n=25) überlebten mit einer pEFS von 76%±9% nach 6 Jahren im Vergleich zu Patienten mit zwei Antigenen (81%±10%, n=16) bzw. drei Antigenen (80%±18%, n=5).



**Abbildung 3-4:** Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Koexpression myeloischer Antigene. (A): Untersuchungskollektiv (n=115), (B): Patienten mit B-Vorläuferzell-ALL (n=106)



**Abbildung 3-5:** Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens in Abhängigkeit von der Koexpression myeloischer Antigene bei Niedrigrisiko- (A) und Hochrisikopatienten (B).



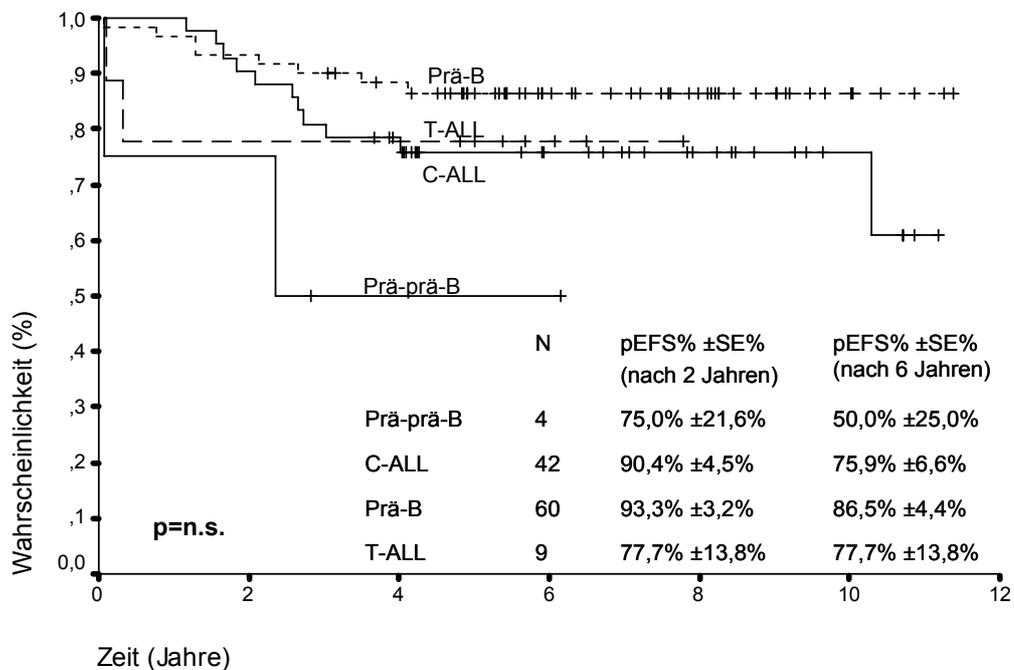
**Abbildung 3-6:** Bedeutung der Expression von CD15 im Vergleich zur Patientengruppe ohne Koexpression myeloischer Antigene.

### 3.3.3 Prognostische Bedeutung des immunologischen Subtyps

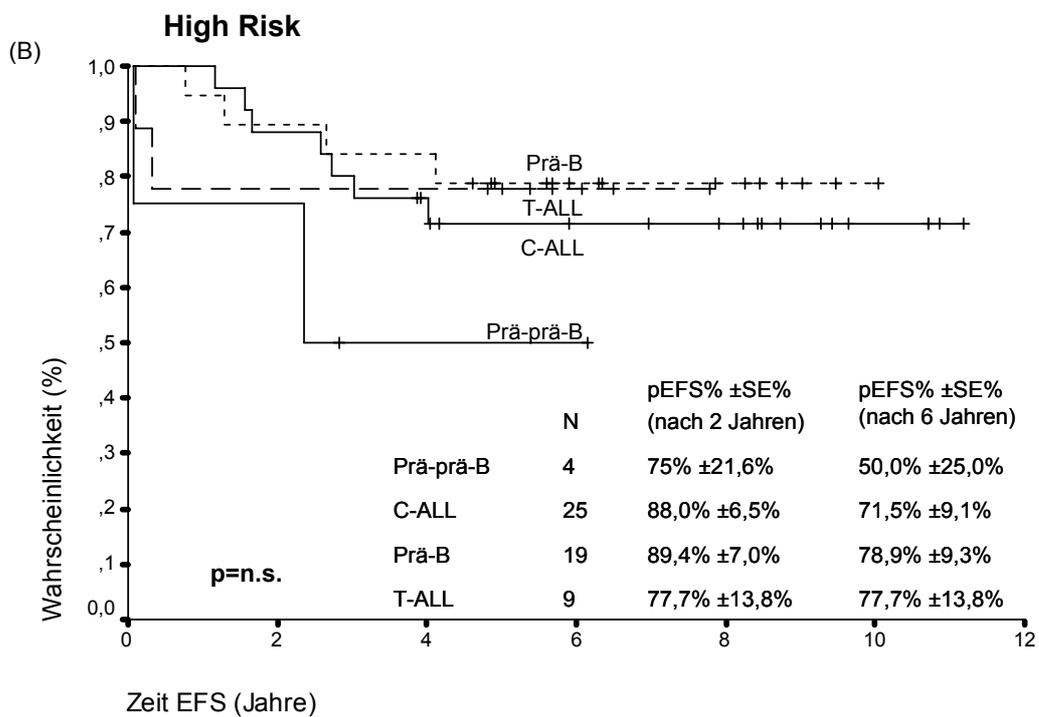
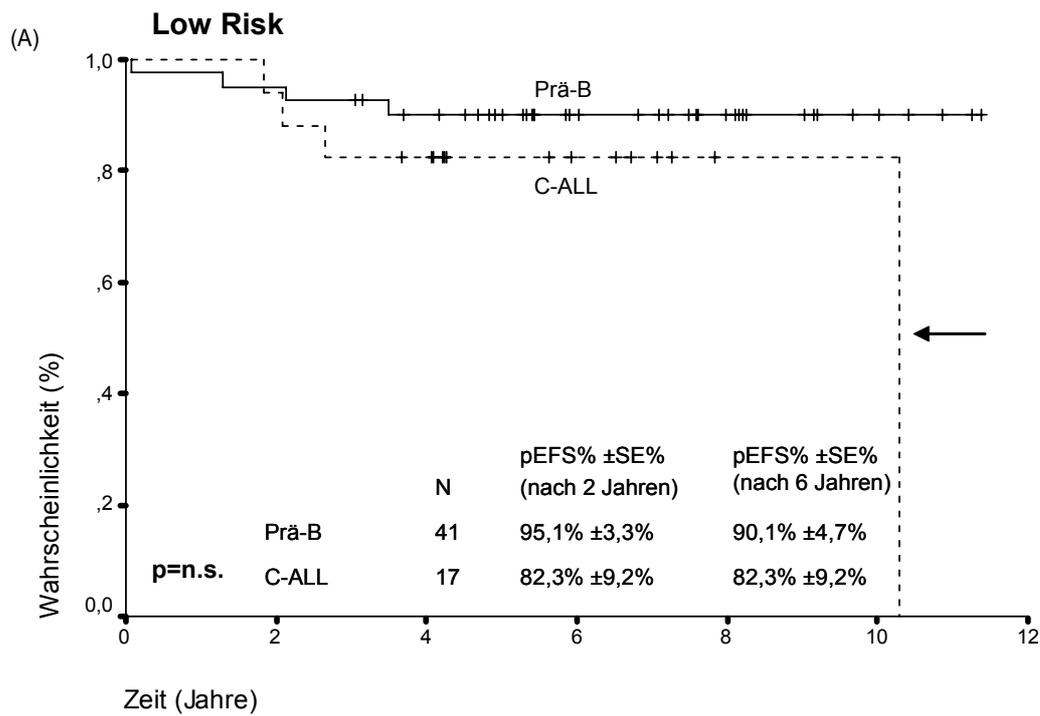
Um die prognostische Bedeutung des Immunphänotyps zu überprüfen, wurden die Subtypen bezüglich des ereignisfreien Überlebens miteinander verglichen. Patienten mit Prä-B-ALL hatten das beste Therapieresultat mit einer pEFS von  $86,5\% \pm 4,4\%$ , gegenüber C-ALL  $75\% \pm 6,6\%$  bzw. T-ALL  $77,7\% \pm 13,8\%$ . Patienten mit Prä-Prä-B-ALL überlebten ereignisfrei mit einer pEFS von lediglich  $50\% \pm 25\%$ .

Bei Betrachtung der Kurvenverläufe fielen Unterschiede im zeitlichen Verlauf des Auftretens von Ereignissen auf. Sowohl bei Patienten mit Prä-B-ALL, als auch bei Patienten mit C-ALL war das Plateau der Überlebenskurven erst nach 4 Jahren erreicht, wohingegen die Ereignisse bei Patienten mit Prä-prä-B-ALL oder T-ALL innerhalb der ersten 2½ Jahre eintraten.

