

Verlaufsuntersuchungen der Oberflächenantigene bei  
Akuter Myeloischer Leukämie zur frühzeitigen  
Rezidivdiagnostik

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Babette Linde  
geboren am 28.07.1980 in Jena**

**Gutachter:**

1. ....

2. ....

3. ....

**Tag der öffentlichen Verteidigung: .....**

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>3</b>
2.1 Pathogenese und Klinik.....	3
2.2 Epidemiologie.....	4
2.3 Ätiologie und Risikofaktoren.....	4
2.4 Diagnostik der AML.....	5
2.5 Klassifikation der AML und MDS.....	5
2.6 Zytogenetik.....	7
2.7 Immunphänotypisierung.....	8
2.8 Therapie.....	10
<b>3. Ziele der Arbeit.....</b>	<b>13</b>
<b>4. Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
4.1 Patientenkollektiv und Datenerfassung.....	15
4.2 Knochenmarkuntersuchung.....	16
4.3 Durchflusszytometrie.....	17
4.4 Mathematisch-statistische Auswertverfahren.....	20
4.5 Methodik.....	20
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>23</b>
5.1 Gruppeneinteilung.....	23
5.2 Altersabhängigkeit.....	25
5.3 Einteilung in Subtypen.....	27
5.4 Rezidivhäufigkeit.....	28
5.5 Etablierung eines Leitwertes.....	31
5.6 Ermittlung einer Richtgröße.....	35
5.7 Änderung der Oberflächenantigene im Verlauf.....	38

	<b>Seite</b>
5.8 Zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Oberflächenantigene und den Ergebnissen der Zytomorphologie.....	41
5.9 Zusammenhang zwischen Therapie und Verlauf der Oberflächenantigene.....	44
5.10 Zusammenhang zwischen Letalität und Verlauf der Oberflächenantigene.....	46
5.11 Auswertung der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19.....	50
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>55</b>
6.1 Einteilung der Kurven in einen stabilen und instabilen Verlauf der Oberflächenantigene.....	55
6.2 Altersabhängigkeit der Kurvenverläufe.....	56
6.3 Verteilung der Subtypen.....	57
6.4 Rezidivhäufigkeit.....	58
6.5 Zusammenhang zwischen Therapie und Verlauf der Oberflächenantigene.....	60
6.6 Zusammenhang zwischen Letalität und Verlauf der Oberflächenantigene.....	61
6.7 Etablierung eines Leitwertes.....	62
6.8 Ermittlung einer Richtgröße.....	68
6.9 Änderung der Oberflächenantigene im Verlauf.....	69
6.10 Zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Oberflächenantigene und den Ergebnissen der Zytomorphologie.....	70
6.11 Bedeutung der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19.....	72
6.12 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	76
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>93</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ALL	-Akute Lymphatische Leukämie
AML	-Akute Myeloische Leukämie
Ara-C	-Cytosinarabinosid
ATRA	-All-trans-Retinol-Acid
CD	-Cluster of Differentiation
DLI	-Donor-Lymphocyte-Infusion
FACS	-Fluorescence Activated Cell Sorters
FAB-Klassifikation	-French-American-British-Klassifikation
FITC	-Fluoresceinisothiozyanat
G-CSF	-Grown-Colony-Stimulation-Factor
hAC-Protokoll	-hochdosiertes Cytosinarabinosid und Cyclophosphamid-Protokoll
HLA-DR	-Humanes Lymphozyten-Antigen mit DR- Region
Ida/Flag-Protokoll	-Idarubicin/ Fludarabin-Protokoll
KIM	-Klinik für Innere Medizin
KM	-Knochenmarkpunktion (Befunde der Zytomorphologie)
LAIP	-Leukämieassoziiertes Immunphänotyp
Mak	-monoklonale Antikörper
MDS	-Myelodysplastisches Syndrom
MPO	-Myeloperoxidase
MRD	-Minimal Residual Disease
OSHO-Protokoll	-Protokoll der Ostdeutschen Studiengruppe für Hämatologie und Onkologie
PAS	-Periodic-acid-Schiff-Färbung
PE	-Phycoerythrin
PerCP	-Peridininchlorophyllprotein
POX	-Peroxidase
q 0,25 ; 0,5	-Stichproben- Quartile

TAD-Protokoll	-Behandlungsprotokoll mit 6-Thioguanin, Cytosinarabinosid und Daunorubicin
WHO	-World Health Organisation

# 1. Zusammenfassung

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Systemerkrankung des hämatopoetischen Systems, die sehr häufig mit Rezidiven und einer hohen Letalität verbunden ist. Im Mittelpunkt der Arbeit stand daher die Frage, ob eine frühzeitige Rezidivdiagnostik mit Hilfe der Immunphänotypisierung möglich ist.

Dazu wurden bei 32 Patienten mit AML über einen Zeitraum von mehr als zweieinhalb Jahren die Oberflächenantigene CD 13, CD 33, CD 34 sowie CD 10 und CD 19 im Knochenmark bestimmt. Zur Auswertung der Daten wurden zwei Patientengruppen gebildet: eine mit stabilem und eine mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene. Als Kriterium diente dabei der Schwellenwert von 30% oberflächenantigen-positiven Zellen im Knochenmark. Bei Patienten mit instabilem Verlauf zeigten die Oberflächenantigene einen sehr variablen Kurvenverlauf und überschritten den Schwellenwert zum Teil auch mehrfach, während sich bei Patienten mit stabilem Verlauf die Kurvenverläufe der Oberflächenantigene mit nur geringen Schwankungen unterhalb des Schwellenwertes von 30% bewegten.

Im Anschluss daran wurden die beiden Patientengruppen hinsichtlich bestehender Unterschiede in der Altersverteilung, der Häufigkeit der Subtypen, der Therapiestrategien und der Todesursachen überprüft. Zusätzlich wurde die Rezidivhäufigkeit bei Patienten mit stabilem und instabilem Verlauf der myeloischen Oberflächenantigene untersucht. Als Referenzwert dienten hierbei die Befunde der Zytomorphologie.

Dabei fiel auf, dass bei Patienten mit instabilem Verlauf der Altersmedian von 63 Jahren signifikant höher lag als der von 46 Jahren bei den Patienten mit stabilem Verlauf der Marker. Die ebenfalls höhere Rezidivrate bei Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene korreliert mit der schlechteren Prognose bei Patienten im höheren Alter. Auch die häufigeren Therapiewechsel und die höhere Letalitätsrate bei Patienten mit instabilem Verlauf betonen, dass eine solche Gruppenbildung aussagekräftig ist.

Ein weiterer Punkt der Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung eines Leitwerts, der den Verlauf der AML widerspiegeln kann. Dabei zeigte sich, dass das Antigen CD 33 sehr häufig beim stabilen Verlauf exprimiert wird, während CD 13 allein oder in Kombination mit CD 33 oder CD 34 beim instabilen Verlauf der

Oberflächenantigene überwiegt. Da eine Vielzahl von Patienten CD 34 oder die Kombination von CD 33 mit CD 34 als führenden Marker aufweisen, kommt diesen Werten für die Verlaufsbeobachtung der AML eine wesentliche Bedeutung zu.

Weiterführend wurde das Verhalten der Kurvenverläufe der einzelnen Oberflächenantigene zueinander hinsichtlich einer Aussage zur frühzeitigen Rezidivdiagnostik untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass ein gemeinsamer Verlauf aller drei Oberflächenantigene meistens bei Patienten mit stabilem Verlauf zu finden ist und damit auf eine bessere Prognose hinweist. Im Gegensatz dazu zeigte sich beim instabilen Verlauf der Oberflächenantigene sehr häufig eine Trennung der Oberflächenantigenverläufe. Diese waren mit einer erhöhten Rezidivrate verbunden. Auch der getrennte Verlauf der aberranten Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 sagt tendenziell eine schlechtere Prognose voraus, insbesondere wenn CD 19 mit den myeloischen Markern gemeinsam ansteigt.

Außerdem konnte ermittelt werden, dass es mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit zu einem Rezidiv kommt, wenn die Oberflächenantigene einen Anstieg von über 30% aufweisen.

Bei mehr als der Hälfte aller Patienten mit instabilem Verlauf zeigten die Oberflächenantigene Veränderungen im Krankheitsverlauf bereits vor den Veränderungen in der Zytomorphologie an. Da Rezidive vorwiegend bei Patienten mit instabilem Verlauf auftraten, ist dieses Ergebnis von erheblichem Stellenwert für die frühzeitige Rezidivdiagnostik.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass die Kurvenverläufe der Oberflächenantigene eine recht genaue Verlaufsbeobachtung der Akuten Myeloischen Leukämie ermöglichen und damit auch für die frühzeitige Rezidivdiagnostik eine besondere klinische Bedeutung bekommen können.

Demzufolge sind Patienten mit instabilem Verlauf, deren Oberflächenantigene über den Schwellenwert von 30% hinaus gehen, einen getrennten Verlauf der Oberflächenantigene sowie einen Anstieg der myeloischen Marker über 30% aufweisen, besonders gefährdet, ein Rezidiv zu entwickeln. Bemerkenswerterweise deutet sich dieses Rezidiv bei einer größeren Anzahl von Patienten zeitlich bereits vor den Veränderungen in der Zytomorphologie an.



## 2. EINLEITUNG

### 2.1 Pathogenese und Klinik

Die Akute Myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne Systemerkrankung. Durch Transformation der Gene, welche die frühe hämatopoetische Entwicklung steuern, kommt es zur Fehlregulation von Differenzierung und Proliferation der Stammzellen. Der ungehemmt expandierende leukämische Zellklon verdrängt die normale Blutbildung aus dem Knochenmark und bedingt die daraus resultierende schwere Panzytopenie. Die Folgen sind:

- Anämie, die sich als Schwäche, Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit sowie Blässe und Tachykardie manifestiert. Das Hämoglobin ist erniedrigt und die Retikulozytenzahl vermindert.
- Thrombozytopenie, welche Auslöser von Blutungen in Form von Hämatomen, Petechien, Epistaxis, Schleimhautblutungen sowie von Gerinnungsstörungen sein kann.
- Granulozytopenie, welche verantwortlich für die Abwehrschwäche ist. Diese ist oft mit Fieber und Infektionen der Atemwege, des Zahnfleisches und der Harnwege verbunden. Die Leukozytenzahl kann bei subleukämischen und aleukämischen Fällen auch normal oder erniedrigt sein.
- Knochenschmerzen, welche häufig zu den ersten Anzeichen gehören.
- Extramedulläre Manifestationen, die sich als Hepato- und Splenomegalie, Lymphadenopathie sowie Gingivahypertrophie und Hautinfiltrationen darstellen. Zusätzlich kann das Zentralnervensystem (Meningeosis leucaemica) befallen sein.

(Kern et al. 2004, Renz-Polster et al. 2001, Wilhelm et al. 2000, Büchner et al. 1999)

Das Myelodysplastische Syndrom (MDS) ist ebenfalls eine klonale Erkrankung mit Transformation früher hämatopoetischer Vorläuferzellen. Infolge von Proliferations- und Differenzierungsstörungen resultiert eine ineffektive Hämatopoese mit Panzytopenie. Das Knochenmark ist meist zellreich und weist einen erhöhten Blastenanteil sowie morphologische Zellatypien auf. Die klinische Symptomatik ist ähnlich wie bei der AML. Die Krankheit zeigt einen langsam progredienten Verlauf

über Jahre hinweg und kann in eine AML übergehen (Lübbert und Lindemann 2002, Renz-Polster 2001).

## **2.2 Epidemiologie**

Die Akute Myeloische Leukämie tritt mit einer Häufigkeit von insgesamt 3% vorwiegend im Erwachsenenalter auf. Trotz dieser geringen Inzidenz ist sie die häufigste tödlich verlaufende Neoplasie zwischen dem 30. - 40. Lebensjahr.

Seit Erfassung im Jahre 1973 schwankt die Inzidenz der Erkrankung zwischen 2,3: 100 000 und 2,8: 100 000. Es zeigen sich weder Tendenzen der Zunahme noch der Abnahme, und es sind keine geographischen Unterschiede zu erkennen. Allerdings existieren erhebliche Schwankungen bezüglich der altersspezifischen Inzidenz. Zwischen 0 - 60 Jahren liegt die Inzidenz relativ konstant zwischen 1,5 - 3: 100 000, während sie in der Altersgruppe der über 60jährigen bis auf 15: 100 000 ansteigt (Lübbert et al. 2002). Das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen 60 - 70 Jahren (Brincker 1985). Eine Altersabhängigkeit ist auch bei der Fünfjahresüberlebensrate zu beobachten, die bei Patienten unter 65 Jahren 24,8% und bei über 65jährigen nur noch 2,9% beträgt (Kern et al. 2004). Ähnliches gilt für das MDS, welches vorwiegend eine Erkrankung des höheren Lebensalters ist. Die Inzidenz beträgt insgesamt 3 - 5: 100 000, steigt aber ab dem 70. Lebensjahr auf 20: 100 000 an (Aul et al. 2002, Lübbert und Lindemann 2002).

## **2.3 Ätiologie und Risikofaktoren**

Bei der Mehrzahl der Erkrankungen an Akuter Myeloischer Leukämie kann keine eindeutige ätiologische Ursache festgestellt werden. Allerdings existieren bestimmte Faktoren, die mit einem erhöhten Risiko für AML einhergehen. Hierzu gehören u.a. Alkylanzien, welche als Zytostatika in der Tumorthherapie eingesetzt werden und eine sekundäre AML auslösen können (Cimino et al. 1991, Kaldor et al. 1990, Curtis et al. 1990). Seit den Untersuchungen der Atombombenopfer von Hiroshima und Nagasaki ist für ionisierende Strahlen und für therapeutische Strahlenbehandlungen (Travis et al. 1991, Curtis et al. 1985) ein erhöhtes Risiko an Leukämie zu erkranken belegt. Auch Benzol gilt, in Abhängigkeit von der Dosis, als eine gesicherte Ursache für ein gehäuftes Auftreten der AML (Hayes et al 1997, Rinsky et al 1987, Infante et al.

1977). Ebenso kommen bestimmte kongenitale Erkrankungen, wie die Fanconi-Anämie (Auerbach et al. 1991) bei Kindern oder das Down-Syndrom (Hasle et al. 2000) als Risikofaktoren in Betracht. Hinweise für eine familiäre Häufung werden kontrovers diskutiert.

## **2.4 Diagnostik der AML**

Zur Diagnosestellung einer AML wird der Ausstrich eines Knochenmarkspirats untersucht. Es findet sich typischerweise ein monotones Bild mit überwiegend unreifer Blastenpopulation, da die verschiedenen myeloischen Reifungsstufen fehlen (Hiatus leucaemicus) (Wilhelm et al. 2000). Der Grenzwert für die Diagnose AML oder bei bereits bestehender Krankheit für ein Rezidiv liegt bei 20 - 30% Blasten im Knochenmark laut WHO-Klassifikation (Harris et al. 1999, Kern et al. 2003) und über 30% gemäß FAB-Klassifikation (Lübbert 2002, Büchner et al. 1999). Liegt die Prozentzahl der Blasten im Knochenmark unter 15%, handelt es sich um eine partielle, liegt sie unter 5%, um eine komplette Remission. Zudem sind die erythropoetischen Vorstufen und Megakaryozyten vermindert. Im peripheren Blutausstrich finden sich meist eine normochrome Anämie mit Verminderung der Retikulozyten sowie eine Thrombozytopenie. Die absoluten Leukozytenzahlen müssen nicht zwingend erhöht sein, denn der Anteil der Blasten ist variabel. Bei 10% der Patienten sind keine Blasten nachweisbar (Renz-Polster et al. 2001, Wilhelm et al. 2000). Darüber hinaus werden zur Einschätzung der Prognose zytogenetische, molekulargenetische und immunzytologische Untersuchungen durchgeführt.

## **2.5 Klassifikation der AML und MDS**

Die 1976 von Bennett et al. eingeführte French-American-British (FAB)-Klassifikation teilt die AML hinsichtlich Zytomorphologie in verschiedene Subgruppen ein. Hierbei werden zytochemische und immunologische Teilaspekte der Leukämiezellen berücksichtigt. In den Jahren 1985 und 1991 wurde die Klassifikation erweitert und präzisiert (Bennett 1985 und 1991). In Tabelle 1 und 2 werden die charakteristischen Befunde jeder Untergruppe der AML und MDS zusammengefasst. Die hervorgehobenen Angaben stellen differentialdiagnostisch besonders wichtige Befunde dar.

Tabelle 1: Übersicht über die Klassifikation der AML entsprechend morphologischer und zytochemischer Kriterien sowie die Assoziation der einzelnen Subtypen der FAB- Klassifikation mit zytogenetischen Chromosomenveränderungen. Die hervorgehobenen Angaben stellen differentialdiagnostisch wichtige Befunde dar.