Um den Einfluss der High-Risk-Patienten abschätzen zu können wurde das Untersuchungskollektiv getrennt und innerhalb der Risikogruppen untersucht (Abbildung 3-8). Die Low-Risk-Gruppe besteht per Definition nur aus Patienten mit Prä-B-ALL bzw C-ALL. Hier waren die Verhältnisse zwischen C-ALL und Prä-B-ALL ähnlich wie in der Betrachtung des gesamten Untersuchungskollektivs. Patienten mit Prä-B-ALL ( $90,1\% \pm 4,7\%$ ) hatten ein günstigeres Therapieergebnis als C-ALL ( $82,3\% \pm 19,2\%$ ) ( $p=n.s.$ )



**Abbildung 3-7:** Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens (pEFS) in Abhängigkeit vom immunologischen Subtyp.



**Abbildung 3-8:** Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens in Abhängigkeit vom Subtyp innerhalb der Risikozweige. Der Pfeil in Abbildung (A) markiert den in der Patientengruppe mit C-ALL letzten beobachteten Patienten (Spätrezidiv).

### 3.3.4 Prognostische Bedeutung weiterer klinischer und labordiagnostischer Parameter

Im Folgenden sollte die prognostische Bedeutung weiterer, initial erhobener Befunde überprüft werden. Dazu wurden die nach den in Kapitel (2.5.1) genannten Kriterien eingeteilten Patientengruppen bezüglich des ereignisfreien Überlebens miteinander verglichen.

Dabei waren bezüglich des initialen LDH-Wertes (<350U/l vs. 350-600U/l vs. >600U/l;  $p < 0.001$ ) und der initialen Leukozytenzahl (<25.000n/ $\mu$ l vs.  $\geq 25.000$ n/ $\mu$ l;  $p < 0.05$ ) signifikante Unterschiede zu beobachten. Bei den übrigen Merkmalen bestanden keine statistisch relevanten Beziehungen (Tabelle 3-9).

Patienten mit den höchsten LDH-Werten (>600U/l; pEFS 60,5% $\pm$ 7,9%) hatten das schlechteste Therapieergebnis im Vergleich zu Patienten mit mittleren (350 - 600U/l; pEFS 86,3% $\pm$ 5,7%) bzw. niedrigen Werten (<350U/l; pEFS 97,1% $\pm$ 2,8%)( $p < 0.001$ ).

Patienten mit Leukozytenzahlen <25.000 (n/ $\mu$ l) überlebten mit einer pEFS von 86,6% $\pm$ 3,9% gegenüber der Gruppe mit hohen Leukozytenzahlen, die eine pEFS von lediglich 69,5% $\pm$ 12,8% aufwiesen ( $p < 0.05$ ).

Aufgrund des hohen Anteils an Hochrisikopatienten in der Gruppe mit LDH-Werten >600U/l (n=27) und dem zuvor beobachteten Zusammenhang zwischen LDH und Leukozytenzahl sollten Niedrigrisikopatienten von Hochrisikopatienten getrennt bezüglich des initialen LDH-Wertes untersucht werden (Abbildung 3-9).

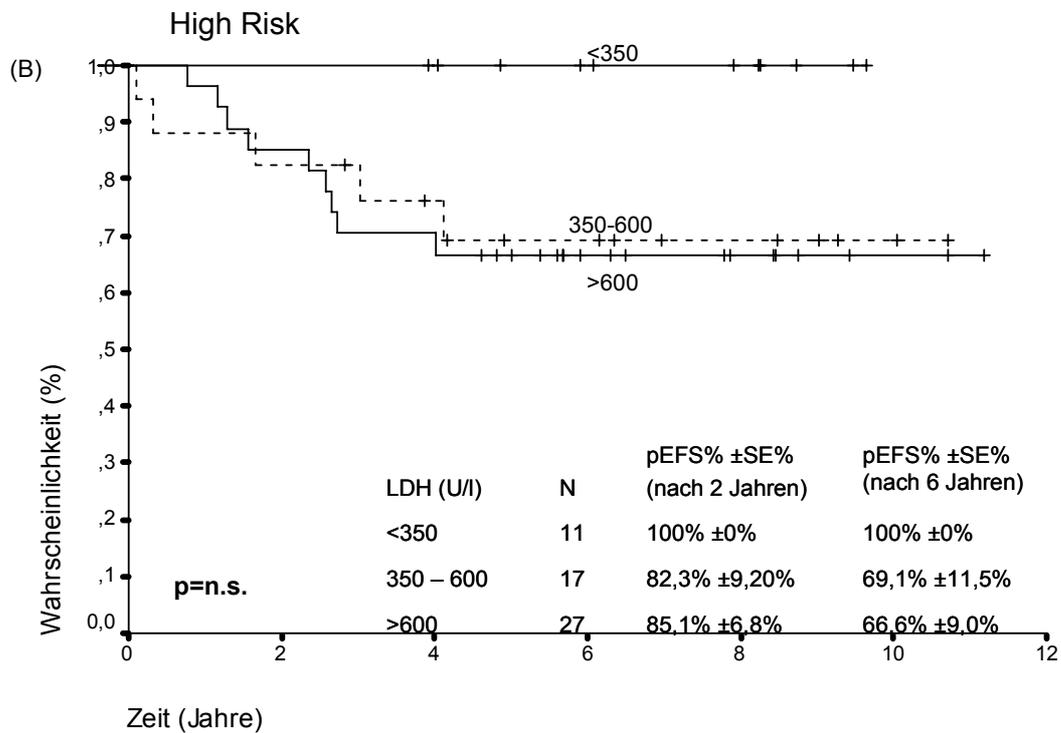
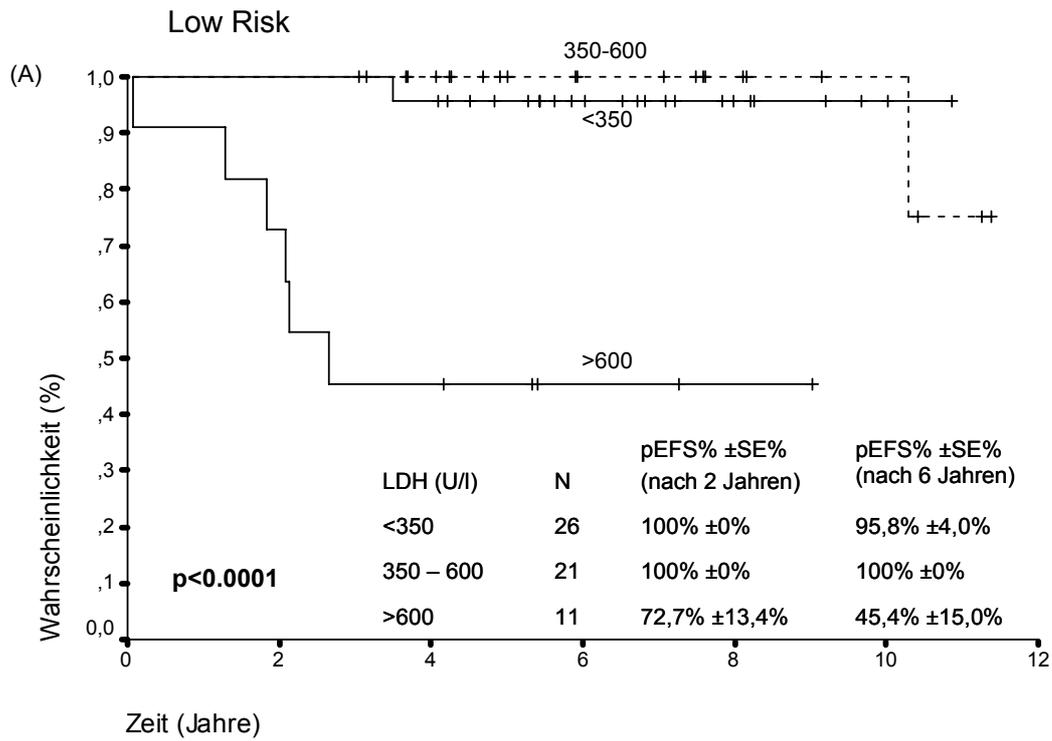
Innerhalb der Niedrigrisikogruppe zeigten Patienten mit den höchsten LDH-Werten wiederum das ungünstigste Therapieergebnis (>600U/l; pEFS 45,4% $\pm$ 15%). Demgegenüber hatten Patienten mit mittleren (350-600U/l; pEFS 100% $\pm$ 0%) bzw. niedrigen Werten (<350U/l; pEFS 95,8% $\pm$ 4,0%) ein ausgesprochen gutes Auskommen nach 6 Jahren ( $p < 0.0001$ ).

Bei Hochrisikopatienten gingen hohe LDH-Werte ebenfalls mit einer niedrigeren Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens einher (>600U/l; pEFS 66% $\pm$ 9,0% vs. 350-600U/l; pEFS 69,1% $\pm$ 11,5% vs. <350U/l; pEFS 100% $\pm$ 0%), jedoch war der Unterschied hier nicht signifikant.

Eine Charakterisierung der Patienten mit hohen LDH-Werten bezüglich labordiagnostischer und klinischer Befunde innerhalb der Risikogruppen sollte Aufschluss über mögliche Zusammenhänge geben und ist in Tabelle 3-10 für Niedrigrisikopatienten und Tabelle 3-11 für Hochrisikopatienten aufgeführt.

Innerhalb der Gruppe der Niedrigrisikopatienten hatten Patienten mit LDH-Werten >600U/l im Median die höchste Leukozytenzahl (8.200; 2.600-16.200), wobei der Unterschied zu den Patientengruppen mit niedrigeren LDH-Werten relativ gering ausfiel und statistisch nicht signifikant war. Darüber hinaus waren keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Immunphänotyps, weiterer labordiagnostischer Parameter oder klinischer Befunde zwischen den Patientengruppen feststellbar.

Innerhalb der Hochrisikogruppe bestanden zwischen den Patientengruppen gleichfalls zu keinem Merkmal signifikante Unterschiede. Ein Unterschied zwischen den medianen Leukozytenzahlen war in der Hochrisikogruppe deutlicher. Patienten mit LDH-Werten <350U/l hatten im Median 28.000n/μl Leukozyten gegenüber 42.000n/μl in der Gruppe mit mittleren LDH-Werten bzw. 44.000n/μl in der Gruppe mit LDH-Werten >600U/l. Die immunologischen Subtypen waren nicht signifikant unterschiedlich verteilt. Patienten mit Prä-prä-B-ALL bzw. T-ALL waren, unter Berücksichtigung der geringen Fallzahlen, häufiger in den Patientengruppen mit mittleren bzw. hohen Werten der initialen LDH anzutreffen.



**Abbildung 3-9:** Ereignisfreies Überleben in Abhängigkeit vom initialen LDH-Wert nach Risikogruppen stratifiziert.

**Tabelle 3-9: Prognostische Bedeutung biologischer, hämatologischer und klinisch-chemischer Parameter**

<b>Merkmal</b>		<b>n=115</b>	<b>pEFS%±SE% (nach 2 Jahren)</b>	<b>pEFS%±SE% (nach 6 Jahren)</b>	<b>p=</b>
<b>Geschlecht</b>	m	65	87,6±4,0	78,4±5,1	n.s.
	w	50	94,0±3,3	83,7±5,2	
<b>Alter bei Diagnose</b>	1-9	90	93,3±2,6	84,4±3,8	n.s. <sup>(1)</sup>
	>10	25	80,0±8,0	66,7±9,6	
<b>Leukozyten (n/µl)</b>	<25.000	75	92,0±3,1	86,6±3,9	<0.05
	>25.000	40	87,5±5,2	69,5±7,3	
<b>Immunphänotyp</b>	Prä-B o. C-ALL	102	92,1±2,6	82,1±3,8	n.s.
	T-ALL o. Prä-prä-B	13	76,9±11,6	69,2±12,8	
<b>Hämoglobin (g/dl)</b>	<6,5	37	94,5±3,7	80,6±6,6	n.s.
	6,5-8,6	39	87,1±5,3	84,6±5,7	
	>8,6	39	89,7±4,8	76,7±6,8	
<b>Thrombozyten (n/µl)</b>	<24.000	38	86,8±5,4	78,9±6,6	n.s.
	24.000-70.000	39	92,3±4,2	81,9±6,1	
	>70.000	38	92,1±4,3	80,9±6,5	
<b>Harnsäure (mg%)(<sup>2</sup>)</b>	<4,2	38	94,7±3,6	84,2±5,9	n.s.
	4,2-5,8	37	86,4±5,6	78,0±6,8	
	>5,8	38	92,1±4,3	81,2±6,4	
<b>LDH (U/l)(<sup>2</sup>)</b>	<350	37	100%	97,1±2,8	<0.001
	350-600	38	92,1±4,3	86,3±5,7	
	>600	38	81,5±6,2	60,5±7,9	

<sup>(1)</sup> p=0.05; <sup>(2)</sup> Werte nicht bei allen Patienten verfügbar

**Tabelle 3-10: Patientencharakteristika in Abhängigkeit zum initialen LDH-Wert bei Niedrigrisikopatienten (Low Risk, n=58)**

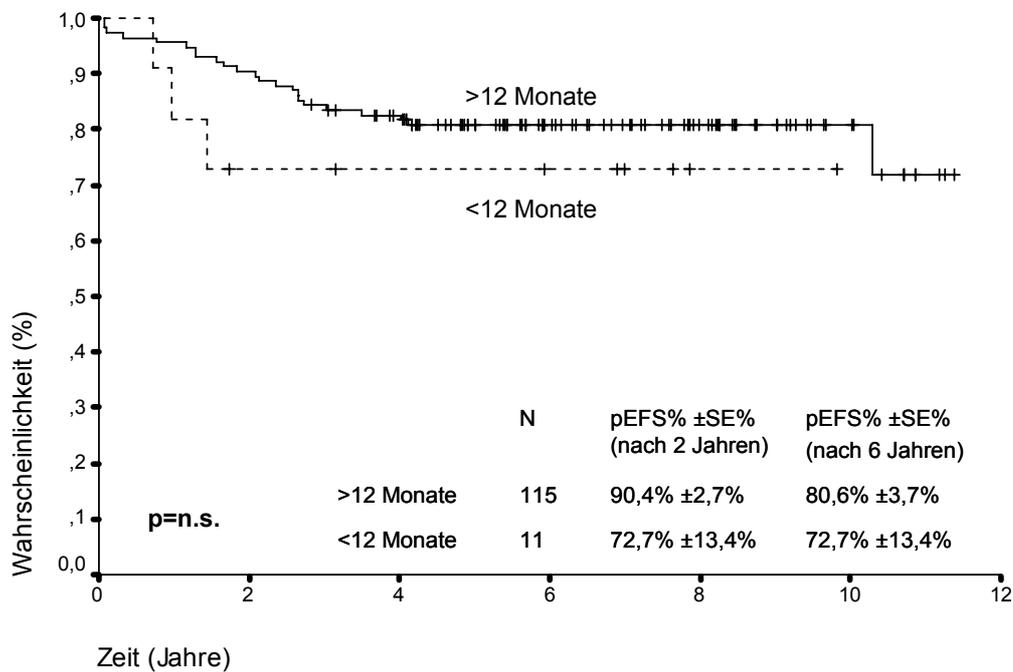
Low Risk (n=58)	n	LDH			p=
		<350 n=26	350 - 600 n=21	>600 n=11	
<b>Alter bei Diagnose</b> (Median u. Bereich)		3,2 (1,2 - 7,8)	4,3 (1,5 - 10,5)	4,9 (2,6 - 7,6)	n.s.
<b>Immunphänotyp</b>					n.s.
Prä-B-ALL	41	20 (76,9%)	14 (66,7%)	7 (63,4%)	
C-ALL	17	6 (23,1%)	7 (33,3%)	4 (36,4%)	
<b>Labor</b> (Median u. Bereich)					
Leukozyten (n/µl)		5.050 (1.200-19.500)	3.500 (1.100-24.700)	8.200 (2.600-16.200)	n.s.
Harnsäure (mg%)		4,5 (1,6-8,2)	4,5 (1,6-6,8)	5,4 (2,9-6,7)	n.s.
Hb (g/dl)		7,1 (2,7-10,6)	6,8 (4,5-13,0)	6,5 (4,2-9,2)	n.s.
Thrombozyten (n/µl)		37.000 (11.000-285.000)	29.000 (5.000-842.000)	53.000 (14.000-194.000)	n.s.
<b>Klinik</b>					
Lebergröße (>4cm)	5	3 (11,5%)	0 (0%)	2 (18,2%)	n.s.
Milzgröße (>4cm)	6	3 (11,5%)	1 (4,8%)	2 (18,2%)	n.s.
Lymphknoten (palp.)	26	14 (53,8%)	9 (42,9%)	3 (27,3%)	n.s.
Hepatomegalie (Sono)	30	15 (57,7%)	11(52,4%)	4 (36,4%)	n.s.
Splenomegalie (Sono)	37	17 (65,4%)	12 (57,1%)	8 (72,7%)	n.s.
Lymphome (Bildgebung)	2	2 (7,7%)	0 (0%)	0 (0%)	n.s.