Subtyp	Häufigkeit	Morphologie	Zytochemie	Zytogenetik (Assoziation)
<b>M0</b> Minimal differenzierte AML	2 - 3%	>90% undifferenzierte Blasten, immunologisch: Nachweis <b>myeloischer Zellantigene</b>	<b>POX &lt;3%</b> , aber elektronenmikroskop. MPO positiv, unspez. Esterase negativ	-
<b>M1</b> Myeloblastische Leukämie ohne Reifung	15 - 20%	<b>&gt;90% unreife myeloische Blasten</b> , wenige Granula und Auerstäbchen	<b>&gt;3% POX</b> , unspezifische Esterase negativ	t(8;21)
<b>M2</b> Myelozytenleukämie mit Reifung	25 - 30%	<b>&gt;30 - &lt;90% Blasten, &gt;10% Ausreifung</b> (Promyelozyten bis Granulozyten), <20% monozytäre Zellen, <50% erythroblastäre Zellen	<b>&gt;&gt;3% POX</b> , unspezifische Esterase negativ	t(8;21)
<b>M3</b> Promyelozytenleukämie	5 - 10%	>30% Blasten, überwiegend <b>promyelozytär</b> und <b>hypergranuliert, viele Auerstäbchen- teilweise als Bündel gelagert (faggot cells)</b> , <20% monozytäre Zellen, <50% erythroblastäre Zellen	POX stark positiv, unspezifische Esterase negativ	<b>t(15;17)</b>
<b>M4</b> Myelomonozytäre Form	20 - 30%	<b>&gt;20 - &lt;80% monozytäre Zellen</b> , >20% Blasten	POX >3%, unspezifische <b>Esterase positiv</b>	<b>Inv(16)/ t(16;16)</b>
<b>M5</b> Monozytäre Form	2 - 9%	<b>&gt;80% Blasten mit monozytärer Ausreifung</b>	POX <3%, unspez. <b>Esterase stark positiv</b>	11q23 Aberr.
<b>M6</b> Erythroleukämie	3 - 5%	<b>&gt;50% Erythroblasten</b> , meist deutlich atypisch, >30% myeloische Blasten	POX <3%, unspez. Esterase negativ, <b>PAS positiv</b>	11q23 Aberr.
<b>M7</b> Megakaryozytenleukämie	<5%	>30% Megakaryoblasten, Identifizierung: <b>immunologisch:</b> von- Willebrandfaktor, <b>CD41</b> und <b>CD61</b> , elektronenmikroskop., <b>histologisch: Myelofibrose</b>	POX <3%, unspezifische Esterase negativ	-

Tab. 2: Übersicht über die Klassifikation der MDS nach der FAB- Klassifikation

<b>Typ</b>	<b>Blasten im Blut</b>	<b>Blasten im Knochenmark</b>	<b>Besonderheiten</b>
Refraktäre Anämie (RA)	<1%	<5%	meist mit Granulo-/Thrombozytopenie
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)	<1%	<5%	>15% Ringsideroblasten im Knochenmark
Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss (RAEB)	<5%	5 - 20%	meist Bi- oder Trizytopenie
Chronische myelomonozytäre Leukämie	<5%	<20%	Periphere Monozytose (>1000/ $\mu$ l Blut)
Refraktäre Anämie mit Blastenüberschuss in Transformation (RAEB/t)	>5%	21 – 30%	fakultativ Auerstäbchen (wird nach der WHO-Klassifikation bereits zur AML gezählt)

## 2.6 Zytogenetik

Für die Wahl der Therapiestrategie hat in den letzten Jahren die Abschätzung der Prognose des einzelnen Patienten an Bedeutung gewonnen. Dabei hat neben der Immunphänotypisierung vor allem die zytogenetische Untersuchung einen sehr hohen Stellenwert erlangt. Zwischen 60 - 70% der Patienten weisen numerische und/oder strukturelle Chromosomenaberrationen auf (Haferlach et al. 2004, Wilhelm et al. 2000, Büchner et al. 1999, Schiffer et al. 1989). Umfangreiche Studien belegen, dass deutliche Unterschiede in der Prognose zwischen bestimmten Karyotypaberrationen bestehen (Weltermann et al. 2003), welche sich zum Teil in den verschiedenen Subtypen nach FAB widerspiegeln (Tabelle 1). Für die balancierten Translokationen t(15; 17), t(8; 21) und inv(16)/ t(16; 16), die bei 10 - 15% aller Patienten auftreten, wurde eine deutlich bessere Prognose hinsichtlich des Ansprechens auf die Induktionstherapie, die Remissionsdauer und das Gesamtüberleben ermittelt (Grimwade et al. 1998, Marosi et al 1992, Schiffer et al. 1989, Samuels et al 1988). Bei 15 - 20% aller Patienten treten Veränderungen an den Chromosomen 3, 5 und 7 sowie komplexe Aberrationen auf. Für diese Patienten wurde eine schlechtere Prognose nachgewiesen. Auch die Translokationen mit Beteiligung der Bande 11q23 werden häufig zu den ungünstigen Veränderungen gezählt, wobei die Datenlage zum

Teil heterogen ist. (Grimwade et al 1998, Schoch et al. 2001, Schiffer et al. 1989, Samuels et al. 1988, Yunis et al. 1984). Vor allem bei älteren Patienten treten häufig diese ungünstigen Aberrationen auf (Wedding et al. 2003, Schoch et al. 2001). Bei einer großen Zahl an Patienten ist allerdings ein normales Karyotyp zu finden, der prognostisch als intermediär eingestuft wird (Kern et al. 2004).

## 2.7 Immunphänotypisierung

Die Immunphänotypisierung der Blasten beruht auf dem Nachweis von membranständigen oder intrazellulären Antigenen mit Hilfe fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper (mAK). Die monoklonalen Antikörper, die dasselbe Antigen erkennen, wurden Differenzierungsgruppen (CD = cluster of differentiation) zugeteilt. In der heutigen Nomenklatur wird mit CD allerdings das Zellantigen bezeichnet (Fonatsch et al. 2003).

Mit dieser immunologischen Leukozytentypisierung kann das Erscheinungsbild der AML festgelegt werden. Dabei werden myeloische, monozytäre und lymphatische Marker unterschieden, welche die Grundlage für die Einteilung in eine Akute Myeloische Leukämie, in eine Akute Lymphatische Leukämie (ALL) oder in eine biphenotypische Leukämie bilden. Zudem kann die Immunphänotypisierung auch bei der Diagnostik von morphologisch und zytochemisch nicht eindeutig abgrenzbaren Subtypen nach FAB (M0, M7), bei der Charakterisierung des Reifegrades einer Blastenpopulation und bei der Feststellung von Sonderformen mit aberranter Antigenexpression hilfreich sein (Fonatsch et al. 2003, Büchner et al. 1999, Bene et al. 1999).

Auf die hervorgehobenen Antigene wird in dieser Arbeit noch näher eingegangen.

Immunologische Marker für eine myeloische bzw. monozytäre Differenzierung sind:

- CD 11, **CD 13**, CD 14, CD 15, **CD 33**, CD w65.

Die Oberflächenantigene der lymphatischen Reihe werden aufgeteilt:

- CD 2, **CD 3**, **CD 4**, CD 5, CD 7, **CD 8** weisen auf die T-Zell-Reihe hin.
- **CD 10**, **CD 19**, CD 20, CD 22, CD 24 sind für die B-Zell-Reihe von besonderer Bedeutung.

Die Antigene **CD 34**, CD 117 und HLA-DR sind Ausdruck sehr unreifer Zellformen. (Wilhelm et al. 2000, Büchner et al. 1999, Scheinberg et al. 1997, EWGCCA 1996, Bradstock et al. 1994, Macey 1994)

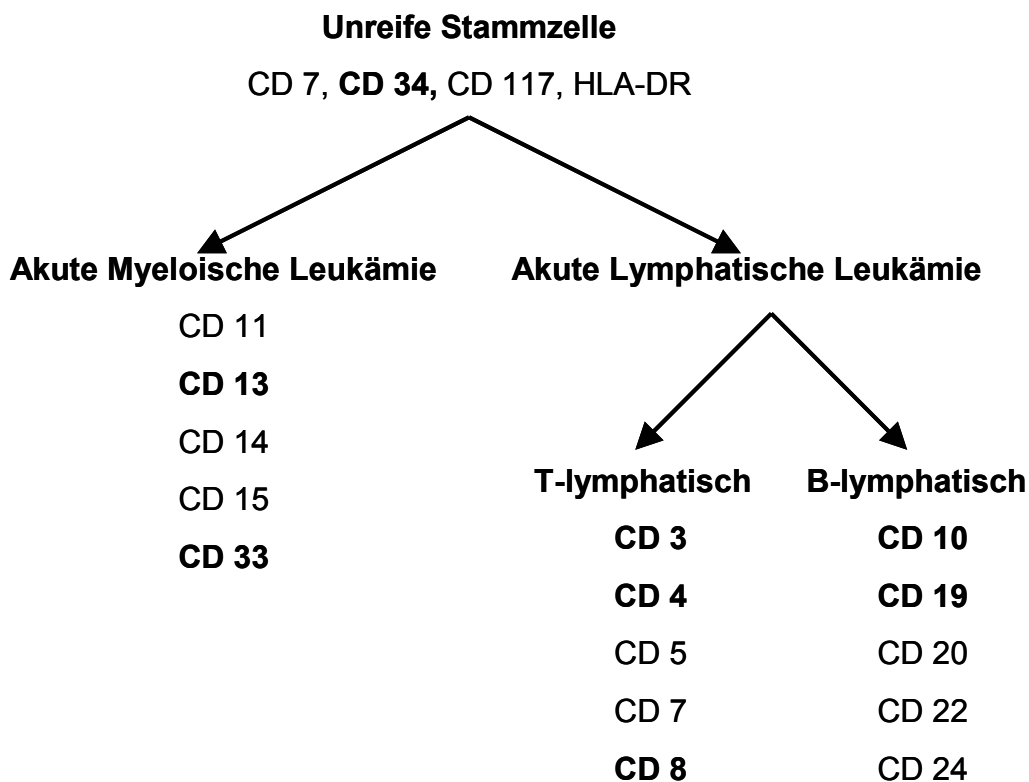


Abb.1: Darstellung der Einteilung der verschiedenen akuten Leukämien mit den zugehörigen charakteristischen Oberflächenantigenen. Auf die hervorgehobenen Antigene wird in der Arbeit noch näher eingegangen.

Die Forschung beschäftigte sich in den letzten Jahren insbesondere mit dem Nutzen der Immunphänotypisierung zur Prognoseabschätzung bei Akuter Myeloischer Leukämie und dem Nachweis persistierender Leukämiezellen (Minimal Residual Disease) anhand ihrer aberranten Antigenexpression. Inwieweit eine Verlaufsbeobachtung und eine Verlaufsvorhersage mittels der Oberflächenantigene möglich sind, wird noch zu klären sein.

## 2.8 Therapie

Die Behandlung der Akuten Myeloischen Leukämie kann trotz großer Fortschritte durch eine intensive Chemotherapie nicht als standardisiert gelten (Kern et al. 2003). Daher behandeln die meisten klinischen Zentren ihre Patienten nach anerkannten Studienprotokollen.

Grundsätzlich kommen Antimetabolite (Cytarabin, Fludarabin oder 6-Thioguanin), Anthrazykline (Daunorubicin, Idarubicin oder Mitoxantron) und Alkylanzien (Cyclophosphamid) zur Anwendung.

Therapieoptionen sind Induktionstherapie, Konsolidierungstherapie, Erhaltungstherapie, Transplantation und Salvage-Therapie, die entsprechend dem Algorithmus in Abbildung 2 eingesetzt werden.

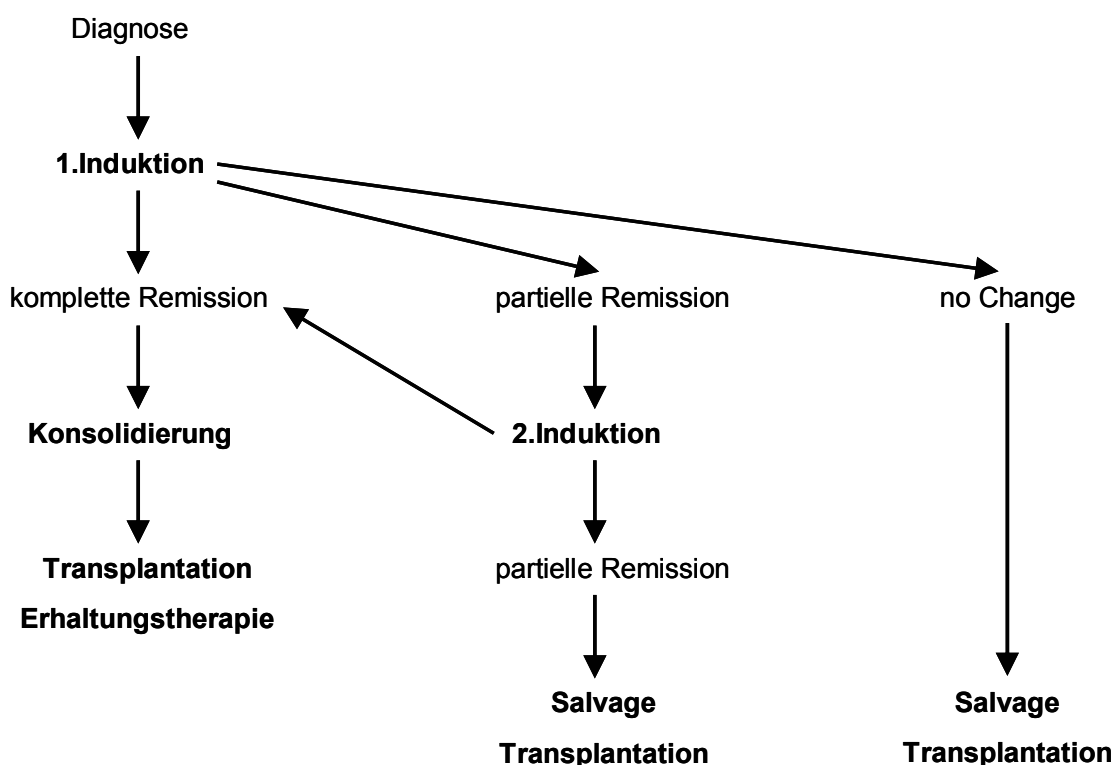


Abb.2: Therapieablauf bei der Akuten Myeloischen Leukämie.

Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten wurden nach folgenden Therapieschemata behandelt:



Nach der Diagnosestellung wird mit der ersten Induktion begonnen, um eine weitgehende Reduktion der leukämischen Zellmasse sowie eine Wiederherstellung der normalen Hämatopoese zu erreichen:

- Mit dem am häufigsten angewandten „3+7“-Programm, also der Kombination von Cytarabin (Ara-C) über sieben Tage mit Idarubicin (oder einem anderen Anthrazyklin) für drei Tage bei Patienten unter 60 Jahren, werden längerfristige Remissionsraten zwischen 60 - 82% erreicht (Berman et al. 1991, Vogler et al. 1992, Kimby et al. 2001).
- Von Cytarabin über sieben Tage und Mitoxantron für drei Tage profitieren Patienten über 60 Jahre (Hochrisikopatienten) (MacCallum et al. 1995, Liu Yin et al. 1991).
- Eine Sonderstellung nimmt die AML M3 (nach FAB-Klassifikation) ein. Bei einer Induktionstherapie mit All-trans-Retin-Säure werden besonders gute Ergebnisse erzielt (Fenaux et al. 2001).

Erreicht der Patient nur eine partielle Remission wird eine zweite Induktion mit Cytarabin über sieben Tage und Mitoxantron für drei Tage angeschlossen (OSHO-Protokoll).

Bei älteren Patienten werden auch Antrazykline in liposomaler Zubereitung (Caelyx) als initiale Therapie mit kurativem Ansatz eingesetzt.

Zeigt das Knochenmark nach der Induktion eine komplette Remission, wird mit der Konsolidierungstherapie zur Elimination weiterer leukämischer Zellen fortgesetzt (Wilhelm et al. 2000):

- Die erste Konsolidierungstherapie entspricht dem gleichen Therapiezyklus, der zur kompletten Remission führte.
- Bei der zweiten Konsolidierungstherapie wird Cytarabin über fünf Tage und Mitoxantron für zwei Tage gegeben.
- Wird eine dritte Konsolidierung durchgeführt (bei Patienten unter 60 Jahren), setzt sich diese aus Cytarabin über fünf Tage und Idarubicin für zwei Tage zusammen. (OSHO-Protokoll).

Eine allogene Transplantation mit dem Ziel der Eradikation von residuellen Leukämiezellen zur Remissionssicherung wird für alle Patienten mit histokompatiblen Spendern bei prognostisch ungünstigen Risikofaktoren angestrebt (Kern et al. 2004,

Wilhelm et al. 2000). Bei Patienten, bei denen aus körperlichen oder persönlichen Gründen, meistens durch ein Alter von über 60 Jahren bedingt, keine Transplantation erfolgen kann, schließt sich als Ersatz eine myelosuppressive zyklische Erhaltungstherapie über einen längeren Zeitraum an.

Als supportive Therapie insbesondere bei älteren Patienten kann der Wachstumsfaktor G-CSF verabreicht werden. Vorteil dieser Therapie ist eine Reduktion der Neutropenie und die damit verbundene Reduktion der verabreichten Antibiotika sowie die Verkürzung der Hospitalisierung (Ganser et al. 1997).

Eine Salvage-Therapie wird angesetzt, wenn keine Veränderung der Blastenzahl im Knochenmark oder nur eine partielle Remission nach der Induktionstherapie aufgetreten ist. Dabei wird hochdosiertes Cytarabin in Kombination mit Cyclophosphamid (hAC-Protokoll) verabreicht.

Falls unter der Therapie ein Rezidiv auftritt oder die AML primär refraktär ist, wird auf ein anderes Therapieschema gewechselt. Für Ara-C in Kombination mit Idarubicin und Fludarabin (Ida/Flag-Protokoll) wurden Remissionsraten zwischen 36 - 59% festgestellt (Jackson 2004). Die Salvage-Therapie stellt eine weitere Möglichkeit dar. Kommt es nach durchgeführter Transplantation zu einem Rezidiv, erfolgt eine Transfusion von Donor-Lymphozyten (DLI) oder eine zweite Transplantation (Kern et al. 2004).

### 3. Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Analyse der Expression von Oberflächenantigenen im Verlauf der Akuten Myeloischen Leukämie.

Die Suche nach einem Parameter, welcher den Verlauf der Erkrankung beschreiben und ein Rezidiv vorzeitig anzeigen kann, stellt den Ausgangspunkt für diese Arbeit dar. Besonderes Augenmerk wird hierbei auf die myeloischen Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34 gelegt. Es soll untersucht werden, ob anhand der Verlaufsbeobachtung der Expression dieser Oberflächenantigene über einen längeren Zeitraum hinweg die Entwicklung der AML darzustellen ist. Von speziellem Interesse ist die Frage, ob sich durch die Oberflächenantigene Rezidive tatsächlich erfassen, frühzeitig erkennen oder möglicherweise sogar vorhersagen lassen.

Folgende Zusammenhänge sollen näher betrachtet werden:

1. Lässt sich eine Abhängigkeit der Kurvenverläufe der Oberflächenantigene vom Alter oder vom Subtyp der AML ermitteln?
2. Um Aussagen über eine Korrelation zwischen dem Kurvenverlauf der Oberflächenantigene und dem Verlauf der AML treffen zu können, wurde spezielles Augenmerk auf das Auftreten von Rezidiven und deren Häufigkeit bei den unterschiedlichen Verläufen der Oberflächenantigene gelegt. Dabei wird auch der Therapieeinsatz berücksichtigt.
3. Darüber hinaus soll versucht werden, ein den Verlauf bestimmenden myeloischen Marker als Leitwert zu etablieren. Ein weiteres Ziel der Arbeit ist die Festlegung einer Richtgröße für den Anstieg der Oberflächenantigene, der ein Rezidiv charakterisiert.
4. Das Verhalten der Kurvenverläufe einzelner myeloischer Marker zueinander soll auf eine mögliche Aussagekraft bezüglich eines drohenden Rezidivs überprüft werden.
5. Eine genauere Betrachtung des zeitlichen Zusammenhangs zwischen dem Verlauf der Oberflächenantigene und den Ergebnissen der Zytomorphologie soll Aufschluss über die Möglichkeit einer Rezidivfrüherkennung oder Vorhersage geben.