**Tabelle 3-11: Patientencharakteristika in Abhängigkeit zum initialen LDH-Wert bei Hochrisikopatienten (High Risk, n=55)**

High Risk (n=55) <sup>(1)</sup>	n	LDH			p=
		<350 n=11 (%)	350 - 600 n=17 (%)	>600 n=27 (%)	
<b>Alter bei Diagnose</b> (Median u. Bereich)		10,5 (2,3 - 15,8)	4,7 (1,3 - 16,6)	8,5 (2,0 - 16,1)	n.s.
<b>Immunphänotyp</b>					n.s.
Prä-prä-B	3		2 (11,7%)	1 (3,7%)	
C-ALL	24	6 (54,5%)	8 (47,1%)	10 (37,0%)	
Prä-B	19	4 (36,4%)	5 (29,4%)	10 (37,0%)	
T-ALL	9	1(9,1%)	2 (11,8%)	6 (22,2%)	
<b>Labor</b> (Median u. Bereich)					
Leukozyten (n/µl)		28.600 (1.300-83.000)	42.600 (4.100-175.000)	44.000 (800-1.258.000)	n.s.
Harnsäure (mg%)		4,6 (2,5-6,4)	5,6 (2,1-7,5)	5,7 (3,2-13,0)	n.s. <sup>(2)</sup>
Hb (g/dl)		7,0 (4,5-12,7)	8,1 (4,3-12,0)	8,8 (4,6-14,7)	n.s.
Thrombozyten (n/µl)		62.000 (7.000-240.000)	50.000 (9.000-202.000)	30.000 (5.000-173.000)	n.s.
<b>Klinik</b>					
Lebergröße (>4cm)	11	2 (18,2%)	2 (11,7%)	7 (25,9%)	n.s.
Milzgröße (>4cm)	13	2 (18,2%)	4 (23,5%)	7 (25,9%)	n.s.
Lymphknoten (palp.)	30	7 (63,6%)	7 (41,2%)	16 (59,3%)	n.s.
Hepatomegalie (Sono)	35	7 (63,6%)	10 (58,8%)	18 (66,7%)	n.s.
Splenomegalie (Sono)	45	10 (90,9%)	11 (64,7%)	24 (88,9%)	n.s.
Lymphome (Bildgebung)	9	1 (9,1%)	3 (17,6%)	5 (18,5%)	n.s.

<sup>(1)</sup> LDH-Wert bei 2 Patienten nicht verfügbar<sup>(2)</sup> p=0.05

### 3.3.5 Säuglinge



**Abbildung 3-10:** Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens der Patienten im ersten Lebensjahr (n=11) im Vergleich zu älteren Patienten (n=115).

Der Altersmedian der Patienten im ersten Lebensjahr (n=11) lag bei 0,5 (0,0 - 0,9) Jahren. Im ersten Lebenshalbjahr befanden sich 4 Patienten. Säuglinge waren hinsichtlich der Verteilung der immunologischen Subtypen in 6 (54,5%) von 11 Fällen Prä-prä-B-ALL, 3 (27,3%) waren Prä-B und 2 (18,2%) C-ALL. Von 11 Patienten waren 5 (45,5%) My<sup>+</sup> ALL. Von diesen 5 Patienten mit Koexpression myeloischer Antigene waren 4 Prä-prä-B und 1 Patient C-ALL. Die einzelnen koexprimierten myeloischen Antigene waren in 2 Fällen CD13, in 3 Fällen CD15 und in einem Fall CD33.

Die Behandlung der Säuglinge erfolgte für 10 Patienten nach dem Protokoll NHL-BFM-90 und für einen Patienten nach NHL-BFM-95. Einer Knochenmarktransplantation sind 4 (36,4%) Patienten in der Gruppe der Säuglinge zugeführt worden. Im Kollektiv >12 Monate waren es 8 (7%) Patienten (p=0.01). Das ereignisfreie Überleben nach 6 Jahren lag bei 72,7%±13,4% und war im Vergleich zu älteren Patienten (80,6%±3,7%) nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 3-10).

## 4 Diskussion

Die Prognose von Kindern mit akuter lymphoblastischer Leukämie hat sich in den letzten Jahrzehnten deutlich steigern lassen. Heutzutage lassen sich bei Patienten mit ALL Heilungsraten von über 80 % erreichen (Creutzig et al. 2003). Die Hauptgründe für diese Entwicklung sind in der Entwicklung moderner Kombinationschemotherapie, der Prävention der Leukämie des Zentralnervensystems und der risikoadaptierten Therapie in Abhängigkeit von Prognosefaktoren zu sehen (Felix et al. 2000).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war zum einen die Evaluation der klinischen und prognostischen Relevanz der, im Rahmen der initialen Immunphänotypisierung erhobenen Befunde bezüglich des immunologischen Subtyps und der Koexpression myeloischer Antigene vor dem Hintergrund gegenwärtiger intensiver Chemotherapie. Darüberhinaus sollte die prognostische Bedeutung prätherapeutisch erhobener Laborparameter überprüft und angeregt durch die Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen insbesondere die Laktatdehydrogenase zum Diagnosezeitpunkt auf deren mögliche prognostische Relevanz untersucht werden. Im Folgenden werden die Einzelergebnisse mit denen anderer Autoren verglichen.

### 4.1 Koexpression myeloischer Antigene

Die gleichzeitige Expression der mit der myeloischen Zellreihe assoziierten Antigene auf ansonsten typischen Lymphoblasten wird seit langem beobachtet (Smith et al. 1983; Mirro et al. 1985).

Bei pädiatrischen Patienten variieren die Angaben zur Häufigkeit der Koexpression myeloischer Antigene in der Literatur zwischen 4,3% (Cantu-Rajoldi et al. 1991) und 32% (Putti et al. 1998).

Nach den vorliegenden Ergebnissen waren 46 (40%) von 115 Patienten positiv für mindestens eines der myeloischen Antigene CD11b, CD13, CD15 oder CD33. Damit liegt die ermittelte Inzidenz höher, als in früheren Untersuchungen. Ein Vergleich der Methodik zum Nachweis der Koexpression liefert eine mögliche Erklärung. Der Nachweis der Koexpression myeloischer Antigene wurde bei einigen Autoren vorangegangener Berichte ebenfalls mit Hilfe von Doppelfärbungen gesichert (Pui et al. 1990a; Wiersma et al. 1991; Ludwig et al. 1994a), jedoch unter überwiegender Verwendung der Immunfluoreszenztechnik mit indirekt konjugierten Antikörpern (Pui et al. 1990a; Cantu-Rajoldi et

al. 1991; Wiersma et al. 1991; Fink et al. 1993). Die Entwicklung moderner Durchflusszytometer mit der Möglichkeit zur Messung größerer Zellzahlen sowie Reagenzien, wie direkt konjugierte monoklonale Antikörper, haben zu einer Sensitivitätszunahme der Methode geführt. Diese Vermutung wird auch von anderen Autoren geäußert (Pui et al. 1998; Putti et al. 1998). Bei dem Untersuchungsmaterial der in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurden stets Doppel- bzw. Dreifachmarkierungen vorgenommen, was eine eindeutige Zuordnung der Antigenexpression zur entsprechenden Zelllinie ermöglichte. Darüberhinaus wurde eine unspezifische Antikörperbindung bei allen Patienten durch Negativkontrollen ausgeschlossen.

Drexler et al. konnten in einer Auswertung früherer Untersuchungen beobachten, dass die Angaben zu den Inzidenzen der einzelnen koexprimierten myeloischen Antigene in zahlreichen Studien ähnlich sind (Drexler und Ludwig 1993).

In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass CD13 und CD33 sowohl einzeln, als auch in Kombination die häufigsten koexprimierten Antigene sind (Pui et al. 1998; Putti et al. 1998).

In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung wurden den vorliegenden Ergebnissen zufolge die Antigene CD13 (24,3%) und CD33 (18,3%), sowohl einzeln, als auch in Kombination als häufigste Antigene nachgewiesen. CD11b exprimierten lediglich 6,1% und CD15 12,2% der Patienten.

Putti et al. berichten in einer Untersuchung an 908 pädiatrischen Patienten mit neudagnostizierter ALL von einer gleichmäßigen Verteilung der Koexpression bezogen auf die immunologischen Subtypen, sowohl zwischen B-Vorläuferzell-ALL und T-ALL, als auch innerhalb der Subgruppen der B-Vorläuferzell-ALL (Putti et al. 1998). Andere Untersucher fanden eine überdurchschnittliche Häufung in der Gruppe der Patienten mit Prä-prä-B-ALL (Ludwig et al. 1994a).

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen unter Berücksichtigung der kleinen Fallzahl eine tendenzielle Bevorzugung des Prä-prä-B-Phänotyps innerhalb der Gruppe der Patienten im ersten Lebensjahr. Insgesamt 5 von 11 Patienten im ersten Lebensjahr koexprimierten myeloische Antigene. Von diesen waren 4 Fälle Prä-prä-B-ALL. In der Gruppe der älteren Patienten zeigte sich eine Bevorzugung des Prä-B-Phänotyps. Bei Patienten mit T-ALL exprimierten lediglich 2 von 9 Patienten myeloische Antigene.

Patienten mit myeloischer Koexpression wurden mit Patienten ohne Koexpression bezüglich prätherapeutisch erhobener Befunde verglichen. Die Ergebnisse konnten zeigen, dass sich My<sup>+</sup> ALL von My<sup>-</sup> ALL in keinem untersuchten Merkmal signifikant unterscheiden. Bezogen auf die Medianwerte hämatologischer bzw. klinisch-chemischer Parameter konnte kein relevanter Unterschied zwischen My<sup>+</sup> ALL und My<sup>-</sup> ALL beobachtet werden. Eine Tendenz zu insgesamt niedrigeren Werten bezüglich der Laborparameter war, wenn auch schwach ausgeprägt, erkennbar.

Vor dem Hintergrund einer möglichen Assoziation mit allgemein anerkannten ungünstigen Prognosefaktoren (Janka-Schaub et al. 1999) wurden Patienten mit My<sup>+</sup> ALL bezogen auf die Verteilung innerhalb von Risikogruppen miteinander verglichen. Dabei interessierte insbesondere das Lebensalter zum Zeitpunkt der Diagnose (>10 Jahre), die initiale Leukozytenzahl (>25.000/ $\mu$ l) und der immunologische Subtyp (T-ALL oder Prä-prä-B). Auch hier war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen auszumachen.

Über die prognostische Bedeutung der Koexpression bestehen in der Literatur gegensätzliche Meinungen. In früheren Untersuchungen konnte die Koexpression myeloischer Antigene als ein ungünstiger Prognosefaktor identifiziert werden. Wiersma et al. konnten anhand einer Untersuchung von 236 risikoadaptiert behandelten pädiatrischen Patienten zeigen, dass 53 Patienten mit My<sup>+</sup> ALL ein signifikant schlechteres Therapieergebnis aufwiesen als 183 Patienten mit My<sup>-</sup> ALL (pEFS nach 3 Jahren 39% $\pm$ 13 vs. 78% $\pm$ 5). In der Gruppe der Patienten mit Leukozytenzahlen <50.000/ $\mu$ l überlebten My<sup>-</sup> ALL mit einer Wahrscheinlichkeit von 84% ereignisfrei gegenüber My<sup>+</sup> ALL mit 47%, in der Gruppe der Patienten mit Leukozytenzahlen  $\geq$ 50.000/ $\mu$ l war die pEFS 57% bei My<sup>-</sup> ALL gegenüber 26% bei My<sup>+</sup> ALL. Die Untersucher konnten keine Abhängigkeit der Koexpression myeloischer Antigene zu bestehenden Prognosefaktoren beobachten. In der multivariaten Analyse zeigte sich die Koexpression als stärkster unabhängiger Prognosefaktor. (Wiersma et al. 1991). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Untersuchungen (Cantu-Rajnoldi et al. 1991; Kurec et al. 1991; Fink et al. 1993).

Demgegenüber haben zahlreiche Untersuchungen in der Folgezeit nicht bestätigen können, dass die Koexpression myeloischer Antigene mit ungünstigen Therapieergebnissen assoziiert ist (Bradstock et al. 1989; Ludwig et al. 1990; Pui et al. 1990a; Uckun et al. 1997; Pui et al. 1998; Putti et al. 1998).

In der Untersuchung von Putti et al. hatten 291 Patienten mit My<sup>+</sup> ALL eine pEFS von 69% gegenüber 617 Patienten mit My<sup>-</sup> ALL und einer pEFS von 65,3% nach 6 Jahren. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant.

Die vorliegenden Ergebnisse stützen diese Beobachtung. Die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens war für My<sup>+</sup> ALL und My<sup>-</sup> ALL vergleichbar (78,2%±6,1% vs. 82,4±4,6%), sowohl bei Betrachtung des gesamten Patientenkollektivs, als auch bei getrennter Betrachtung der Niedrig- bzw. Hochrisikopatienten.

Uckun et. al. untersuchten Patienten mit B-Vorläuferzell-ALL und T-Vorläuferzell-ALL getrennt voneinander ohne einen negativen Einfluss der myeloischen Koexpression beobachten zu können (Uckun et al. 1997). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen innerhalb der Patienten mit BL ähnliche Resultate.

Die Beobachtung einer früheren Untersuchung (Lenkei et al. 1991), nach der die Expression von CD15 bei Patienten mit B-Vorläuferzell-ALL mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist, kann mit den Ergebnissen nicht bestätigt werden.

Die Koexpression myeloischer Antigene auf lymphatischen Blasten hat nach den eigenen Untersuchungen im Rahmen intensiver Chemotherapie keine prognostische Bedeutung und sollte nicht zur Risikostratifizierung herangezogen werden. Jedoch erweist sich die Untersuchung der Koexpression myeloischer Antigene im Rahmen des Nachweises minimaler Restzellerkrankung (Campana und Pui 1995) als nützlich für die Verlaufsbeobachtung der Leukämie.

## **4.2 Immunologischer Subtyp**

Der Vergleich der immunologischen Subtypen bezüglich prätherapeutisch erhobener klinischer, hämatologischer und klinisch-chemischer Parameter bestätigt die in früheren Untersuchungen häufig festgestellten Unterschiede. Ludwig et al. konnten in einer Untersuchung an 1156 Protokollpatienten der ALL-BFM Studien 83 und 86 zeigen, dass Patienten mit T-ALL bzw. Prä-prä-B-ALL durch höhere Leukozytenzahlen und häufiger extramedulläre Organbeteiligung, als auch ZNS-Befall gekennzeichnet waren, im Gegensatz zu Patienten mit common-ALL bzw. Prä-B-ALL. Patienten mit T-ALL waren häufiger männlichen Geschlechts und der Nachweis eines Thymustumors war mit diesem Immunphänotyp signifikant häufiger assoziiert (Ludwig et al. 1990).

In Übereinstimmung damit waren Patienten mit T-ALL in den vorliegenden Ergebnissen durch eine Bevorzugung des männlichen Geschlechts, höheres medianes Lebensalter, häufiger diagnostizierte Mediastinaltumoren, höhere initiale Leukozytenzahlen und häufiger durch extramedulläre Organmanifestationen (Splenomegalie, Hepatomegalie, lokalisierte Lymphome und Lymphadenopathie) charakterisiert.

Patienten mit Prä-prä-B-ALL waren gekennzeichnet durch im Median hohe Leukozytenzahlen und zusammen mit Patienten mit T-ALL durch die höchsten Medianwerte bezüglich der Aktivität der Laktatdehydrogenase. Tastbare Leber- bzw. Milzvergrößerungen kamen ebenfalls, sowohl bei Patienten mit T-ALL, als auch Patienten mit Prä-prä-B-ALL prozentual häufiger vor.

Vorangegangene Untersuchungen haben verdeutlicht, dass der Immunphänotyp einen bedeutenden prognostischen Faktor darstellt (Crist et al. 1984; Crist et al. 1989). Es konnte demgegenüber gezeigt werden, dass der prognostische Einfluss des Immunphänotyps entscheidend von der Qualität der verabreichten Therapie abhängt und unter Umständen seine prognostische Bedeutung verliert (Gaynon et al. 1988). Crist et al. konnten in einer früheren Untersuchung an Patienten mit B-Vorläuferzell-ALL signifikant schlechtere Therapieergebnisse bei Patienten mit Prä-B-ALL gegenüber Patienten mit common-ALL beobachten können (Crist et al. 1989). Ludwig et. al. konnten anhand der Auswertung der BFM Studie 86 keine Assoziation des Prä-B-Phänotyps mit schlechteren Therapieergebnissen gegenüber common-ALL herstellen (Ludwig et al. 1993). Die vorliegenden Ergebnisse stützen diese Feststellung mit der Beobachtung, dass Patienten mit Prä-B-ALL sowohl bei Betrachtung des Gesamtkollektivs, als auch der getrennten Betrachtung innerhalb der Risikogruppen des Therapieprotokolls die günstigsten Therapieresultate verglichen mit allen anderen Subtypen erzielten.

In der Studie ALL-BFM 86 wiesen Patienten mit Prä-prä-B-ALL signifikant schlechtere Therapieergebnisse verglichen mit Patienten mit C-ALL bzw. Prä-B-ALL auf (Ludwig et al. 1993). Die Autoren führten diesen Unterschied auf die enge Korrelation des Prä-prä-B Immunphänotyps mit ungünstigen Faktoren, wie Chromosomenanomalien und ungünstigen klinischen Parametern, wie hohe Leukozytenzahlen und niedriges Lebensalter zurück. Aufgrund der kleinen Fallzahl in der Gruppe der Patienten mit Prä-prä-B-ALL kann das ungünstige Therapieresultat (pEFS 50%±25%) nach 6 Jahren in der vorliegenden Untersuchung die Ergebnisse von Ludwig et al. lediglich unter Vorbehalt bestätigen (Ludwig et al. 1993).