6. Einen weiteren wichtigen Punkt der Arbeit stellt die Untersuchung der Bedeutung der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 für den Verlauf der AML dar.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Patientenkollektiv und Datenerfassung

In dieser Arbeit wurden die Daten von 32 Patienten erfasst, welche sich vom Januar 2002 bis April 2004 wegen Akuter Myeloischer Leukämie in der Klinik für Innere Medizin 2 der Friedrich-Schiller-Universität Jena in Behandlung befanden.

Das Patientenkollektiv teilte sich in 19 Frauen und 13 Männer, welche zu Beginn der Untersuchungen zwischen 21 und 78 Jahren alt waren. Der Mittelwert des Alters betrug 55 Jahre und der Median lag bei 58,5 Jahren.

Drei Patienten hatten ein Myelodysplastisches Syndrom und 29 Patienten waren an AML erkrankt. Dabei konnte folgende Einteilung nach der FAB-Klassifikation getroffen werden:

Tab.3: Übersicht über die Verteilung der Patienten (Anzahl = n) in den verschiedenen Subtypen der AML entsprechend der FAB-Klassifikation

Subtyp	M0	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	sek. AML
n= Patienten	1	9	6	4	4	1	2	0	2

Innerhalb des Untersuchungszeitraumes sind 13 Patienten verstorben.

Folgende Methoden kamen zur Anwendung:

Knochenmarkuntersuchung

Durchflusszytometrie

Mathematisch-statistische Auswertverfahren

## **4.2 Knochenmarkuntersuchung**

Zur Diagnosesicherung einer Leukämie sowie zur Therapie- und Verlaufskontrolle werden Knochenmarkpunktionen durchgeführt.

Bei der Akuten Myeloischen Leukämie werden im Krankheitsverlauf die Knochenmarkpunktionen zu folgenden Zeitpunkten entnommen:

- zur Diagnosesicherung vor der Therapie
- am 15.Tag nach einer Induktionstherapie in der Phase der Aplasie
- nach einer Induktionstherapie nach Regeneration des Blutbildes
- nach einer Konsolidierungstherapie.

Die Punktion wird an der Spina iliaca superior posterior vorgenommen. Es erfolgt eine zweimalige Aspiration von Knochenmarkzellen sowie eine Biopsie. Das erste Aspirat wird mit Zitratlösung als Antikoagulanzen versetzt, die Markbröckchen werden auf einem Objektträger ausgestrichen, nach Pappenheim gefärbt und mikroskopisch untersucht. Dabei wird das Knochenmark auf den Gehalt an myeloischen Blasten geprüft. Zusätzlich wird das Verhältnis der erythroiden Vorstufen zu den Leukozyten beurteilt. Neben der Zytologie können durch zytochemische Spezialfärbungen (z.B. Myeloperoxidase, Sudanschwarz) die Knochenmarkzellen auf Grund ihres spezifischen Anfärbeverhaltens charakterisiert und der Subklassifikation nach FAB zugeordnet werden. Der durch die Biopsie gewonnene Knochenmarkzylinder wird histologisch aufgearbeitet und ergänzt durch den direkten Einblick in die Knochenmarkstruktur die ermittelten Ergebnisse.

Das zweite Aspirat wird mit Heparin versetzt und die Zellen mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich des Immunphänotyps untersucht.

Weitere Entnahmen von Knochenmarkzellen können zur Chromosomenanalyse, zur Stammzelluntersuchung oder zur gerichtsmedizinischen Analyse des Knochenmarks nach Transplantation durchgeführt werden.

### 4.3 Durchflusszytometrie

Zur Beurteilung von Partikeln in wässriger Suspension wird die Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorters) eingesetzt. Die Analyse von Einzelzellen in Suspension erfolgt auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften.

Die im Probenröhrchen vorliegende Zellsuspension wird zur Analyse über eine Stahlkapillare durch Überdruck in die Messküvette eingeführt. Durch die hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen einem definierten Messpunkt zugeführt, an dem ein Lichtstrahl auf die Zellen trifft. Die entstehende Lichtstreuung wird in verschiedenen Raumwinkeln ausgewertet und ist dabei abhängig von der Wellenlänge des Lichtes, der Partikelgröße, der Membranstruktur und den intrazellulären Bestandteilen. Die Lichtstreuung entlang des einfallenden Lichtstrahls (Vorwärtsstreulicht = forward scatter) bestimmt die Zellgröße, und das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht (Seitwärtsstreulicht = side scatter) stellt ein Maß für die intrazelluläre Granularität dar (Terstappen et al. 1995). Dadurch werden eine Zellerkennung und eine Zellcharakterisierung möglich. Zusätzlich können durch Immunfluoreszenz die Zellmerkmale genauer differenziert werden. Die dazu verwendeten Antikörper, die direkt oder indirekt mit fluoreszierenden Farbstoffen gekoppelt werden, sind gemeinsam bei einer einzigen Wellenlänge (488 nm) anregbar. Auf Grund der verschiedenen Anregungs- und Emissionsfrequenzen der Fluoreszenzfarbstoffe sind die Maxima der Emissionen unterschiedlich. Optische Filter trennen diese Emissionsfrequenzen und ermöglichen somit Mehrfarbanalysen. Durch Impuls- und Datenbearbeitung werden diese analogen Messwerte umgewandelt und die Ergebnisse digital in eine auswertbare und übersichtliche Form gebracht.

Bei einer einparametrischen Auswertung erfolgt die Darstellung im Histogramm. Dabei wird die Anzahl der Zellen (Ordinate) gegen die Fluoreszenzintensität (Abszisse) aufgetragen. Mit Hilfe dieses Histogramms kann die Verteilung eines Parameters (Zelleigenschaft) in einer Zellpopulation beschrieben werden (Nebe et al. 2000).

Bei der Auswertung von zwei Parametern werden die Messdaten zweier verschiedener Eigenschaften einer Zelle zueinander in Relation gesetzt und in Dot

Plots (jede Zelle wird durch einen Punkt im xy-Diagramm markiert) dargestellt. Dadurch entstehen Punktwolken, die Zellen mit ähnlichen Eigenschaften repräsentieren.

Durch elektronische Fenster über den Punktwolken können einzelne Populationen differenziert werden.

In der Diagnostik der Akuten Myeloischen Leukämie werden die drei Farbstoffe Grün (FITC), Rot (PerCP) und Orange (PE) eingesetzt.

Die in der Knochenmarkpunktion gewonnene Zellsuspension wird mit dem jeweiligen farbstoffmarkierten Antikörper in folgender Konzentration versetzt:

- 100 µl Knochenmarkaspirat mit Heparin
  - + 20 µl mit fluoreszierenden Farbstoffen markierte Antikörper
- und im Durchflusszytometer untersucht.

In der Kontrollanalyse mit FITC-Färbung von CD 45 (Oberflächenantigen aller Leukozyten) und PE-Färbung von CD 14 (Oberflächenantigen der Monozyten) wird durch Markierung der Punktwolke, die der Lymphozytenpopulation entspricht, das Lymphozytenfenster festgelegt. In diesem Fenster werden alle weiteren Auswertungen durchgeführt

Jeweils zwei mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oberflächenantigene werden gegeneinander im Vier-Quadranten-Feld ausgewertet:

- CD 4 FITC / CD 8 PE
- CD 4 FITC / CD 3 PerCP
- CD 8 PE / CD 3 PerCP
- CD 10 FITC / CD 19 PE
- CD 10 FITC / CD 34 PerCP
- CD 19 PE / CD 34 PerCP
- CD 7 FITC / CD 13 PE
- CD 7 FITC / CD 33 PerCP
- CD 13 PE / CD 33 PerCP



Auf diese Weise kann die prozentuale Anzahl der Oberflächenantigene in der Lymphozytenpopulation bestimmt werden (Abbildung 3).

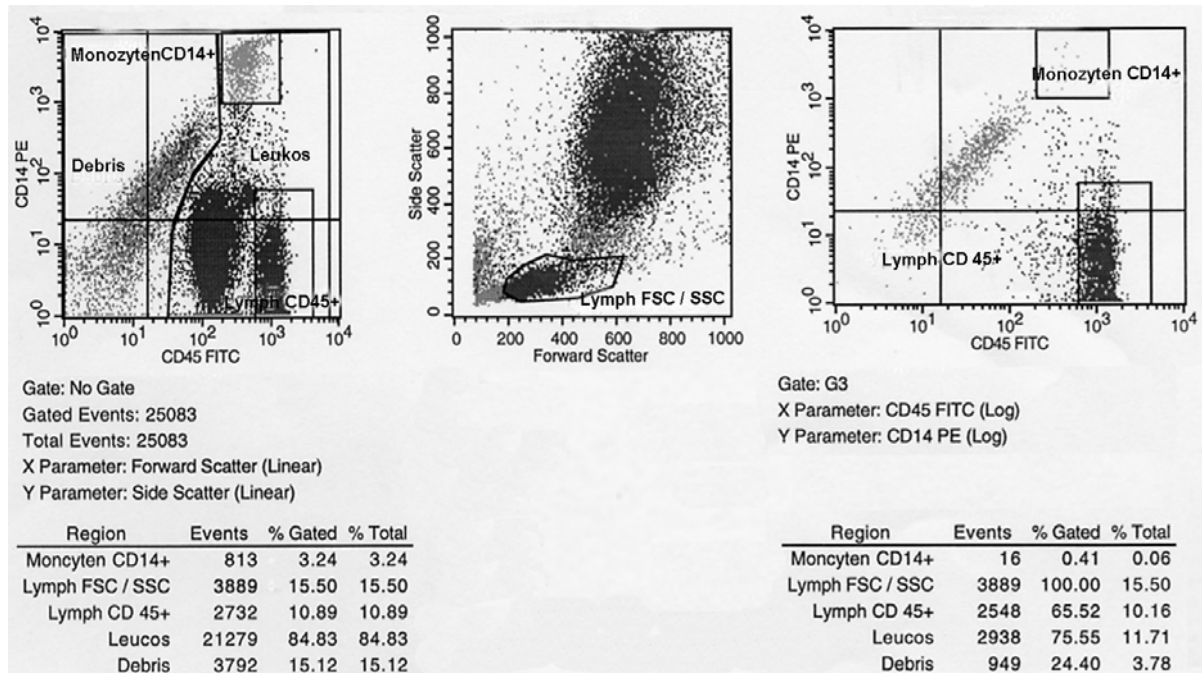


Abb.3.1: Abbildungen zur Durchflusszytometrie: In der Kontrollanalyse mit FITC markiertem CD 45 und PE markiertem CD 14 wird das Lymphozytenfenster bestimmt.

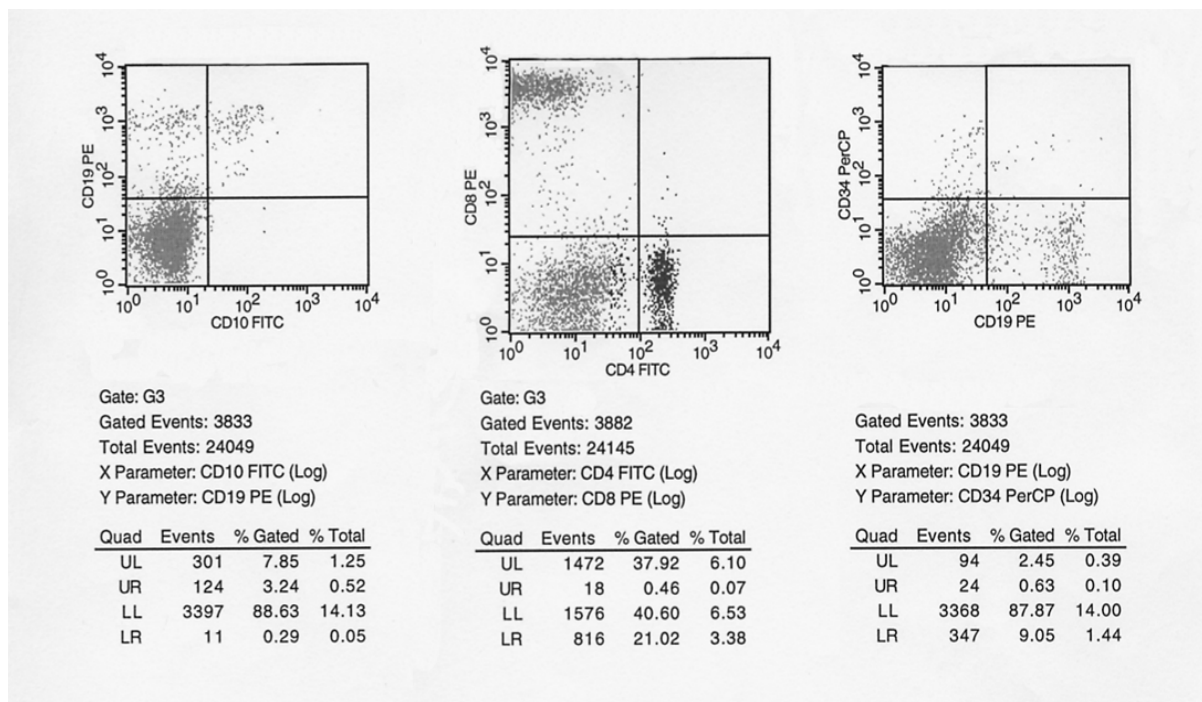


Abb.3.2: Jeweils zwei mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oberflächenantigene werden im Vier-Quadranten-Feld gegeneinander ausgewertet und damit deren prozentualer Anteil bestimmt.

## 4.4 Mathematisch-statistische Auswertverfahren

Die zu vergleichenden Stichproben stammten von verschiedenen Patientengruppen, daher handelte es sich um unabhängige Stichproben. Zum Vergleich von zwei unabhängigen und nicht normalverteilten Stichproben diente der Mann-Whitney-Test. Die Häufigkeiten von Ereignissen wurden anhand von Vierfeldertafeln mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests geprüft.

Die Signifikanzprüfung erfolgte auf einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Damit wird nur ein Testergebnis von  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant bezeichnet.

## 4.5 Methodik

Die aus den Knochenmarkpunktionen gewonnenen und mikroskopisch bzw. durchflusszytometrisch aufgearbeiteten Daten wurden für jeden der 32 Patienten zusammengestellt und jeweils der Verlauf der Oberflächenantigene graphisch dargestellt. Zusätzlich wurden aus den Patientenakten die klinischen Daten erhoben, um die Therapie und den klinischen Verlauf der Erkrankung erfassen zu können.

Die 32 Patienten wurden entsprechend ihrem Verlauf der Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34 in zwei Gruppen eingeteilt.

Als entscheidendes Kriterium wurde hierbei das Verhalten der Kurvenverläufe der Oberflächenantigene in Bezug auf den Schwellenwert von 30% Zellen im Knochenmark, welche positiv für das jeweilige Oberflächenantigen sind, herangezogen. Der in der vorliegenden Arbeit festgelegte Schwellenwert von 30% orientiert sich an dem gemäß der FAB-Klassifikation bestehenden Kriterium von >30% Blasten im Knochenmark für die Diagnose einer AML (Büchner et al. 1999, Lübbert et al. 2002). Weiterhin wurden die Messwertdifferenzen der Oberflächenantigene im Beobachtungszeitraum sowie deren Kurvenverlauf im Verhältnis zueinander orientierend mit einbezogen.

Dabei ergaben sich:

- stabile Verläufe der Oberflächenantigene
- instabile Verläufe der Oberflächenantigene.

Anhand der zwei Abbildungen (Abbildungen 4 und 5) soll exemplarisch die Methodik der Untersuchungen erklärt werden.

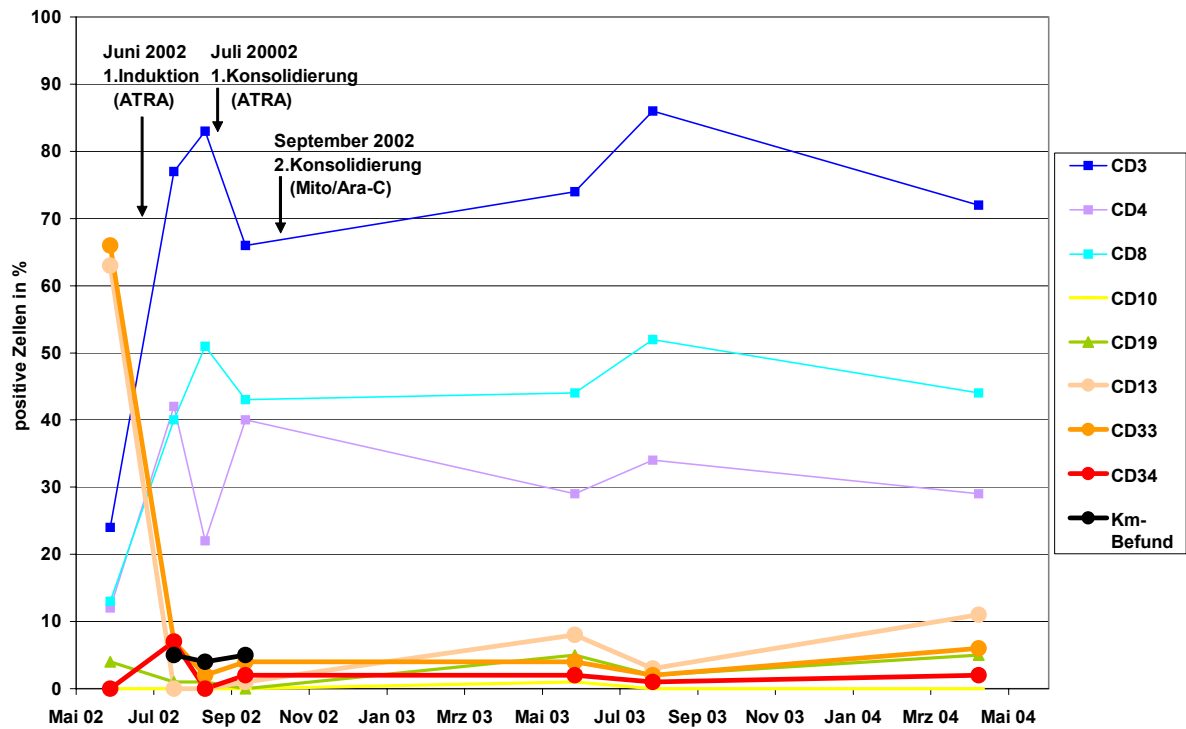


Abb.4: Stabiler Verlauf der Oberflächenantigene auf den leukämischen Vorläuferzellen am Beispiel einer Patientin.