Ludwig et al. (1990) beschreiben in einer Untersuchung Unterschiede im zeitlichen Auftreten von Rezidiven zwischen den Subtypen. Dabei brach die Rezidivkaskade für Patienten mit C-ALL erst nach 4½ Jahren ab, wohingegen bei T-ALL Rezidive überwiegend bereits nach 1½ Jahren auftraten. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen ähnliche Resultate. Sowohl bei Patienten mit C-ALL, als auch Patienten mit Prä-B-ALL war das Plateau der Überlebenskurven erst nach 4 Jahren erreicht, wohingegen die Ereignisse bei Patienten mit T-ALL bzw. Prä-B-ALL innerhalb der ersten 2½ Jahre eintraten (Ludwig et al. 1990). Patienten mit T-ALL hatten, entgegen früheren Berichten (Pui et al. 1993; Smith et al. 1996) mit einer pEFS von 77% nach 6 Jahren ein günstiges Therapieergebnis. Dieses Resultat steht, unter Berücksichtigung der kleinen Fallzahl, in Einklang mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen (Gaynon et al. 1988; Niehues et al. 1999).

### 4.3 Laktatdehydrogenase

Die Laktatdehydrogenase katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat und kommt in Form von fünf Isoenzymen im Zytoplasma aller Körperzellen vor. Erhöhungen der Gesamt-LDH werden bei zahlreichen pathologischen Zuständen beobachtet (Kornberg und Polliack 1980). Sowohl bei Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphom (Huijgen et al. 1997), als auch bei Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom (Aul et al. 1994; Wimala et al. 2001) konnte die Höhe der initial gemessenen Aktivität der Laktatdehydrogenase mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden. Die prognostische Bedeutung bei Kindern mit ALL ist bisher wenig untersucht.

Anhand der Auswertungen der dieser Arbeit zugrunde liegenden Patientendaten war die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens bei Patienten mit Werten >600 U/l gegenüber Patienten mit mittleren (350-600U/l) bzw. niedrigen (<350U/l) Werten signifikant erniedrigt (Tab. 3-9). In der Gruppe der Patienten mit Werten >600U/l war ein Überwiegen der Hochrisikopatienten mit einem Anteil von 71% festzustellen. Um deren mögliche Beeinflussung des Ergebnisses auszuschalten, wurden Niedrig- bzw. Hochrisikopatienten getrennt voneinander untersucht. In der Niedrigrisikogruppe erlitten 5 von 11 Patienten mit den höchsten LDH-Werten (>600U/l) innerhalb der ersten drei Jahre ein Rezidiv und ein Patient erreichte keine Vollremission nach der Induktionstherapie. Mit einer pEFS von lediglich 45,4%±15% war die Wahrscheinlichkeit, ereignisfrei zu überleben signifikant niedriger gegenüber Patienten mit mittleren (100%±0%) bzw. niedrigen Werten (95,8%±4,0%) (Abb. 3-9a). Im Kollektiv der Hochrisikopatienten waren die Unterschiede hinsichtlich der pEFS statistisch nicht signifikant, jedoch tendenziell erkennbar.

In der Gruppe mit den niedrigsten Werten der initialen LDH-Aktivität überlebten alle Patienten ereignisfrei. Die pEFS der Patientengruppen mit mittlerer und höchster initialer LDH-Aktivität war vergleichbar ( $69,1\% \pm 11,5\%$  bzw.  $66,6\% \pm 9,0\%$ ), lag jedoch deutlich unter derer der Gruppe mit den niedrigen Werten (Abb. 3-9b). Aus Gründen der statistischen Haltbarkeit der Ergebnisse sei an dieser Stelle auf die relativ geringe Fallzahl der entsprechenden Patientengruppen hingewiesen. Sowohl in der Patientengruppe mit der höchsten LDH-Aktivität innerhalb der Niedrigrisikogruppe, als auch der Patientengruppe mit der niedrigsten LDH-Aktivität in der Hochrisikogruppe befanden sich jeweils 11 Patienten.

Diese Ergebnisse sind in genereller Übereinstimmung mit denen einer vorangegangenen Untersuchung (Pui et al. 1985). Die Untersucher gruppierten das Patientenkollektiv von 293 pädiatrischen Patienten mit Standardrisiko willkürlich in drei Gruppen mit LDH-Werten  $<300$  U/l,  $300-1000$  U/l und  $>1000$  U/l. Dabei konnte gezeigt werden, dass Patienten mit den höchsten LDH-Werten signifikant schlechtere Therapieergebnisse gegenüber der Gruppe mit mittleren bzw. niedrigen LDH-Werten erzielten. Diese Beobachtung war innerhalb der Patientengruppe mit Leukozytenzahlen  $<25.000$  n/ $\mu$ l in ähnlicher Weise reproduzierbar.

In Übereinstimmung mit der Beobachtung anderer Untersucher (Suarez et al. 1984; Pui et al. 1985; Fanin et al. 1989) war die Höhe der initial gemessenen LDH-Aktivität unter Betrachtung des gesamten Untersuchungskollektivs ( $>12$  Monate) positiv mit der Höhe der initialen Leukozytenzahl korreliert (Abb. 3-2a) und im Median deutlich über der Norm erhöht (Kornberg und Polliack 1980). Innerhalb der Gruppe der Niedrigrisikopatienten bestand, im Gegensatz zur Gruppe der Hochrisikopatienten, jedoch keine statistisch signifikante Korrelation zwischen LDH-Aktivität und Leukozytenzahl (Daten nicht gezeigt).

Demgegenüber erbrachte die Patientencharakterisierung der Kategorien der LDH keine signifikanten Auffälligkeiten bezüglich der klinischen Präsentation, weder in der Niedrig- noch in der Hochrisikogruppe (Tab.3-10 u. 3-11). Es erscheint erwähnenswert, dass die Erkrankung bei Patienten mit den höchsten Werten der initialen LDH im Vergleich zu anderen Patienten hinsichtlich der extramedullären Ausbreitung einen ähnlich infiltrativen Charakter zeigte.

Es stellt sich die Frage, welchen Aussagewert die Laktatdehydrogenase in Abwesenheit hoher Leukozytenzahlen hat. Einerseits könnten hohe LDH-Werte durch einen gesteigerten Zellumsatz bedingt sein. Eine Alternative dazu ist die Annahme, dass die Höhe

der Aktivität der Laktatdehydrogenase ein genaueres Maß für die so genannte „Tumormasse“ darstellt, als die Leukozytenzahl alleine. Pui et al. konnten im Rahmen ihrer Untersuchung, im Gegensatz zur Leukozytenzahl, keinen Zusammenhang zwischen der Höhe der Laktatdehydrogenase und der Anzahl an Blasten im S-Phase-Zellzyklus herstellen (Pui et al. 1985). Mit den vorliegenden Ergebnissen kann zu diesem zellbiologischen Befund keine Stellung genommen werden.

Abseits der Ursächlichkeiten bleibt festzuhalten, dass eine Untergruppe der Niedrigrisikopatienten mit den höchsten LDH-Werten ungünstigere Therapieresultate erzielte, als die entsprechenden Hochrisikopatienten. Andererseits überlebten in der Hochrisikogruppe die Patienten mit den niedrigsten initialen Werten der LDH zwar nicht signifikant, jedoch deutlich erkennbar besser im Vergleich zu Patienten mit höheren Werten. Möglicherweise stellt die Laktatdehydrogenase ein nützliches Hilfsmittel bei der Bewertung des individuellen Patientenrisikos zum Diagnosezeitpunkt dar.

## 5 Literaturverzeichnis

Aul C, Gattermann N, Heyll A, Germing U, Derigs G, Schneider W (1992). Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system. *Leukemia* 6(1): 52-9.

Aul C, Gattermann N, Germing U, Runde V, Heyll A, Schneider W (1994). Risk assessment in primary myelodysplastic syndromes: validation of the Dusseldorf score. *Leukemia* 8(11): 1906-13.

Avet-Loiseau H, Mechinaud F, Harousseau JL (1995). Clonal hematologic disorders in Down syndrome. A review. *J Pediatr Hematol Oncol* 17(1): 19-24.

Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* 9(10): 1783-6.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* 33(4): 451-8.

Bradstock KF, Kirk J, Grimsley PG, Kabral A, Hughes WG (1989). Unusual immunophenotypes in acute leukaemias: incidence and clinical correlations. *Br J Haematol* 72(4): 512-8.

Campana D, Pui CH (1995). Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 85(6): 1416-34.

Cantu-Rajoldi A, Putti C, Saitta M, Granchi D, Foa R, Schiro R, Castagni M, Vallengio C, Jankovic M, Miniero R, Paolucci P, Basso G (1991). Co-expression of myeloid antigens in childhood acute lymphoblastic leukaemia: relationship with the stage of differentiation and clinical significance. *Br J Haematol* 79(1): 40-3.

Creutzig U, Henze G, Bielack S, Herold R, Kaatsch P, Klussmann JH, Graf N, Reinhardt D, Schrappe M, Zimmermann M, Jurgens H (2003). *Krebserkrankungen bei Kindern - Erfolg durch einheitliche Therapiekonzepte seit 25 Jahren*. *Dtsch Arztebl* 100(13): A 842-852.