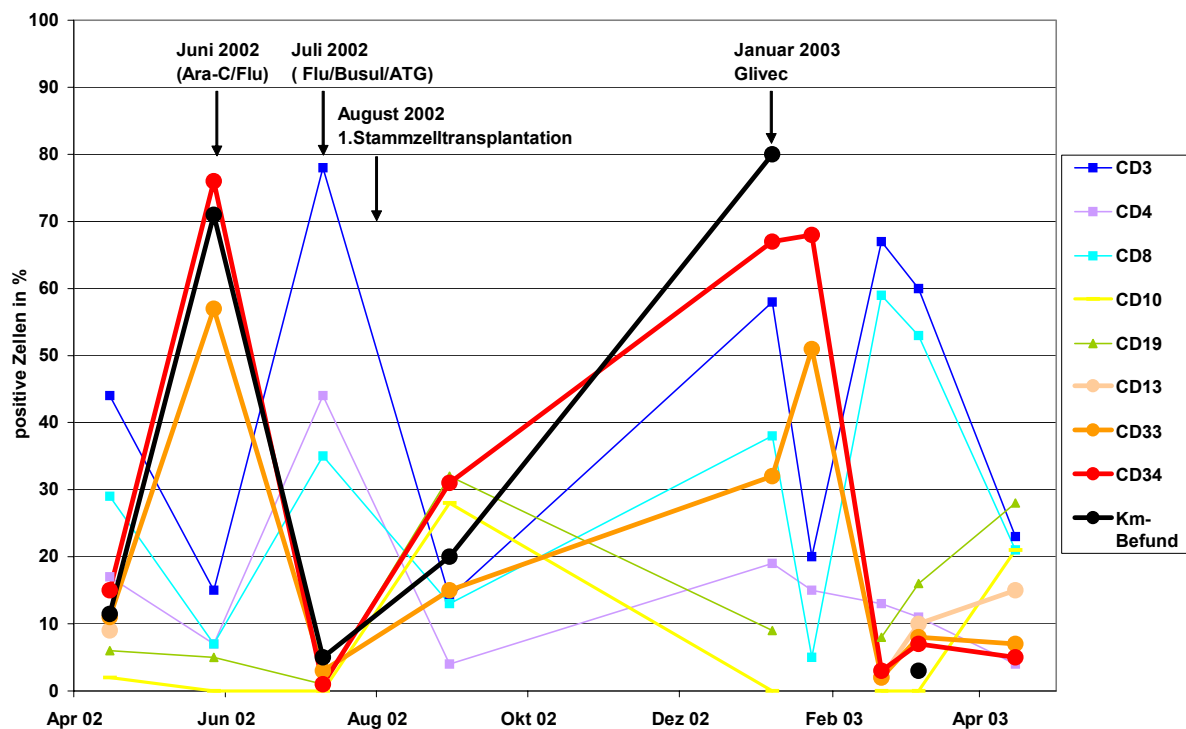


Abb.5: Instabiler Verlauf der Oberflächenantigene auf den leukämischen Vorläuferzellen am Beispiel eines Patienten.

In Abbildung 4 wird ein stabiler Kurvenverlauf exemplarisch am Verlauf der Oberflächenantigene einer Patientin dargestellt. Bei Diagnosestellung wurde ein sehr hoher Prozentsatz an Zellen mit myeloischen Oberflächenantigenen gefunden, der durch die gesteigerte Blastenzahl im Knochenmark bestätigt wird. Nach der ersten, maximal zweiten Induktionstherapie fällt der Prozentsatz an Zellen, die myeloische Marker exprimieren, sehr stark ab. Im weiteren Verlauf stabilisieren sich die Zellen mit myeloischen Oberflächenantigenen unter Konsolidierungstherapie auf einem niedrigen Niveau unter 30%. Dementsprechend wurden die Patienten, die keine erheblichen Kurvenschwankungen aufwiesen, in die Gruppe mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene eingeordnet.

Bei den Patienten, die der Gruppe mit instabilem Kurvenverlauf der Oberflächenantigene zugeteilt wurden, sind zum Zeitpunkt der Diagnose ebenfalls hohe Prozentwerte an Zellen, welche die myeloischen Oberflächenantigene CD 13, CD 33 oder CD 34 aufweisen, zu verzeichnen. Nach der Induktionstherapie kann sowohl ein Abfall des Prozentsatzes der Zellen mit myeloischen Markern, als auch deren Persistenz auf hohem Niveau eintreten. Wie am Beispiel des Markerprofils eines Patienten in Abbildung 5 ersichtlich wird, ist für diese Patienten ein stark schwankender Kurvenverlauf, der auch weit über die Schwelle von 30% hinausgehen kann, charakteristisch.

Da es ein Anliegen der Arbeit ist, die Aussagekraft der myeloischen Oberflächenantigene hinsichtlich des Verlaufs der AML sowie deren Möglichkeiten zur Früherkennung oder Vorhersage von Rezidiven zu überprüfen, wurde bei der Auswertung das Verhalten der Oberflächenantigene in Bezug auf den Krankheitsverlauf der Akuten Myeloischen Leukämie untersucht. Dabei dienten die Ergebnisse der Zytomorphologie als Vergleichskriterium.

Bei 19 von 32 Patienten wurde die Diagnose schon vor Beginn des Untersuchungszeitraums gestellt, somit existieren von diesen Patienten aus der vorangegangenen Zeit keine Daten zum Immunphänotyp. Daher wurde bei diesen Patienten für die statistischen Berechnungen der Beginn eines neuen Therapieschemas als Ausgangspunkt für die Verlaufsbeobachtung festgelegt.

## 5. Ergebnisse

32 Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie, die an der Klinik für Innere Medizin 2 der FSU Jena zwischen den Jahren 2002 und 2004 behandelt wurden, sind in die Untersuchung aufgenommen worden. Dabei wurde der Prozentsatz an myeloischen Vorläuferzellen und das Muster der Expression von Oberflächenantigenen auf den Leukämiezellen wenn verfügbar zum Zeitpunkt der Diagnosestellung untersucht, darüber hinaus aber auch während des Krankheitsverlaufs und beim Auftreten von Rezidiven.

### 5.1 Gruppeneinteilung

Die 32 Patienten wurden entsprechend ihres Verlaufs der Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34 in zwei Gruppen eingeteilt.

Es konnte dabei prinzipiell unterschieden werden zwischen Patienten mit stabilem und instabilem Verlauf der Oberflächenantigene. Bei den Patienten mit stabilem Verlauf wiesen die Zellen im Knochenmark, welche die myeloischen Oberflächenantigene exprimieren, nach der initialen Reduktion nur noch wenige Veränderungen auf. Folglich bewegten sich die Kurvenverläufe mit nur geringen Schwankungen unterhalb des Schwellenwertes von 30% (Abbildung 6). Bei Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene wiesen die Zellen ebenfalls ein für myeloische Vorläuferzellen typisches Muster auf, unterlagen aber im Beobachtungszeitraum starken Schwankungen. Diese instabilen Verläufe zeigten einen sehr variablen Kurvenverlauf und überschritten den Schwellenwert zum Teil auch mehrfach (Abbildung 7).

Dabei ergaben sich:

- 15 stabile Verläufe der Oberflächenantigene
- 17 instabile Verläufe der Oberflächenantigene

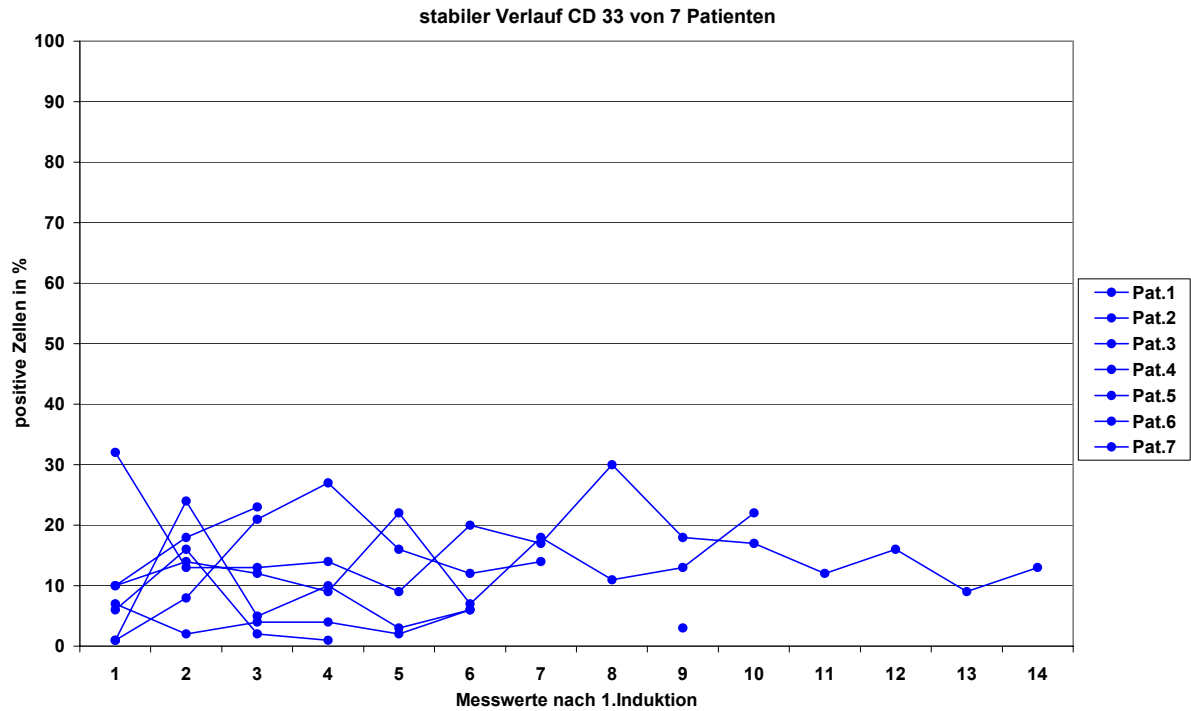


Abb.6: Graphische Darstellung aller Messwerte des CD 33 bei sieben Patienten (mit statistisch auswertbarem Therapiebeginn) mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene.

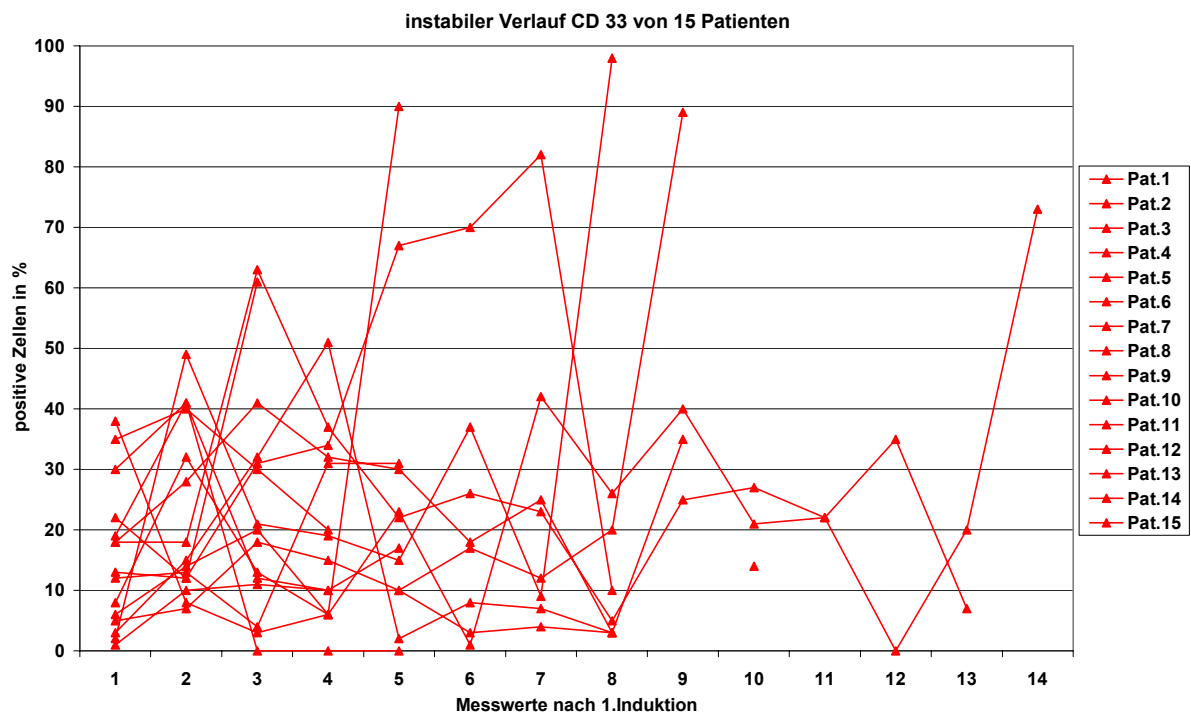


Abb.7: Graphische Darstellung aller Messwerte des CD 33 bei 15 Patienten (mit statistisch auswertbarem Therapiebeginn) mit instabilem Verlauf der Oberflächeantigene.

## 5.2 Altersabhängigkeit

Da myeloische Leukämien mit zunehmendem Lebensalter häufiger auftreten und zudem eine schlechtere Prognose aufweisen, wurde der Einfluss des Alters auf das Verhalten der Oberflächenantigene auf den Leukämiezellen untersucht. Um zu prüfen, ob sich die Leukämiezellen unter Therapie bei verschiedenen Altersgruppen unterschiedlich verhalten, wurde das Alter zum Zeitpunkt der Krankheitsmanifestation zum Kurvenverlauf der Oberflächenantigene während der Behandlung in Beziehung gesetzt.

17 Patienten zeigten im Beobachtungszeitraum einen instabilen Verlauf der Oberflächenantigene. Sie waren zu Krankheitsbeginn zwischen 21 und 78 Jahre alt. Die Spannweite liegt bei 57 Jahren. Die Altersverteilung dieser 17 Patienten ist rechtsverschoben in das höhere Lebensalter, wie in Abbildung 8 und am Stichprobenmedian von 63 Jahren ersichtlich wird. Der Mittelwert beträgt 60,7 Jahre, ist aber auf Grund der starken Streuung weniger repräsentativ. Die Stichproben-Quartile  $q_{0,25} = 56$ ,  $q_{0,5} = 63$  und  $q_{0,75} = 69$  erlauben eine gute Darstellung der Altersverteilung.

15 Patienten zeigten einen stabilen Verlauf der Oberflächenantigene. Bei ihnen lag das Alter zum Zeitpunkt des Krankheitsausbruchs zwischen 29 und 66 Jahren. Die Spannweite beträgt 37 Jahre. Die Streuung ist relativ gering, sodass der Mittelwert mit 48,6 Jahren vom Stichprobenmedian mit 46 Jahren nur leicht differiert. Die Stichprobenquartile  $q_{0,25} = 39,5$ ,  $q_{0,5} = 46$  und  $q_{0,75} = 60,5$  geben einen Überblick über das Alter zum Manifestationszeitpunkt, welcher bei diesen Kurvenverläufen eher im mittleren Lebensalter liegt (Abbildung 8).

Den eindeutigsten Unterschied zwischen beiden Gruppen, dargestellt in Abbildung 9, zeigt der Altersmedian, welcher mit 63 Jahren bei Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene deutlich höher liegt als der Altersmedian von 46 Jahren bei Patienten mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene. Der Mann-Whitney-Test unterstützt mit einem p-Wert von 0,006 dieses Ergebnis.

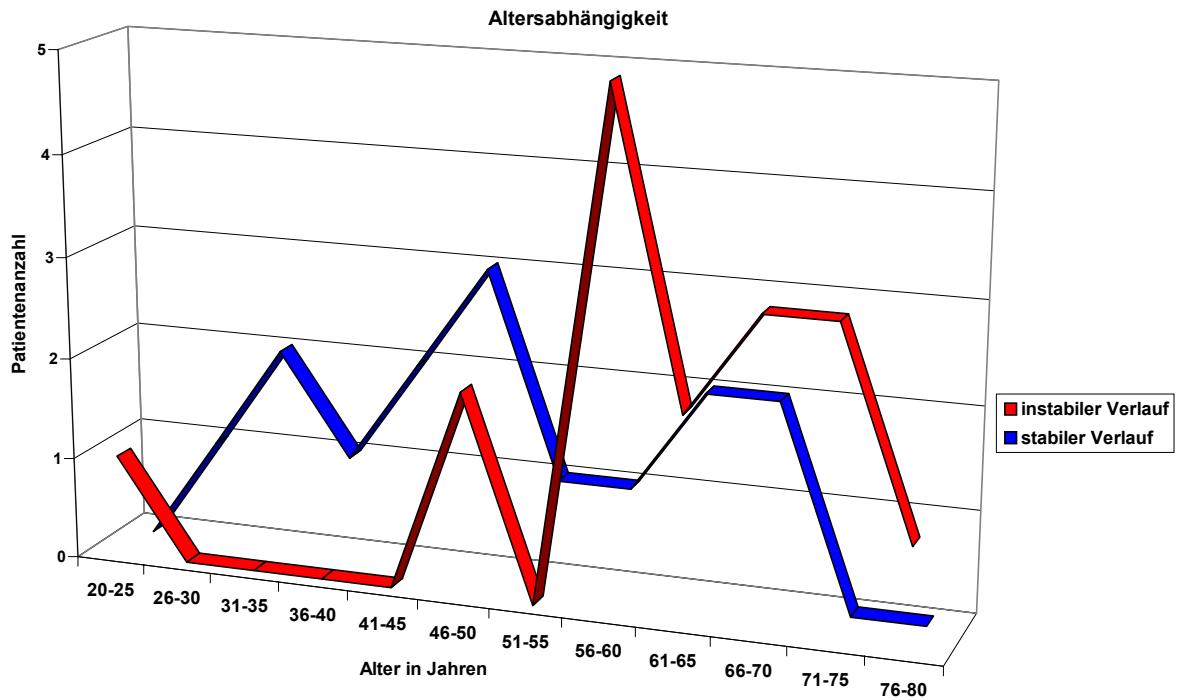


Abb. 8: Altersverteilung bei Patienten mit stabilem und instabilem Verlauf der Oberflächenantigene zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.

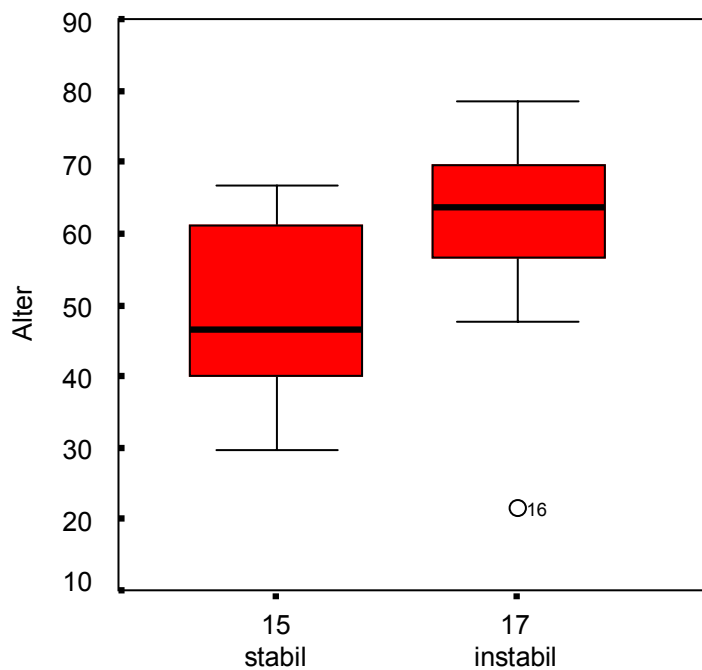


Abb.9: Vergleich des Altersmedians bei Patienten mit stabilem und instabilem Verlauf der Oberflächenantigene zum Zeitpunkt der Diagnosestellung.



### 5.3 Einteilung in Subtypen

Die Akute Myeloische Leukämie wird anhand morphologischer und zytochemischer Kriterien den verschiedenen Subtypen nach der FAB-Klassifikation zugeordnet. Bei der Frage, ob die verschiedenen Subtypen der AML einen Einfluss auf das Verhalten der Oberflächenantigene haben oder einen bestimmten Verlauf bedingen, hat sich folgendes, in Tabelle 4 und Abbildung 10 dargestelltes Ergebnis gezeigt

Tab.4: Häufigkeit der verschiedenen Subtypen nach FAB-Klassifikation beim stabilen und instabilen Verlauf der Oberflächenantigene.

	stabiler Verlauf (15)	instabiler Verlauf (17)
AML M0	0 (0%)	1 (6%)
AML M1	4 (24%)	5 (29%)
AML M2	3 (20%)	3 (18%)
AML M3	3 (20%)	1 (6%)
AML M4	1 (7%)	3 (18%)
AML M5	0 (0%)	1 (6%)
AML M6	0 (0%)	2 (12%)
MDS	3 (20%)	0 (0%)
Sek. AML	1 (7%)	1 (6%)

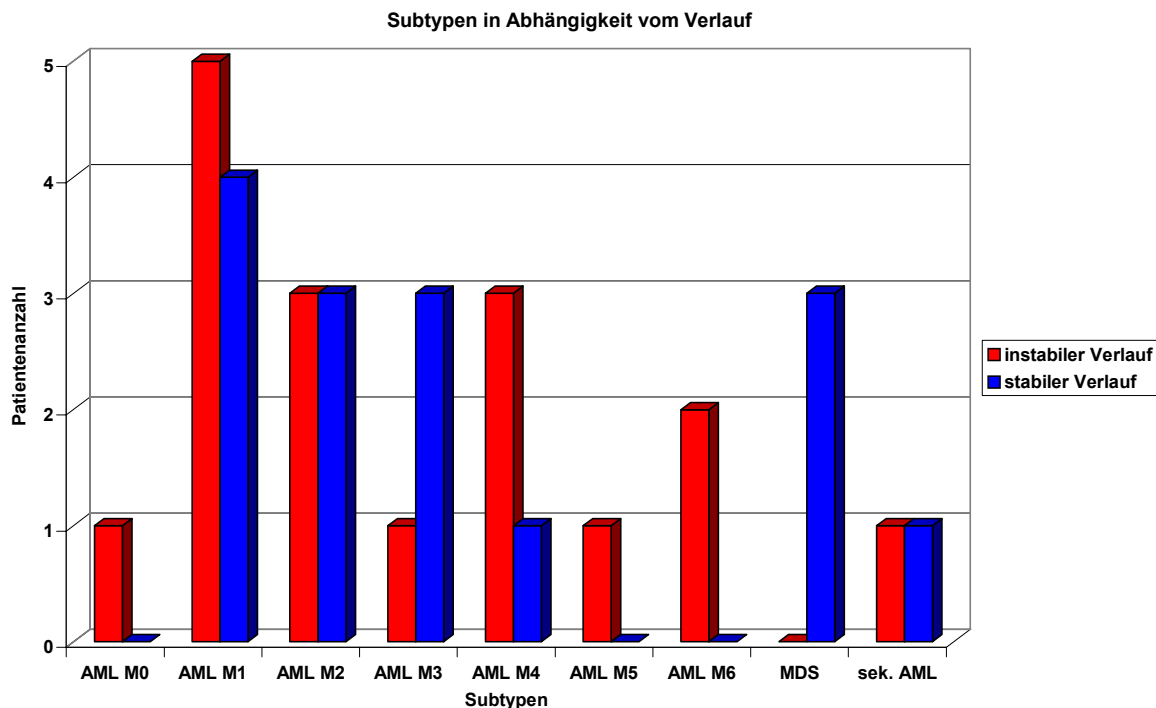


Abb.10: Verteilung der Subtypen nach FAB-Klassifikation beim stabilen und instabilen Verlauf der Oberflächenantigene.

Am häufigsten ist die AML M1 und M2 in beiden Gruppen vertreten, die auch allgemein die häufigsten Subtypen der AML sind.

Beim stabilen Verlauf ist vermehrt die AML M3 zu finden, ebenso wie alle Myelodysplastischen Syndrome einen stabilen Verlauf aufweisen.

Dagegen sind die Subtypen AML M0, AML M4, AML M5 und AML M6 hauptsächlich mit einem instabilen Verlauf assoziiert. Bei keinem Patienten wurde eine AML M7 diagnostiziert.

Im Bezug auf die Patienten mit stabilem und instabilem Verlauf der Oberflächenantigene konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen der FAB-Klassifikation festgestellt werden.

## 5.4 Rezidivhäufigkeit

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass es unterschiedliche Verläufe mit mehr oder weniger stark variablen Anteilen von myeloischen Vorläuferzellen gibt, sollte weiterführend untersucht werden, ob diese Veränderungen mit dem Auftreten von Rezidiven korrelieren und ob diese tatsächlich mit Hilfe der Oberflächenantigene zu erfassen sind.

Der Verlauf des Markerprofils wurde in einen stabilen und einen instabilen Verlauf der Oberflächenantigene eingeteilt und mit den Ergebnissen aus der Zytomorphologie, die derzeit der Goldstandard für den Nachweis eines Rezidivs ist, in Beziehung gesetzt.

Als diagnostisches Kriterium für ein morphologisches Rezidiv gilt, wenn die Blastenzahl im Knochenmark die Schwelle von 20 - 30% übersteigt.

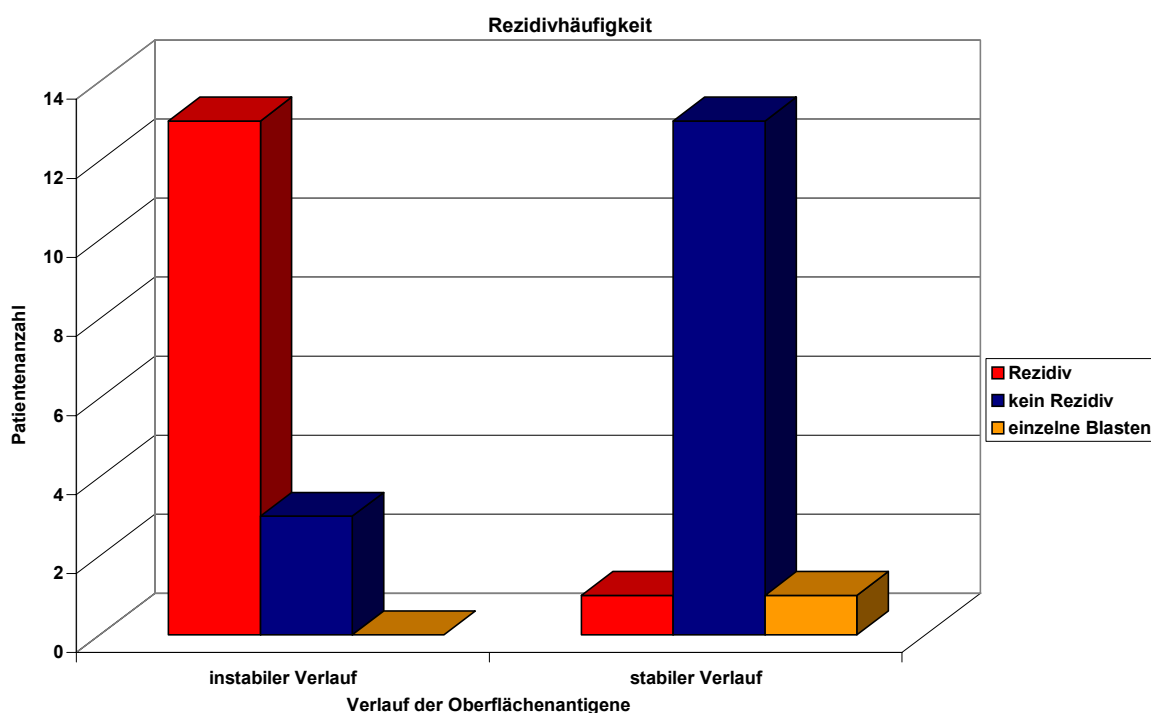


Abb.11: Abhängigkeit der Rezidivrate vom Verlauf der Oberflächenantigene, dargestellt als Vergleich des instabilen Verlaufes mit dem stabilen Verlauf der Oberflächenantigene.

Die Untersuchungen ergaben, dass bei den 17 Patienten mit instabilen Kurvenverläufen der Oberflächenantigene häufiger morphologische Rezidive auftraten.

Bei sechs Patienten (35%) ist jeweils ein Rezidiv und bei sieben weiteren Patienten (41%) wurden sogar mehrere Rezidive diagnostiziert. Drei Patienten (18%) zeigten im Beobachtungszeitraum kein Rezidiv, allerdings erreichten zwei dieser Patienten nur eine partielle Remission, zudem manifestierte sich bei einer Patientin eine Meningeosis leucaemica. Sie verstarb später an den Komplikationen der Erkrankung. Bei einer weiteren Patientin (6%) fehlen wegen wiederholter Punctio sicca die Ergebnisse der Zytomorphologie. Die klinischen Daten sind aber dennoch mit einem Rezidiv zu vereinbaren.

Wesentlich weniger Rezidive waren bei den 15 Patienten mit stabilen Kurvenverläufen der Oberflächenantigene zu beobachten.

Bei 13 Patienten (87%) wurde kein Rezidiv diagnostiziert. Ein Patient (7%) mit MDS hatte allerdings dauerhaft erhöhte Blastenanteile in Knochenmark, die aber noch knapp unter dem Schwellenwert lagen. Bei einer Patientin (7%) fehlen ausreichende Vergleichswerte aus der Knochenmarkuntersuchung, die klinischen Daten weisen jedoch nicht auf ein Rezidiv im Untersuchungszeitraum hin. Lediglich bei einer Patientin (7%) ist klinisch ein Rezidiv im Rahmen ihres Myelodysplastischen Syndroms aufgetreten.

Die Abbildung 11 veranschaulicht die im Text aufgeführten Verteilungen bezüglich aufgetretener Rezidive, erhöhter Blastenzahlen und Rezidivfreiheit für den stabilen und instabilen Verlauf der Oberflächenantigene.

Statistisch auswertbar waren 15 von 17 Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene. Zwei Patienten schieden aus, da bei einer Patientin kein für die Statistik notwendiger definierter Therapiebeginn innerhalb des Untersuchungszeitraumes als Ausgangspunkt der Beobachtung festgelegt werden konnte und bei einer weiteren Patientin die Vergleichsdaten aus der Zytomorphologie fehlten. Sieben von 15 Patienten mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene wurden in die Auswertung einbezogen, für die anderen acht Patienten konnte ebenfalls kein definierter Therapiebeginn bestimmt werden.

Der Vierfeldertest (Tabelle 5) belegt mit einem p-Wert von unter 0,01 den signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen hinsichtlich der Rezidivhäufigkeit.

Tab.5: Darstellung der Verteilung von Rezidiven bei Patienten mit instabilem Verlauf und stabilem Verlauf der Oberflächenantigene anhand der Vierfeldertafel.

	Rezidiv	kein Rezidiv
instabiler Verlauf	12	3
stabiler Verlauf	1	6

## 5.5 Etablierung eines Leitwertes

Ein weiterer wichtiger Punkt der Arbeit war die Frage, welches der myeloischen Oberflächenantigene oder welche Kombination von Oberflächenantigenen am genauesten die Entwicklung der Akuten Myeloischen Leukämie widerspiegelt und damit als Leitwert postuliert werden kann.

Zunächst ist zu sagen, dass alle drei Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34 den Verlauf der Krankheit darstellen können, allerdings mit unterschiedlicher Häufigkeit (Tabelle 6).

Tab.6: Anzahl der Patienten, bei denen die oben angegebenen Marker und Markerkombinationen einen Aussagewert für den Krankheitsverlauf haben, separat analysiert für den instabilen Verlauf und den stabilen Verlauf der Oberflächenantigene.

	CD 13	CD 33	CD 34	CD 13/33	CD 13/34	CD 33/34	CD 13/33/34	keine Korrelation
Instabiler Verlauf (n=17)	1 (6%)	0 (0%)	5 (29%)	4 (24%)	2 (12%)	3 (18%)	0 (0%)	2 (12%)
Stabiler Verlauf (n=15)	0 (0%)	4 (27%)	3 (20%)	1 (7%)	1 (7%)	4 (27%)	1 (7%)	1 (6%)
Insgesamt (n=32)	1 (3%)	4 (13%)	8 (25%)	5 (16%)	3 (9%)	7 (22%)	1 (3%)	3 (9%)

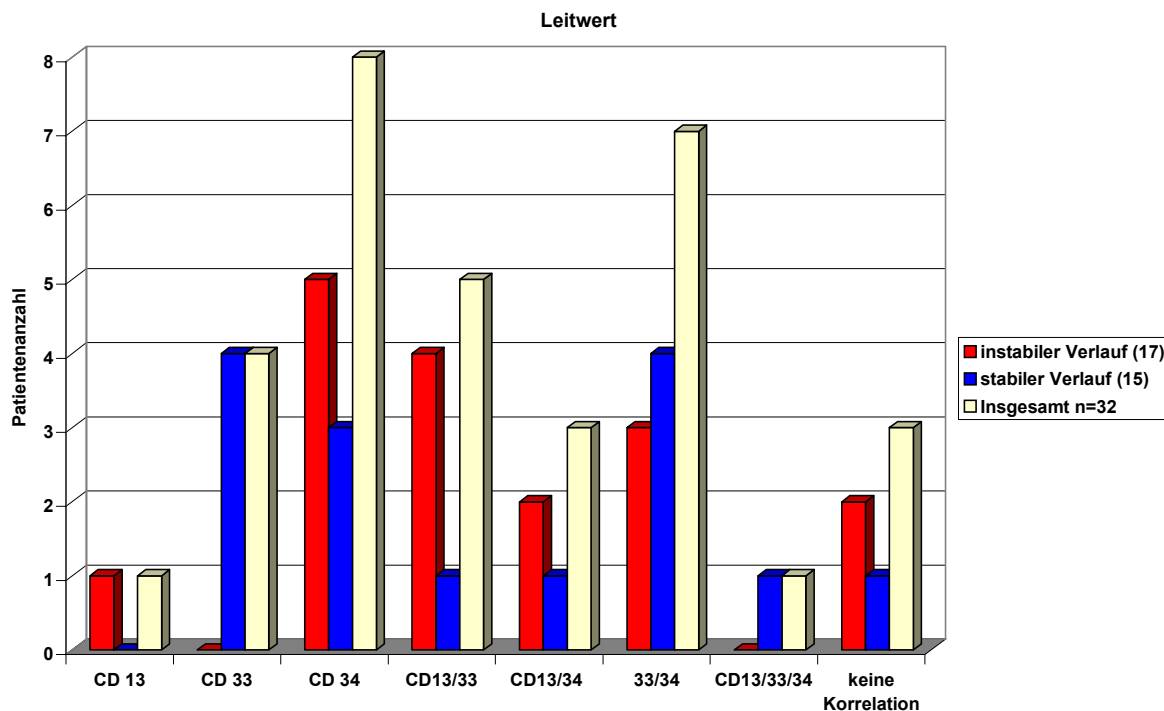


Abb.12: Verteilung der Oberflächenantigene beim instabilen und stabilen Verlauf der Oberflächenantigene in Abhängigkeit von ihrer Aussagekraft über den Verlauf der Akuten Myeloischen Leukämie.

Bei unseren Untersuchungen ergab sich, dass beim instabilen Verlauf bei fünf Patienten (29%) CD 34 allein den Ergebnissen der Zytomorphologie entsprach. Die Kombination von CD 13 und CD 33 war als maßgebender Parameter bei vier Patienten (24%) und die Kombination von CD 13 und CD 34 bei zwei Patienten (12%) ausschlaggebend. Drei weitere Patienten (18%) wiesen CD 33 und CD 34 als bestimmende Marker für den Verlauf der Krankheit auf. Bei keinem Patienten hatten alle drei Parameter gemeinsam einen richtungsweisenden Charakter. Bei zwei Patienten (12%) konnten keine Daten erhoben werden, da einer dieser Patienten an einer Erythroleukämie (AML M6) erkrankt war und keine Korrelation zwischen den Oberflächenantigenen und dem Krankheitsverlauf beobachtet wurde. Bei der anderen Patientin fehlten die Vergleichsdaten aus der Knochenmarkzytologie.

Beim stabilen Verlauf der Oberflächenantigene war bei drei Patienten (20%) CD 34 allein und bei vier Patienten (27%) CD 33 allein als Richtwert entscheidend. Die Kombination von CD 33 und CD 34 war wegweisend bei vier Patienten (27%). Bei einem Patienten (7%) markierten CD 13 und CD 33 und bei ebenfalls einem Patienten CD 13 und CD 34 den Verlauf der AML. In dieser Gruppe waren bei einem

Patienten (7%) alle drei Parameter verlaufsbestimmend. Bei einer weiteren Patientin (7%) fehlten die zum Vergleich erforderlichen Ergebnisse aus der Zytomorphologie.