Crist W, Boyett J, Roper M, Pullen J, Metzgar R, van Eys J, Ragab A, Starling K, Vietti T, Cooper M (1984). Pre-B cell leukemia responds poorly to treatment: a pediatric oncology group study. *Blood* 63(2): 407-14.

Crist W, Boyett J, Jackson J, Vietti T, Borowitz M, Chauvenet A, Winick N, Ragab A, Mahoney D, Head D, Iyer R, Wagner H, Pullen J (1989). Prognostic importance of the pre-B-cell immunophenotype and other presenting features in B-lineage childhood acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 74(4): 1252-9.

Donadieu J, Auclerc MF, Baruchel A, Perel Y, Bordigoni P, Landman-Parker J, Leblanc T, Cornu G, Sommelet D, Leverger G, Schaison G, Hill C (2000). Prognostic study of continuous variables (white blood cell count, peripheral blast cell count, haemoglobin level,

platelet count and age) in childhood acute lymphoblastic leukaemia. Analysis Of a population of 1545 children treated by the French Acute Lymphoblastic Leukaemia Group (FRALLE). *Br J Cancer* 83(12): 1617-22.

Drexler HG, Gignac SM, Minowada J (1988). Routine immunophenotyping of acute leukaemias. *Blut* 57(6): 327-39.

Drexler HG, Thiel E, Ludwig WD (1991). Review of the incidence and clinical relevance of myeloid antigen-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 5(8): 637-45.

Drexler HG, Ludwig WD (1993). Incidence and clinical relevance of myeloid antigen-positive acute lymphoblastic leukemia. *Recent Results Cancer Res* 131: 53-66.

Fanin R, Zuffa E, Fasola G, Damiani D, Gallizia C, Michieli MG, Marcuzzi P, Russo D, Visani G, Resegotti L, Comotti B, Buzzetti M, Leoni F, Ciolli S, Mangoni L, Scapoli G, Alghisi A, Aieta M, Battista R, Leoni P, Cantore M, Baccarani M, Haanen C, Tura S (1989). Serum lactate dehydrogenase is an important risk determinant in acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* 74(2): 161-5.

Felix CA, Lange BJ, Chessells JM (2000). Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Challenges and Controversies in 2000. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*: 285-302.

Fink FM, Koller U, Mayer H, Haas OA, Grumayer-Panzer ER, Urban C, Dengg K, Mutz I, Tuchler H, Gatterer-Menz I, Knapp W, Gadner H (1993). Prognostic significance of myeloid-associated antigen expression on blast cells in children with acute lymphoblastic leukemia. The Austrian Pediatric Oncology Group. *Med Pediatr Oncol* 21(5): 340-6.

Foon KA, Todd RF, 3rd (1986). Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 68(1): 1-31.

Freund M, Queißer W. Knochenmark. In: Ostendorf PC (Hrsg.). *Hämatologie*. Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, (1991).

Gaynon PS, Steinherz PG, Bleyer WA, Ablin AR, Albo VC, Finklestein JZ, Grossman NJ, Littman PS, Novak LT, Pyesmany AF (1988). Intensive therapy for children with acute lymphoblastic leukaemia and unfavourable presenting features. Early conclusions of study CCG-106 by the Childrens Cancer Study Group. *Lancet* 2(8617): 921-4.

Göbel U (2003). Leukämien bei Kindern und Jugendlichen - Vom Symptom zur Diagnose. *Monatsschr Kinderheilkd* 151(2): 131-137.

Greaves MF (1986). Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. *Science* 234(4777): 697-704.

Guyotat D, Campos L, Shi ZH, Charrin C, Treille D, Magaud JP, Fiere D (1990). Myeloid surface antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 4(9): 664-6.

Hanenberg H, Laws H, Baethmann M, Burdach S (1994). Akute lymphatische und myeloische Leukämien im Kindesalter. *mta* 9(2): 91-96.

- Huijgen HJ, Sanders GT, Koster RW, Vreeken J, Bossuyt PM (1997). The clinical value of lactate dehydrogenase in serum: a quantitative review. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35(8): 569-79.
- Janka-Schaub GE, Harms DO, den Boer ML, Veerman AJ, Pieters R (1999). In vitro drug resistance as independent prognostic factor in the study COALL-O5-92 Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia; two- tiered classification of treatments based on accepted risk criteria and drug sensitivity profiles in study COALL-06-97. *Klin Padiatr* 211(4): 233-8.
- Kaatsch P, Spix C (2002). Jahresbericht Kinderkrebsregister. Mainz, Institut für Medizinische Statistik und Dokumentation, Johannes-Gutenberg-Universität.
- Kaplan EL, Meier P (1958). Nonparametric estimation from incomplete observations. *Journal of the American Statistical Association* 53: 457-481.
- Kishimoto T, Goyert S, Kikutani H, Mason D, Miyasaka M, Moretta L, Ohno T, Okumura K, Shaw S, Springer TA, Sugamura K, Sugawara H, von dem Borne AE, Zola H (1997). CD antigens 1996. *Blood* 89(10): 3502.
- Köhler G, Milstein C (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity. *Nature* 256(5517): 495-7.
- Kornberg A, Polliack A (1980). Serum lactic dehydrogenase (LDH) levels in acute leukemia: marked elevations in lymphoblastic leukemia. *Blood* 56(3): 351-355.
- Kurec AS, Belair P, Stefanu C, Barrett DM, Dubowy RL, Davey FR (1991). Significance of aberrant immunophenotypes in childhood acute lymphoid leukemia. *Cancer* 67(12): 3081-6.
- LeBien TW, Villablanca JG (1990). Ontogeny of normal human B-cell and T-cell precursors and its relation to leukemogenesis. *Hematol Oncol Clin North Am* 4(4): 835-47.
- Lenkei R, Bjork O, Ost A, Biberfeld P (1991). Expression of CD15 as predictor of relapse in children with acute lymphoblastic leukemia of the pre-B type. *Leuk Res* 15(4): 189-94.
- Ludwig WD, Bartram CR, Ritter J, Raghavachar A, Hiddemann W, Heil G, Harbott J, Seibt-Jung H, Teichmann JV, Riehm H (1988). Ambiguous phenotypes and genotypes in 16 children with acute leukemia as characterized by multiparameter analysis. *Blood* 71(6): 1518-28.
- Ludwig WD, Teichmann JV, Sperling C, Komischke B, Ritter J, Reiter A, Odenwald E, Sauter S, Riehm H (1990). Incidence, clinical markers and prognostic significance of immunologic subtypes of acute lymphoblastic leukemia (ALL) in children: experiences of the ALL-BFM 83 and 86 studies. *Klin Padiatr* 202(4): 243-52.
- Ludwig WD, Harbott J, Bartram CR, Komischke B, Sperling C, Teichmann JV, Seibt-Jung H, Notter M, Odenwald E, Nehmer A, Thiel E, Riehm H (1993). Incidence and prognostic significance of immunophenotypic subgroups in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM study 86. *Recent Results Cancer Res* 131: 269-82.

- Ludwig WD, Reiter A, Loffler H, Gokbuget, Hoelzer D, Riehm H, Thiel E (1994a). Immunophenotypic features of childhood and adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): experience of the German Multicentre Trials ALL-BFM and GMALL. *Leuk Lymphoma* 13(Suppl 1): 71-6.
- Ludwig WD, Reiter A, Schott G, Schwartz S, Thiel E (1994b). Immunophenotyping of acute lymphatic leukemia: diagnostic aspects and clinical relevance. *Wien Klin Wochenschr* 106(8): 231-2, 233-7.
- Mirro J, Zipf TF, Pui CH, Kitchingman G, Williams D, Melvin S, Murphy SB, Stass S (1985). Acute mixed lineage leukemia: clinicopathologic correlations and prognostic significance. *Blood* 66(5): 1115-23.
- Niehues T, Kapaun P, Harms DO, Burdach S, Kramm C, Körholz D, Janka-Schaub G, Göbel U (1999). A classification based on T cell selection-related phenotypes identifies a subgroup of childhood T-ALL with favorable outcome in the COALL studies. *Leukemia* 13(4): 614-7.
- Passarge E (1991). Bloom's syndrome: the German experience. *Ann Genet* 34(3-4): 179-97.
- Pui CH, Dodge RK, Dahl GV, Rivera G, Look AT, Kalwinsky D, Bowman WP, Ochs J, Abromowitch M, Mirro J, Murphy SB (1985). Serum lactic dehydrogenase level has prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 66(4): 778-82.
- Pui CH, Behm FG, Singh B, Rivera GK, Schell MJ, Roberts WM, Crist WM, Mirro J, Jr. (1990a). Myeloid-associated antigen expression lacks prognostic value in childhood acute lymphoblastic leukemia treated with intensive multiagent chemotherapy. *Blood* 75(1): 198-202.
- Pui CH, Crist WM, Look AT (1990b). Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 76(8): 1449-63.
- Pui CH, Behm FG, Crist WM (1993). Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 82(2): 343-62.
- Pui CH (1995). Childhood leukemias. *N Engl J Med* 332(24): 1618-30.
- Pui CH, Rubnitz JE, Hancock ML, Downing JR, Raimondi SC, Rivera GK, Sandlund JT, Ribeiro RC, Head DR, Relling MV, Evans WE, Behm FG (1998). Reappraisal of the clinical and biologic significance of myeloid-associated antigen expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 16(12): 3768-73.
- Pui C-H, Evans WE (1998). Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 339(9): 605-615.
- Putti MC, Rondelli R, Cocito MG, Arico M, Sainati L, Conter V, Guglielmi C, Cantu-Raj-noldi A, Consolini R, Pession A, Zanesco L, Masera G, Biondi A, Basso G (1998). Expression of myeloid markers lacks prognostic impact in children treated for acute lymphoblastic leukemia: Italian experience in AIEOP-ALL 88-91 studies. *Blood* 92(3): 795-801.