Bei einigen Patienten ist ein Wechsel in der Antigenexpression aufgetreten. Dieser wurde in der Arbeit als Doppelbestimmung der jeweiligen Oberflächenantigene registriert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, wie in der Abbildung 12 veranschaulicht, dass vor allem jeweils CD 34 und CD 33 allein sowie die Kombination aus CD 34 mit CD 33 und die Assoziation von CD 13 mit CD 33 besondere Bedeutung hinsichtlich ihrer Aussagekraft über den Verlauf der AML besitzen.

Bei genauerer Betrachtung der in Abbildung 13, 14 und 15 dargestellten Verläufe der Mittelwerte der Oberflächenantigene zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Patienten mit stabilen und instabilen Verläufen der einzelnen Oberflächenantigene. Beim Vergleich der Mittelwerte der Oberflächenantigene mit instabilem Verlauf mit den Befunden der Zytomorphologie in der selben Gruppe ist hingegen ein sehr ähnliches Verhalten der Kurven zu beobachten, dies gilt auch für die Mittelwerte der Oberflächenantigene und die Ergebnisse der Knochenmarkzytologie beim stabilen Verlauf. Insbesondere beim Oberflächenantigen CD 34 zeigt sich ein sehr enger Zusammenhang zwischen den Ergebnissen der Immunphänotypisierung und der Knochenmarkuntersuchungen.

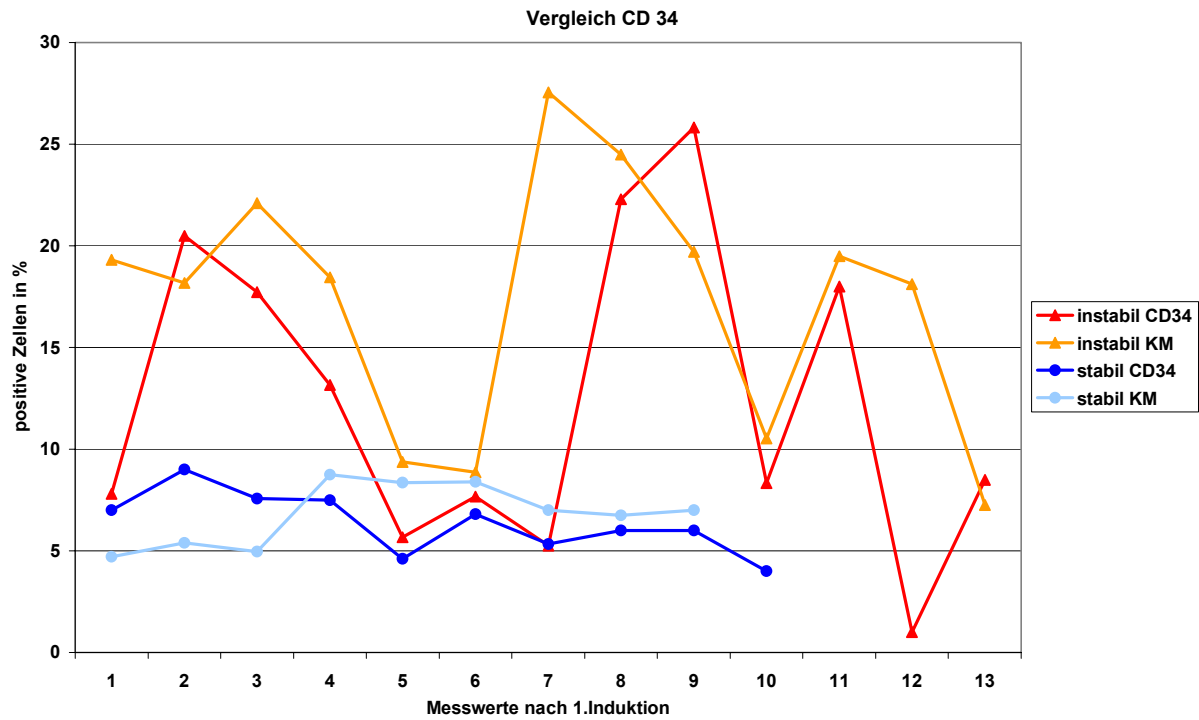


Abb.13: Vergleich der Mittelwerte des myeloischen Markers CD 34 mit den Ergebnissen der Zytomorphologie bei Patienten mit stabilem und instabilem Verlauf der Oberflächenantigene.

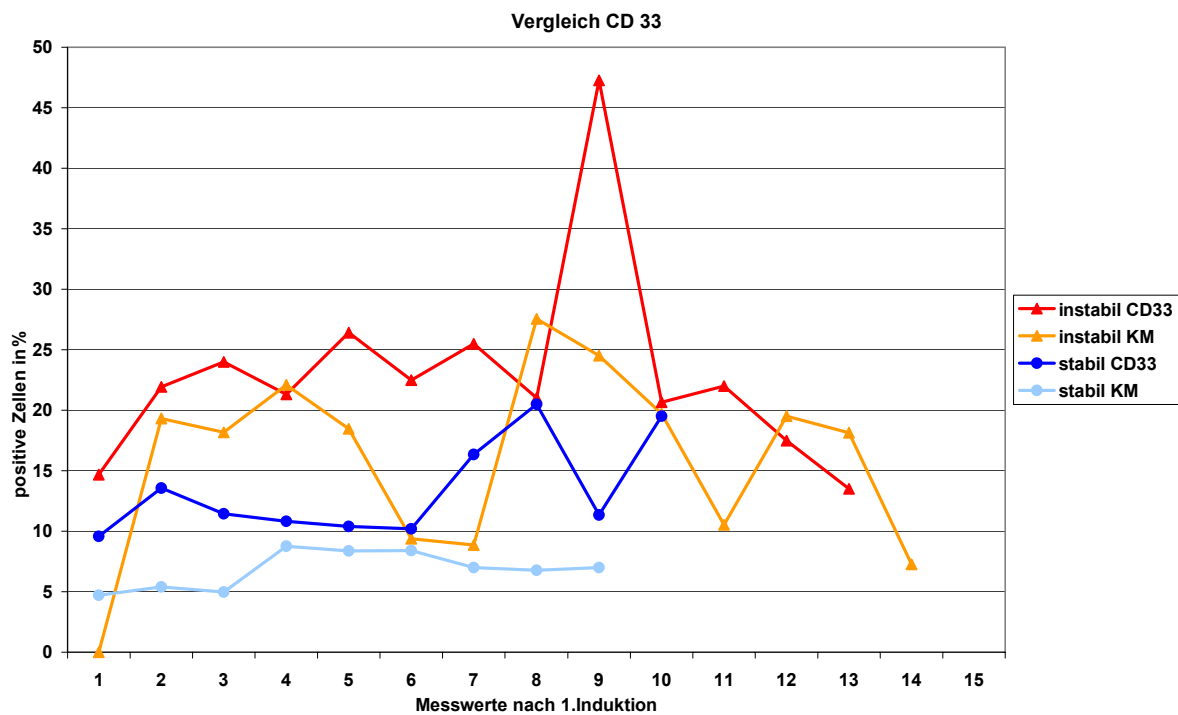


Abb.14: Vergleich der Mittelwerte des myeloischen Markers CD 33 mit den Ergebnissen der Zytomorphologie bei Patienten mit stabilem und instabilem Verlauf der Oberflächenantigene.



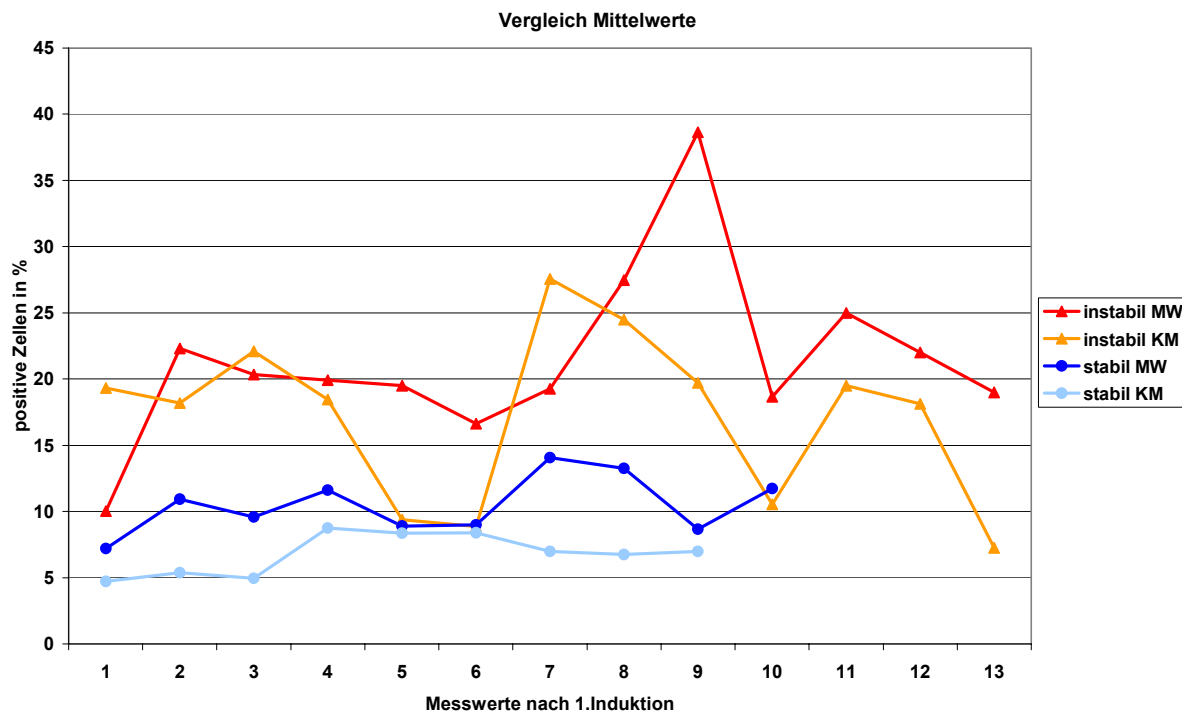


Abb.15: Vergleich der Mittelwerte (MW) aller myeloischen Marker mit den Ergebnissen der Zytomorphologie bei Patienten mit stabilem und instabilem Verlauf der Oberflächenantigene.

## 5.6 Ermittlung einer Richtgröße

Bei den 17 Patienten mit instabilem Verlauf sind insgesamt bei 13 Patienten Rezidive (76%) aufgetreten. Nur bei drei Patienten (18%) konnte kein Rezidiv nachgewiesen werden. Wenn also der Verlauf der Oberflächenantigene ein Rezidiv erkennen und teilweise auch vorzeitig ankündigen kann, wäre eine Richtgröße für den Anstieg der Oberflächenantigene, welche den Übergang in ein Rezidiv beschreibt, von großer Bedeutung.

Bei allen instabilen Kurvenverläufen hat mindestens eines der Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34 den Schwellenwert von 30% positiven Zellen überschritten. Dies kann also schon als ein erstes Indiz in Richtung Rezidiv gewertet werden, wie die Auswertung der Patienten mit instabilem Kurvenverlauf hinsichtlich der Rezidivhäufigkeit belegt. Nachfolgend wurde untersucht, welchem Anstieg der Oberflächenantigene auch tatsächlich ein Rezidiv folgt. Dabei wurde die Differenz des prozentualen Anteils der myeloischen Zellen von dem Beginn des Anstiegs bis zum Auftreten eines Rezidivs oder dem folgenden Abfall der Oberflächenantigene

genauer betrachtet. Die Zeitspanne sollte nicht mehr als drei Monate betragen, damit der Begriff eines Anstieges überhaupt gerechtfertigt ist.

Von den insgesamt 17 Patienten fehlen bei einer Patientin (6%) aufgrund wiederholter *Punctio sicca* die Ergebnisse der Zytomorphologie als Referenzwert. Bei einem Patienten (6%) mit einer Erythroleukämie (AML M6) war keine Korrelation zwischen dem Ergebnis der Knochenmarkuntersuchung und dem Verlauf der Oberflächenantigene zu verzeichnen. Daher konnten diese beiden Patienten nicht mit in die Auswertung einbezogen werden.

Aufgrund der Tatsache, dass der Verlauf der AML durch mehrere der Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34 gleichzeitig charakterisiert werden kann, kommt es im folgenden Abschnitt zu Mehrfachnennungen.

Bei alleiniger Betrachtung des Oberflächenantigens CD 33 haben sich bei zwölf Patienten (71%) 18 deutliche Anstiege gezeigt. Die Differenz der Anstiege, die innerhalb eines Zeitraumes von drei Monaten erfolgten, lag zwischen minimal 20% und maximal 89% positiven Zellen. Bei elf (61%) der 18 Anstiege konnte ein Rezidiv nachgewiesen werden. Der Mittelwert der Anstiege, die mit einem Rezidiv verbunden waren, betrug 54%.

Vier Anstiege (22%) waren mit keinem Rezidiv assoziiert, die Differenz der Anstiege lag aber mit 32% - 47% im unteren Bereich.

Bei drei Anstiegen (17%) wurde zwar der Schwellenwert von 30% positiven Zellen überschritten, aber die Differenz des Anstieges lag noch unter 30%. Keiner dieser Anstiege war mit einem Rezidiv verbunden.

Bei einem Patienten war kein größerer Anstieg zu verzeichnen, aber die Oberflächenantigene lagen über einen längeren Zeitraum auf einem höheren Niveau, und die Blasten im Knochenmark haben die Schwelle zum Rezidiv überschritten.

Bei Betrachtung des Oberflächenantigens CD 34 zeigten sich bei acht Patienten (47%) zwölf deutliche Anstiege. Die Differenz der Anstiege betrug minimal 26% und maximal 94%. Neun (75%) von den zwölf Anstiegen waren mit einem Rezidiv assoziiert. Der Mittelwert der Anstiege, die mit einem Rezidiv verbunden waren, lag bei 56%. Bei einem Anstieg von 38% war hingegen kein Rezidiv aufgetreten. Bei

zwei Patientinnen (17%), die kein Rezidiv entwickelten, wurde ebenso die Schwelle von 30% positiven Zellen überschritten, aber die Differenz des Anstieges war kleiner als 30%.

Bei der Untersuchung des Oberflächenantigens CD 13 waren bei acht Patienten (47%) elf deutliche Anstiege zu beobachten. Die Differenz der Anstiege lag hier minimal bei 20% und maximal bei 87%. Bei acht (73%) der elf Anstiege war ein Rezidiv zu verzeichnen. Allerdings war ein Anstieg von 20%, der jedoch von einem hohen Niveau begann, ebenfalls mit einem Rezidiv verbunden.

Dennoch lag der Mittelwert der Anstiege, die mit einem Rezidiv assoziiert waren, bei 54%. Bei drei Anstiegen (27%) entwickelte sich kein Rezidiv, und die Differenz der Anstiege war mit 35% - 42% relativ gering. Ein Patient zeigte keinen eindeutigen Anstieg, aber die Oberflächenantigene erreichten über einen längeren Zeitraum hinweg erhöhte Werte. Gleichzeitig war eine Blastenpersistenz auf hohem Niveau mit Übergang in ein Rezidiv nachweisbar und der Patient ist an den Komplikationen der Erkrankung verstorben.

Um diese Aussagen zu validieren, wurden auch die stabilen Verläufe der Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34 auf solche eindeutigen Anstiege hin untersucht.

Vereinzelt sind die Oberflächenantigene bis knapp an den Schwellenwert von 30% positiven Zellen gestiegen. Aber die Differenzen der Anstiege, die innerhalb eines Zeitraumes von drei Monaten vorkamen, lagen alle weit unter 30%. Nur bei einer Patientin ist klinisch ein Rezidiv aufgetreten. Diese Patientin war an einem MDS erkrankt, welches definitionsgemäß nur eine Blastenzahl zwischen 5 und 30% (Lübbert und Lindemann 2002) aufweist und somit keinen größeren Anstieg zeigen kann.

Bei der statistischen Auswertung wurden 35 einzelne Anstiege der Oberflächenantigene von 14 Patienten mit instabilem Verlauf und zehn einzelne Anstiege von sieben Patienten mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene hinsichtlich der Rezidivrate betrachtet. Elf Patienten konnten nicht in die Auswertung aufgenommen werden, da bei neun Patienten kein definierter Therapiebeginn festgelegt werden konnte, bei einer weiteren Patientin die Vergleichswerte aus der Zytomorphologie fehlten und bei einem Patienten keine Korrelation zwischen den

Oberflächenantigenen und dem Verlauf der Krankheit besteht. Die Anstiege lagen immer innerhalb eines entweder durch ein neues Therapieschema oder durch ein Rezidiv abgeschlossenen Therapiezyklusses. Daher können bei einem Patienten mehrere Anstiege und auch mehrere Rezidive ausgewertet werden.

Der Vierfeldertest (Tabelle 7) bestätigt mit einem p-Wert von unter 0,01 die Annahme, dass ein Anstieg über 30% von einem der drei Oberflächenantigene mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einem Rezidiv verbunden ist.

Tab.7: Darstellung der Rezidivhäufigkeit in Abhängigkeit von der Differenz des Anstieges anhand der Vierfeldertafel.

	Rezidiv	kein Rezidiv
Anstieg > 30%	21	7
Anstieg < 30%	2	15

## **5.7 Änderung der Oberflächenantigene im Verlauf**

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Untersuchungen befasst sich mit der Frage, ob anhand des Verlaufes der Oberflächenantigene eine Vorhersage über die Weiterentwicklung der Krankheit zu treffen ist. Dabei wurde das Verhalten der einzelnen Oberflächenantigene zueinander überprüft. Es wurde versucht, sowohl im stabilen als auch im instabilen Verlauf der Oberflächenantigene, Unterschiede darzustellen, die frühzeitig eine Aussage zu einem Rezidiv ermöglichen.

Ein gemeinsamer Verlauf der Oberflächenantigene bedeutet, dass alle oder mindestens zwei der myeloischen Oberflächenantigene einen einheitlichen Verlauf haben und nicht mehr als 20% voneinander abweichen (Abbildung 16).