Schmidt RE. Monoklonale Antikörper in der Diagnostik von Zelloberflächenantigenen. In: Schmitz G, Rothe G (Hrsg.). Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Schattauer Verlag, Stuttgart, New York, (1994). 63-64.

Sen L, Borella L (1975). Clinical importance of lymphoblasts with T markers in childhood acute leukemia. *N Engl J Med* 292(16): 828-32.

Smith LJ, Curtis JE, Messner HA, Senn JS, Furthmayr H, McCulloch EA (1983). Lineage infidelity in acute leukemia. *Blood* 61(6): 1138-45.

Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, Gelber R, Heerema N, Korn EL, Link M, Murphy S, Pui CH, Pullen J, Reamon G, Sallan SE, Sather H, Shuster J, Simon R, Trigg M, Tubergen D, Uckun F, Ungerleider R (1996). Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 14(1): 18-24.

Sobol RE, Mick R, Royston I, Davey FR, Ellison RR, Newman R, Cuttner J, Griffin JD, Collins H, Nelson DA, Bloomfield C (1987). Clinical importance of myeloid antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 316(18): 1111-7.

Suarez CR, Andreeff M, Miller DR (1984). Serum LDH values in childhood acute leukemias and non-Hodgkin's lymphoma. *Med Pediatr Oncol* 12(2): 89-92.

Taylor AM, Metcalfe JA, Thick J, Mak YF (1996). Leukemia and lymphoma in ataxia telangiectasia. *Blood* 87(2): 423-38.

Uckun FM, Sather HN, Gaynon PS, Arthur DC, Trigg ME, Tubergen DG, Nachman J, Steinherz PG, Sensel MG, Reaman GH (1997). Clinical features and treatment outcome of children with myeloid antigen positive acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Blood* 90(1): 28-35.

Wiersma SR, Ortega J, Sobel E, Weinberg KI (1991). Clinical importance of myeloid-antigen expression in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *N Engl J Med* 324(12): 800-8.

Wimazal F, Sperr WR, Kundi M, Meidlinger P, Fonatsch C, Jordan JH, Thalhammer-Scherrer R, Schwarzinger I, Geissler K, Lechner K, Valent P (2001). Prognostic value of lactate dehydrogenase activity in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 25(4): 287-94.

## Lebenslauf

**Name:** Lars Hoof  
**Geburtsdatum:** 16.02.1973  
**Geburtsort:** Duisburg

### Schulbildung

1979 - 1983 Gemeinschaftsgrundschule, Kempen  
1983 - 1992 Luise-von-Duesberg-Gymnasium, Kempen  
1992 Allgemeine Hochschulreife

### Studium

1992 - 1993 Humanmedizin, Vrije Univeriteit Brussel  
1993 - 1996 Humanmedizin, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf,  
vorklinischer Abschnitt  
1996 Physikum  
1996 - 2000 Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf,  
klinischer Abschnitt  
1997 1. Staatsexamen  
2000 2. Staatsexamen  
2000 - 2001 Praktisches Jahr, Universitätskliniken der  
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf  
2001 Ärztliche Prüfung  
2002 - 2003 Fertigstellung der Promotionsarbeit

### Ärztliche Tätigkeit

seit 2004 AiP und Assistenzarzt, Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde,  
Malteser Krankenhaus St. Anna, Duisburg

Krefeld, im Oktober 2004

Herrn Prof. Dr. med. Göbel danke ich für die Vergabe des Themas der Arbeit und der damit verbundenen Möglichkeit in seiner Klinik zu promovieren. Weiterhin danke ich ihm für die konstruktiven Anregungen, die mir bei der Fertigstellung der Arbeit sehr geholfen haben.

Herrn Dr. med. Laws sei für die fachkundige Betreuung und wertvolle Diskussionsbereitschaft während der gesamten Dauer der Arbeit gedankt.

Ferner danke ich Fr. Wieczorek für ihre hilfreiche und freundliche Unterstützung.

**Prognosefaktoren bei Kindern und Jugendlichen mit ALL:  
Myeloische Antigenexpression und klinisch-chemische Untersuchungen**

Lars Hoof

Die Untersuchung umfasst insgesamt 126 pädiatrische Patienten mit zuvor unbehandelter akuter lymphoblastischer Leukämie, die von Anfang 1990 bis Ende 1997 diagnostiziert und über einen medianen Zeitraum von 6,1 (0,1-11,3) Jahren nachbeobachtet wurden. Dabei wurden Patienten im ersten Lebensjahr von älteren getrennt und als eigene Gruppe betrachtet. Der Vergleich des vorliegenden Patientenkollektivs mit denen anderer Studiengruppen zeigte hinsichtlich der charakteristischen Merkmale der Erkrankung wie Alters- und Geschlechtsverteilung, sowie klinischer Befunde zum Diagnosezeitpunkt weitgehende Übereinstimmung.

Die Wahrscheinlichkeit des ereignisfreien Überlebens nach 6 Jahren war mit 80,6% für das gesamte Untersuchungskollektiv >12 Monate insgesamt günstig. Zwischen der Niedrigrisikogruppe (87,8%) und der Hochrisikogruppe (73,3%) bestand im vorliegenden Patientenkollektiv kein signifikanter Unterschied bezüglich des ereignisfreien Überlebens. Die Auswertung bestätigte, dass mit den bestehenden Prognosefaktoren eine stratifizierte Therapie möglich ist, die für diese Risikogruppen zu vergleichbar guten Überlebensergebnissen führt. Die kleine Gruppe der Patienten im ersten Lebensjahr hatte mit einer pEFS von 72,7% ein relativ günstiges Therapieergebnis. Säuglinge wurden im Vergleich zu älteren Patienten signifikant häufiger transplantiert, was einen möglichen Erklärungsgrund für das gute Therapieergebnis im Vergleich zu früher liefert.

Der Immunphänotyp der ALL war den vorliegenden Untersuchungen zufolge klinisch relevant. Es konnten charakteristische Konstellationen prätherapeutisch erhobener Befunde zwischen den Subtypen der ALL bestätigt werden. Bei Patienten mit B-Vorläuferzell-ALL hatten Patienten mit Prä-B-ALL das günstigste Auskommen und waren mit Patienten mit C-ALL vergleichbar. Patienten mit Prä-prä-B zeigten unter Berücksichtigung der kleinen Fallzahl tendenziell das ungünstigste Auskommen. Bei Patienten mit T-ALL führte die intensive Therapie zu einem, den Patienten mit B-Vorläuferzell-ALL ähnlichem und im Vergleich zu früher guten Therapieergebnis.

Die Koexpression myeloischer Antigene war im vorliegenden Kollektiv häufig zu beobachten (40% bei Patienten >12 Monate). Die Untersuchung der klinischen Wertigkeit der myeloischen Koexpression ergab jedoch bei keinem der Untersuchungsmerkmale signifikante Unterschiede zwischen Patienten mit bzw. ohne Koexpression. Insbesondere bestanden keine Assoziationen zu bereits etablierten Prognosefaktoren, wie der initialen Leukozytenzahl, dem Lebensalter zum Diagnosezeitpunkt oder den prognostisch ungünstigeren Immunphänotypen Prä-prä-B-ALL bzw. T-ALL. Bezogen auf die Therapieergebnisse der Patienten hat sich die Koexpression in keiner Untergruppe des Patientenkollektivs als prognostisch bedeutsam erwiesen.

Hingegen war unter den untersuchten hämatologischen und laborchemischen Parametern die Aktivität der Laktatdehydrogenase zum Diagnosezeitpunkt prognostisch bedeutsam. Es zeigte sich, dass die initiale LDH-Aktivität einen Prognosefaktor für Patienten mit hohem Rezidivrisiko in der Gruppe der Niedrigrisikopatienten und möglicherweise auch einen für Patienten mit niedrigem Rückfallrisiko in der Gruppe der Hochrisikopatienten darstellt. Diese Ergebnisse sollten an einem größeren, einheitlich klassifiziertem und behandeltem Patientenkollektiv weiter untersucht werden.

  
(Prof. Dr. U. Göbel)