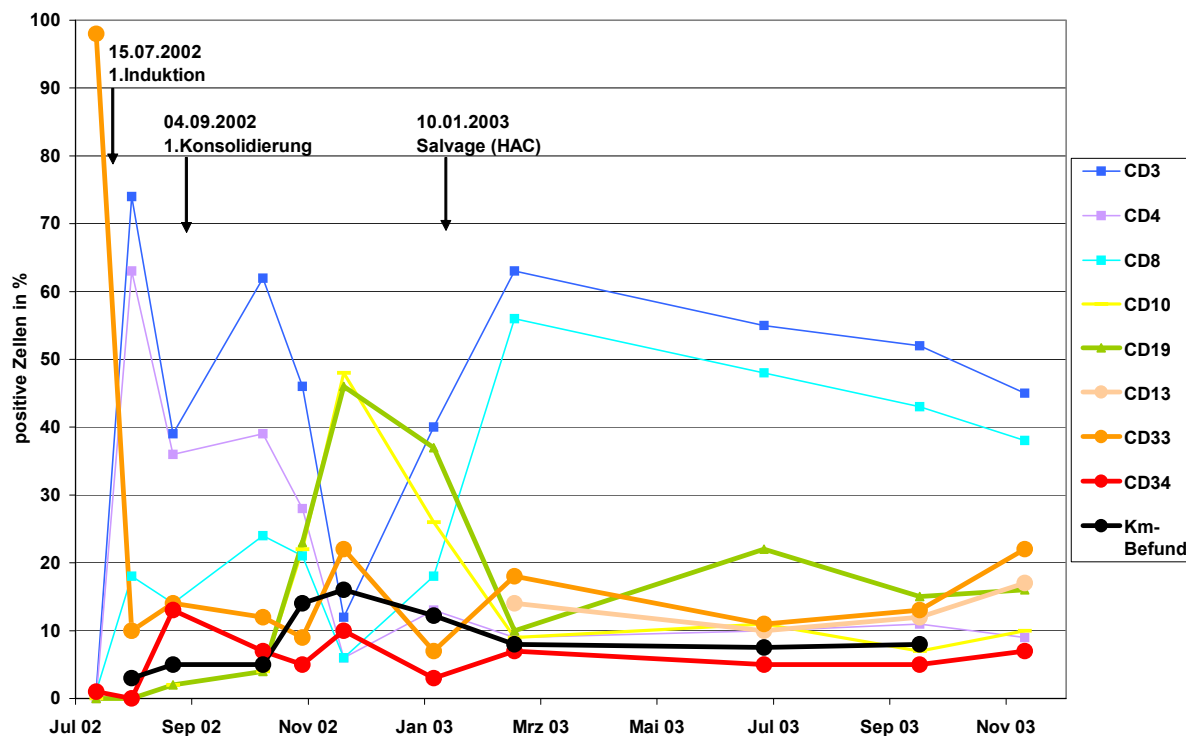


Abb.16: Darstellung eines gemeinsamen Verlaufs der Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34 am Beispiel eines Patienten. Während des Untersuchungszeitraums ist kein Rezidiv aufgetreten.

Ein getrennter Verlauf bedeutet eine Abweichung von über 20% von mindestens zwei Oberflächenantigenen (Abbildung 17).

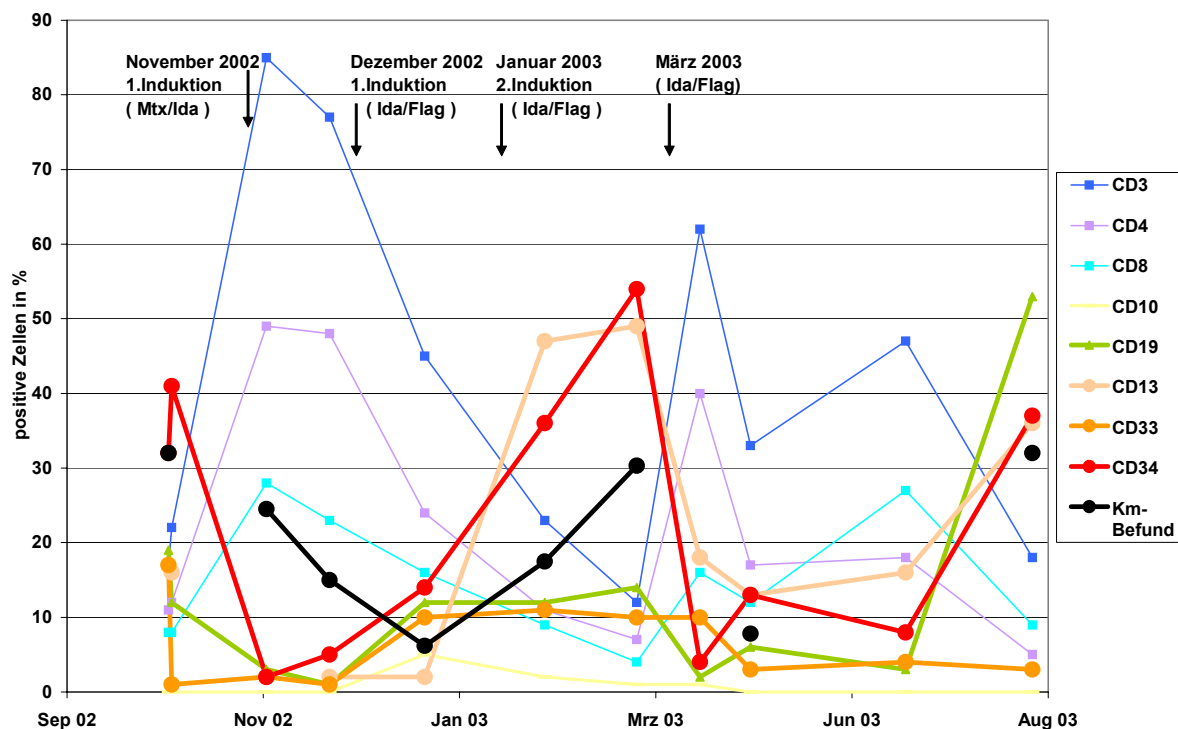


Abb.17: Darstellung eines getrennten Verlaufs der Oberflächenantigene am Beispiel eines Patienten. Hierbei zeigt sich mehrmals eine Trennung der Oberflächenantigene CD 13 und CD 34 von CD 33 in Verbindung mit einem Rezidiv.

Von den 15 Patienten mit stabilem Kurvenverlauf ist bei acht Patienten (53%) ein gemeinsamer Verlauf aller drei Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34 zu verzeichnen. Nur eine von diesen acht Patienten erlitt im Laufe der Untersuchung klinisch ein Rezidiv. Bei zwei Patienten (13%) zeigten nur zwei von drei Oberflächenantigenen einen gemeinsamen Verlauf, allerdings entfernen sich die einzelnen Parameter nicht über eine Differenz von 20%, die in der Arbeit als Maßgabe für die Trennung festgelegt wurde. Bei fünf Patienten (33%) war eine Trennung der Kurven der Oberflächenantigene zu beobachten. Bei drei (60%) von diesen fünf Patienten war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Trennung des CD 34 von CD 13 und CD 33 zu verzeichnen, aber im Verlauf der Erkrankung ergab sich dann wieder ein gemeinsamer Verlauf. Bei den beiden anderen Patienten (40%) handelte es sich jeweils um eine Abweichung des CD 13 von CD 33 und CD 34. Bei keinem von diesen Patienten war ein Rezidiv nachweisbar.

Bei den 17 Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene zeigte sich nur bei einem Patienten (6%) ein gemeinsamer Verlauf aller Oberflächenantigene. Er erlitt ein Rezidiv. Zwei Patienten wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da bei einem Patienten (6%) mit Erythroleukämie (AML M6) kein Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Oberflächenantigene und der Entwicklung der AML festgestellt werden konnte. Bei einer weiteren Patientin (6%) fehlen die Vergleichswerte aus der Zytomorphologie, die klinischen Daten lassen jedoch auf ein Rezidiv schließen. Bei den anderen 14 Patienten (82%) hingegen zeigte sich eine Trennung. Dabei wichen bei zehn Patienten (71%) die Verläufe von CD 13 und CD 33 von CD 34 ab, bei zwei Patienten (14%) trennten sich CD 33 und CD 34 von CD 13, und bei zwei Patienten (14%) entfernte sich CD 33 von CD 13 und CD 34. Bei elf (79%) von diesen vierzehn Patienten kam es zum Zeitpunkt der Trennung der Kurvenverläufe der Oberflächenantigene oder kurze Zeit danach zu einem Rezidiv. Drei Patienten (21%) waren in dieser Zeit rezidivfrei, wiesen aber zum Zeitpunkt der Trennung nur eine partielle Remission auf.

Im Kapitel 5.6 wurde als Richtgröße für die Anstiege der Kurvenverläufe, die mit hoher Wahrscheinlichkeit mit einem Rezidiv assoziiert sind, 30% festgelegt. Es zeigte sich, dass bei zwei (60%) von den drei Patienten, die eine Trennung aufwiesen, aber kein Rezidiv entwickelten, sich die Oberflächenantigene nicht über diesen Wert voneinander entfernten.

Der gemeinsame und getrennte Verlauf der Oberflächenantigene war hinsichtlich der Rezidivhäufigkeit bei 14 Patienten mit instabilem Verlauf und bei sieben Patienten mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene statistisch auswertbar.

Der Vierfeldertest (Tabelle 8) bestätigt mit einem p-Wert von unter 0,05 ein signifikant häufigeres Auftreten von Rezidiven, wenn die Verläufe der Oberflächenantigene über 20% voneinander abweichen sowie signifikant weniger Rezidive beim gemeinsamen Verlauf der Oberflächenantigene.

Tab.8: Darstellung der Rezidivhäufigkeit in Abhängigkeit vom gemeinsamen oder getrennten Verlauf der Oberflächenantigene anhand der Vierfeldertafel.

	Rezidiv	kein Rezidiv
getrennter Verlauf	11	3
gemeinsamer Verlauf	2	5

## **5.8 Zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Oberflächenantigene und den Ergebnissen der Zytomorphologie**

Von den untersuchten Oberflächenmarkern können CD 13, CD 33 und CD 34 oder Kombinationen daraus die Leukämiezellen charakterisieren.

Inwieweit ein enger zeitlicher Zusammenhang zwischen einer Veränderung der Oberflächenantigene und einer Änderung der Blastenzahl im Knochenmark besteht, ist von entscheidender Bedeutung für die Aussagekraft der Oberflächenantigene über den Verlauf der AML. Ein vorzeitiger Anstieg der Oberflächenmarker könnte eine Rezidivfrüherkennung oder sogar Vorhersage ermöglichen.

Die Abbildung 18 gibt einen Überblick über den zeitlichen Zusammenhang zwischen dem Anstieg der myeloischen Marker und der Blasten im Knochenmark beim stabilen und instabilen Verlauf der Oberflächenantigene.

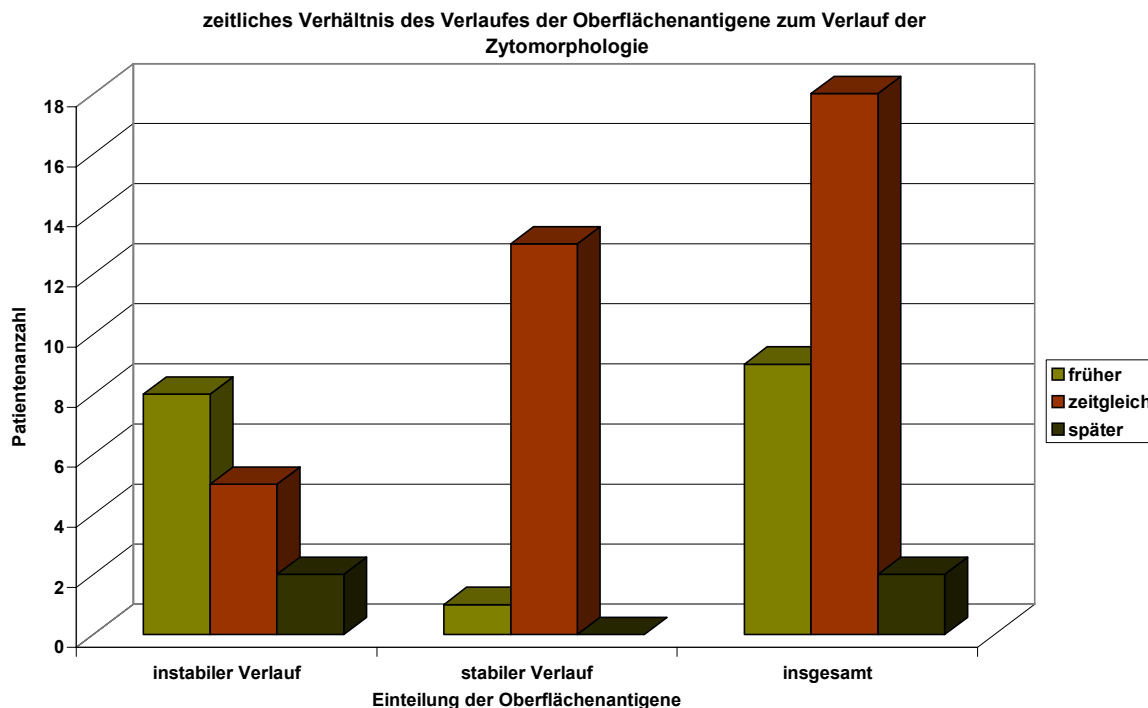


Abb.18: Darstellung des zeitlichen Zusammenhangs des Anstiegs der Oberflächenantigene und des Anstiegs der morphologisch identifizierbaren Blasten im Knochenmarkpunktat vergleichend bei Patienten mit instabilem Verlauf und stabilem Verlauf der Oberflächenantigene sowie der gesamten Patientenanzahl.

Bei 15 (88%) von den 17 Patienten mit instabilen Oberflächenantigenen kennzeichnete mindestens eines von den Oberflächenantigenen CD 13, CD 33 und CD 34 den Verlauf der Akuten Myeloischen Leukämie. Dabei steht die Erhöhung der Blastenzahl, die im Knochenmarkpunktat als leukämische Blasten angesehen werden und der Anstieg der Oberflächenantigene in einem zeitlich engen Zusammenhang. Dies bedeutet, dass sich in 5 (33%) der 15 auswertbaren Kurvenverläufe die Oberflächenantigene zeitgleich mit den Ergebnissen der Zytomorphologie veränderten. Bei acht Patienten (53%) hingegen zeigten die Oberflächenantigene innerhalb einer Zeitspanne von einem Monat bis zu einem Jahr schon vorzeitig eine Veränderung an, die dann im darauf folgenden Zeitraum von den Befunden der Knochenmarkuntersuchungen bestätigt wurde. Abbildung 19 soll am Beispiel eines Patienten diese frühzeitigen Veränderungen veranschaulichen. Lediglich bei zwei Patienten (13%) folgten die Oberflächenantigene zeitlich leicht verzögert den Ergebnissen der Zytomorphologie.



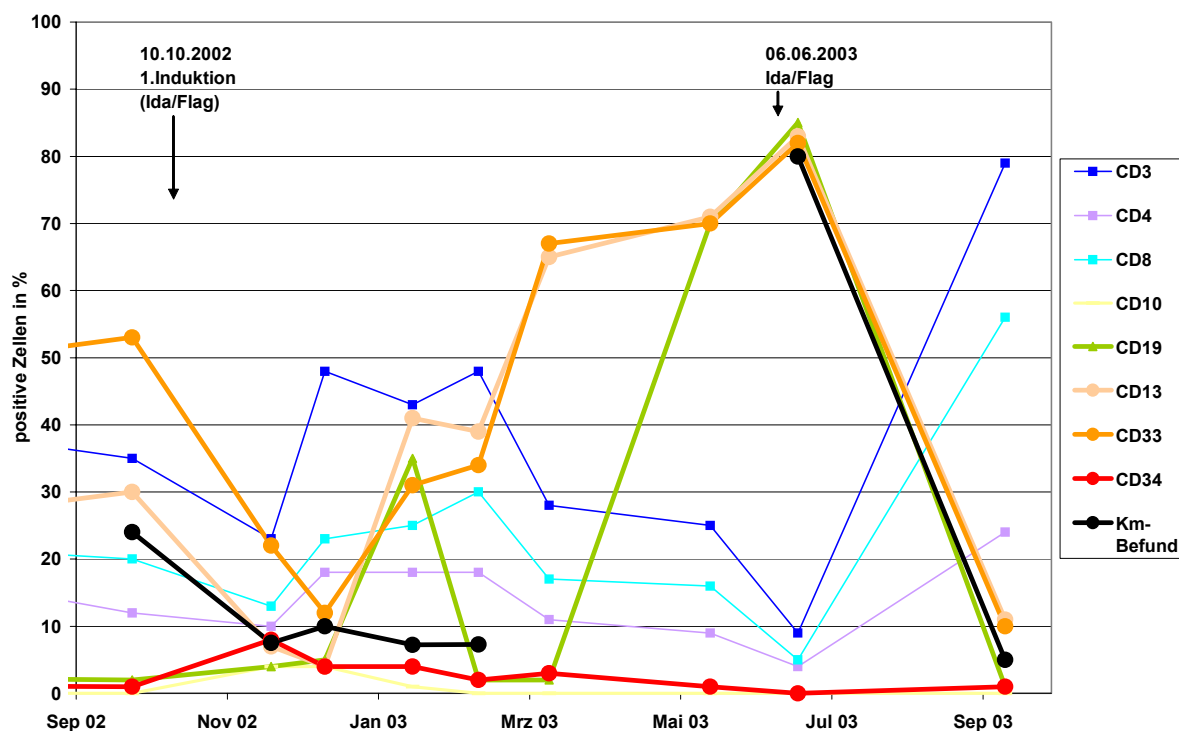


Abb. 19: Darstellung des zeitlichen Zusammenhangs der Oberflächenantigene und der Zytomorphologie am Beispiel eines Patienten. Es zeigt sich ein frühzeitiger Anstieg der Oberflächenantigene mit nachfolgendem Rezidiv, während die Ergebnisse der Zytomorphologie erst später eine Veränderung aufweisen.

Von 17 Patienten ist bei einem Patienten mit Erythroleukämie (AML M6) keine eindeutige Beziehung zwischen den Oberflächenantigenen und den Werten der Knochenmarkzytologie festzustellen. Außerdem fehlen auf Grund immer wieder erfolgter Punctio sicca bei einer Patientin (6%) die Ergebnisse der Zytomorphologie und damit die Vergleichswerte zur Auswertung.

Anders ist dies bei den Patienten, die wenig Veränderung im Oberflächenmuster aufwiesen. Bei 14 (93%) von 15 Patienten mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene korreliert mindestens eines der Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34 zeitlich mit der Entwicklung des Blastenanteils im Knochenmark. Bei einer Patientin (7%) fehlen die Vergleichsdaten aus den Knochenmarkuntersuchungen. Es zeigte sich bei dreizehn (93%) von diesen vierzehn Patienten eine zeitgleiche Entwicklung der Oberflächenantigene und der Ergebnisse der Zytomorphologie. Bei einer Patientin (7%) jedoch zeigte der Kurvenverlauf der Oberflächenantigene Veränderungen im Verlauf der Erkrankung schon zeitlich vor den Befunden der Knochenmarkzytologie an.

Daraus ergibt sich, dass bei der Immunphäotypisierung bei insgesamt neun (31%) der 29 auswertbaren Patienten ein Rezidiv eher erfasst wurde, als durch die Zytomorphologie. Beim diesbezüglich relevanten instabilen Verlauf der Oberflächenantigene konnten sogar bei 53% der Patienten frühzeitig Veränderungen im Krankheitsverlauf registriert werden.

Der Vierfeldertest gibt mit einem p-Wert von 0,06 einen knapp nicht signifikanten Unterschied zwischen dem stabilen und instabilen Verlauf der Oberflächenantigene bezüglich der zeitlichen Korrelation mit den Ergebnissen der Knochenmarkuntersuchungen an.

## **5.9 Zusammenhang zwischen Therapie und Verlauf der Oberflächenantigene**

Nach der Diagnosestellung wird die Therapie in Abhängigkeit vom Alter des Patienten, von bestimmten Risikofaktoren und auch in Abhängigkeit vom Subtyp festgelegt. Bei fehlendem Ansprechen wird die Therapie dem Verlauf der Krankheit entsprechend angepasst und gewechselt. Somit beeinflusst die Therapie umgekehrt auch den Ablauf der Erkrankung. Daher kann die Therapie die Ausprägung der für die AML typischen Antigene und auch den Markerverlauf verändern.

Bei einem komplizierten Verlauf der AML ist häufiger ein Therapiewechsel zu erwarten, während beim unkomplizierten Verlauf nur sehr selten das Behandlungsschema gewechselt werden muss. Dementsprechend galten die folgenden Untersuchungen der Frage, inwieweit sich die Therapieunterschiede und die damit verbundenen Komplikationen auch in den beiden verschiedenen Verläufen der Oberflächenantigene widerspiegeln.

Auf Grund von Komplikationen wurde bei 15 (88%) von den 17 Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene die Therapie gewechselt. Lediglich bei zwei Patienten (12%) wurde die Therapie nicht geändert.

Je nach Alter und Subtyp wurde die Behandlung festgelegt: Sechs von den sieben Patienten unter 60 Jahren wurden mit Ara-C und Idarubicin behandelt. Zehn Patienten waren zum Zeitpunkt der Diagnose über 60 Jahre. Bei fünf dieser zehn Patienten wurde die Therapie initial mit Ara-C und Mitoxantron begonnen. Zwei

Patienten erhielten Ara-C und Idarubicin. Drei weitere Patienten erhielten auf Grund bestimmter Risikofaktoren andere Therapien: Eine Patientin wurde wegen einer Meningeosis leucaemica mit Methotrexat, Dexamethason und Ara-C behandelt, und ein älterer Patient erhielt initial ein liposomales Doxorubicin (Caelyx). Der dritten Patientin wurde anfänglich einer Therapie mit Ara-C und Vesanoid zugeführt, die kurze Zeit später mit Ara-C und Mitoxantron fortgesetzt wurde. Eine weitere Patientin, die an einer AML M3 erkrankt war, wurde mit All-trans-Retin-Säure behandelt.

Eine Therapie nach dem Ida/Flag-Schema wurde bei sieben Patienten (41%) nach einem Rezidiv oder einer refraktären AML eingeleitet. Drei von diesen Patienten erhielten danach eine Transplantation. Bei einem anderen Patienten erfolgte nach der Anfangstherapie erst eine Transplantation, dann wurde auf das Ida/Flag-Schema gewechselt und noch ein zweites Mal transplantiert. Des Weiteren wurde bei vier Patienten (24%) nach der Initialbehandlung wegen erhöhter Blastenzahlen eine Salvage-Therapie mit hochdosiertem Ara-C und Cyclophosphamid nach dem hAC-Protokoll durchgeführt. Einer dieser Patienten wurde im Anschluss mit dem Ida/Flag-Schema und einer Transplantation weiter behandelt. Nur bei zwei Patienten wurde nach einer Salvage-Therapie oder einem Wechsel auf das Ida/Flag-Schema eine Erhaltungstherapie angeschlossen. Bei vier Patienten (24%) wurden nach Rezidiven alternative Therapieverfahren mit Etoposid, liposomalem Doxorubicin oder Vesepid eingesetzt.

Kein Wechsel der Therapieschemata innerhalb des Untersuchungszeitraumes wurde bei zehn (67%) von den 15 Patienten mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene beobachtet. Auch bei dieser Gruppe wurde in Abhängigkeit von Alter und Subtyp die Therapie ausgewählt. Bei sieben Patienten unter 60 Jahren wurde die Therapie mit Ara-C und Idarubicin, bei zwei Patienten über 60 Jahren mit Ara-C und Mitoxantron eingeleitet. Zwei Patienten mit AML M3 erhielten All-trans-Retin-Säure. Eine Patientin wurde 1999 nach dem TAD-Protokoll mit Ara-C, Daunorubicin und Thioguanin anbehandelt. Bei drei von diesen Patienten wurde weiterführend eine Transplantation angeschlossen. Bei ebenfalls drei Patienten wurde stattdessen eine Erhaltungstherapie angesetzt. Ein Therapiewechsel war bei drei Patienten zu verzeichnen, dabei wurde bei zwei Patienten nach der Behandlung mit Ara-C und

Mitoxantron auf Grund persistierender Blastenteile eine Salvage-Therapie eingeleitet. Eine Patientin mit MDS, die initial transplantiert wurde, erhielt wegen eines klinischen Rezidivs eine Donor-Lymphozyten-Infusion sowie eine zweite Transplantation. Bei zwei Patienten, die ebenfalls an MDS erkrankt waren, wurde keine Chemotherapie durchgeführt.

In die statistische Auswertung wurden 16 von 17 Patienten mit instabilem Verlauf und 7 von 15 Patienten mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene einbezogen, da bei den anderen Patienten kein definierter Therapiebeginn innerhalb des Untersuchungszeitraums festgelegt werden konnte. Der Vierfeldertest (Tabelle 9) bestätigt mit einem p-Wert von 0,01 einen signifikant häufigeren Therapiewechsel bei Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene, während Patienten mit stabilem Verlauf signifikant öfter einen durchgängigen Therapiealgorithmus erhielten.

Tab.9 Darstellung der unterschiedlichen Häufigkeit von Therapiewechseln bei Patienten mit instabilem Verlauf und stabilem Verlauf der Oberflächenantigene anhand der Vierfeldertafel.

	Wechsel	kein Wechsel
instabiler Verlauf	14	1
stabiler Verlauf	2	5

## 5.10 Zusammenhang zwischen Letalität und Verlauf der Oberflächenantigene

Insgesamt sind von den 17 Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene neun Patienten (53%) verstorben. Sieben von diesen Patienten (78%) sind den Komplikationen der Grundkrankheit in Folge von Blutungen, Infektionen oder körperlicher Schwäche erlegen. Dabei war zu beobachten, dass bei fünf Patienten (56%) im zeitlichen Zusammenhang mit ihrem Tod innerhalb von drei Monaten ein sehr großer und sehr steiler Anstieg der Vorläuferzellen, welche die myeloischen Oberflächenantigene exprimieren, zu verzeichnen war (Abbildung 20). Eine Patientin ist an den Nebenwirkungen der Stammzelltransplantation gestorben, bei einem weiteren Patienten ist die Todesursache ungeklärt.

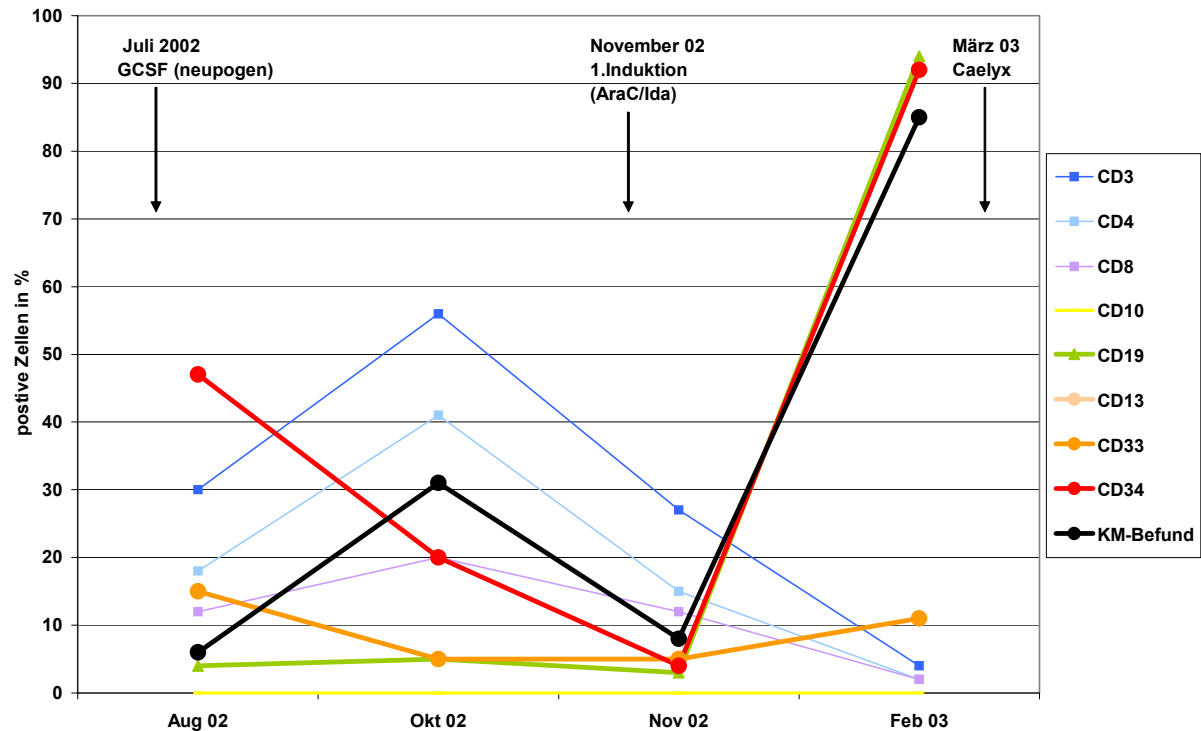


Abb.20: Darstellung des Anstiegs der Oberflächenantigene am Beispiel eines Patienten, der kurze Zeit später verstorben ist.

Bei den 15 Patienten mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene sind insgesamt vier Patienten (27%) verstorben, zwei (50%) der vier Patienten nach einer Transplantation. Eine Patientin, die zusätzlich an einem Ewing-Sarkom erkrankt war, ist nach der Operation des Tumors auf Grund einer Sepsis gestorben. Eine weitere Patientin ist im Rahmen der Grunderkrankung an einem septischen Schock mit Nierenversagen verstorben.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Untersuchungen der myeloischen Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34 zeigen die Tabellen 10 und 11.

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse hinsichtlich Alter, Subtyp nach FAB, Rezidivrate, Leitwert, Verlauf, zeitlicher Zusammenhang, Therapie und Letalität bei den 17 Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34.

Patient	Alter bei Diagnose	FAB-Subtyp	Rezidiv während Beobachtung	Leitwert	Verlauf	zeitlicher Zusammenhang	Therapie	Tod
1	78	Sek. AML	ja	CD 13/34	getrennt	zeitgleich	Wechsel	ja
2	47	M 3	ja	CD 33/34	getrennt	vorzeitig	Wechsel	-
3	56	M 1	klinisches Rezidiv keine KM-Ergebnisse	CD 33/34	getrennt	keine Km-Ergebnisse	Wechsel	ja
4	71	M 2	mehrere	CD 13/33	getrennt	zeitgleich	Wechsel	-
5	67	M 1	mehrere	CD 33/34	getrennt	vorzeitig	Wechsel	-
6	67	M 1	ja	CD 33/34	getrennt	leicht verzögert	Wechsel	ja
7	21	M 5	mehrere	CD 13/33	getrennt	vorzeitig	Wechsel	ja
8	48	M 6	mehrere	keine Korrelation	keine Korrelation	keine Korrelation	Wechsel	-
9	60	M 4	ja	CD 13/33	getrennt	zeitgleich	Wechsel	-
10	69	M 6	ja	CD 33/34	getrennt	vorzeitig	kein Wechsel	ja
11	73	M 1	ja	CD 13/33	getrennt	leicht verzögert	Wechsel	ja
12	59	M 1	-	CD 34	getrennt	vorzeitig	Wechsel	-
13	58	M 4	-	CD 34	getrennt	zeitgleich	kein Wechsel	-
14	56	M 2	mehrere	CD 34	getrennt	zeitgleich	Wechsel	ja
15	65	M 0	mehrere	CD 13	getrennt	vorzeitig	Wechsel	-
16	74	M2	mehrere	CD 13/34	getrennt	vorzeitig	Wechsel	ja
17	63	M 4	- Menigeosis leucaemica	CD 34	getrennt	zeitgleich	Wechsel	ja

Tabelle 11: Zusammenfassung der Ergebnisse hinsichtlich Alter, Subtyp nach FAB, Rezidivrate, Leitwert, Verlauf, zeitlicher Zusammenhang, Therapie und Letalität bei den 15 Patienten mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34.

Patient	Alter bei Diagnose	FAB-Subtyp	Rezidiv während Beobachtung	Leitwert	Verlauf	zeitlicher Zusammenhang	Therapie	Tod
1	66	M 1	-	CD 33	anfangs getrennt, gemeinsam	zeitgleich	Wechsel	-
2	46	M 1	-	CD 34	gemeinsam	zeitgleich	kein Wechsel	-
3	61	Sek. AML	-	CD 34	gemeinsam	zeitgleich	Wechsel	ja
4	35	M 1	-	CD 34	getrennt	zeitgleich	kein Wechsel	-
5	46	M 2	-	CD 33	gemeinsam	zeitgleich	Wechsel	ja
6	55	MDS	-	CD 33	gemeinsam	zeitgleich	keine Chemotherapie	-
7	62	MDS	-	CD 13/33/34	gemeinsam	zeitgleich	keine Chemotherapie	-
8	33	MDS	klin. Rezidiv	CD 13/34	gemeinsam	vorzeitig	Wechsel	-
9	44	M 1	-	CD 13/33/34	gemeinsam	zeitgleich	kein Wechsel	ja
10	60	M 3	-	CD 33/34	getrennt	zeitgleich	kein Wechsel	-
11	66	M 3	-	CD 13/33	anfangs getrennt, gemeinsam	zeitgleich	kein Wechsel	-
12	47	M 4	-	CD 33	gemeinsam	zeitgleich	kein Wechsel	-
13	29	M 2	-	CD 33/34	gemeinsam	zeitgleich	kein Wechsel	ja
14	37	M 3	-	CD 33/34	gemeinsam	zeitgleich	kein Wechsel	-
15	42	M 2	-	CD 33/34	anfangs getrennt, gemeinsam	zeitgleich	kein Wechsel	-

## 5.11 Auswertung der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass die myeloischen Oberflächenantigene den Verlauf der AML relativ genau darstellen können. Um die Aussagen zur Rezidiverkennung oder sogar Vorhersage präzisieren zu können, wurden weiterführende Untersuchungen zu den Oberflächenantigenen CD 10 und CD 19 durchgeführt.

Die Patienten wurden entsprechend ihrem Verlauf der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 in zwei Gruppen eingeteilt. Zur Zuordnung der Patienten in einen stabilen oder instabilen und weiterführend auch in einen gemeinsamen oder getrennten Verlauf der Oberflächenantigene wurden die gleichen Kriterien wie bei den vorangegangenen Untersuchungen zu den myeloischen Oberflächenantigenen herangezogen.

Bei der Aufteilung in einen stabilen und instabilen Verlauf der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 waren keine signifikanten Ergebnisse zu verzeichnen.

Ein stabiler Verlauf der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 war bei 12 Patienten (38%) zu beobachten. Fünf (42%) von den zwölf Patienten bekamen ein Rezidiv. Drei (25%) von den zwölf Patienten sind verstorben, zwei Patienten (67%) bedingt durch die Grunderkrankung und eine Patientin (33%) ist den Komplikationen der Transplantation erlegen. Bei einer Patientin (8%) fehlen auf Grund immer wieder erfolgter Punctio sicca die Ergebnisse der Zytomorphologie, um Aussagen bezüglich eines Rezidivs treffen zu können.

Bei 20 Patienten (62%) wiesen die Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 einen instabilen Verlauf auf. Neun Rezidive (45%) traten in dieser Gruppe auf, und ein Patient, der an einem MDS erkrankt war, wies grenzwertig hohe Blastenzahlen im Knochenmark auf. Insgesamt sind zehn Patienten (50%) verstorben, fünf (50%) davon in Folge eines Rezidivs und zwei Patienten (20%) nach einer Transplantation. Zwei Patientinnen (20%) sind einer Sepsis ohne Zusammenhang mit einem Rezidiv erlegen. Ein Patient (10%) ist aus ungeklärter Ursache verstorben.



Etwas aussagekräftiger war die Untersuchung über das Verhältnis der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 zueinander, zeigte aber dennoch keine signifikanten Ergebnisse.

Bei 21 Patienten (66%) verliefen beide Oberflächenantigene gemeinsam. In diese Gruppe fielen alle zwölf Patienten (57%) mit dem stabilen Verlauf der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19. Die anderen neun Patienten (43%) zeigten einen instabilen Verlauf. Sieben (33%) von diesen 21 Patienten erlitten Rezidive. Bei einer Patientin fehlen wiederum die Vergleichswerte aus der Zytomorphologie. Insgesamt sieben (33%) Patienten sind verstorben.

Bei den neun Patienten (43%) mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 waren nur einzelne Peaks zu beobachten, die auffällig häufig in zeitlich sehr engem Zusammenhang mit einer Therapie standen: drei (33%) nach einer Transplantation, drei (33%) nach einer Konsolidierungstherapie mit Ara-C und Mitoxantron sowie zwei (22%) nach einer Erhaltungstherapie. Bei einer Patientin zeigten sich erhöhte Werte der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 ohne einen erkennbaren Grund. Dabei entwickelte sich bei zwei (22%) von diesen Patienten zeitgleich ein Rezidiv. Vier Patienten (44%) mit nur kurzen Spitzenwerten von CD 10 und CD 19 sind verstorben, zwei an den Nebenwirkungen der Transplantation und eine Patientin an den Komplikationen eines Ewing-Sarkoms. Ein Patient ist aus ungeklärter Ursache verstorben.

Bei den anderen elf Patienten (34%) war eine Trennung der Oberflächenantigene zu erkennen. Dabei stiegen die Werte des CD 19 an, während das CD 10 auf niedrigem Niveau verlief. Bei sechs (55%) von diesen Patienten zeigten sich sehr steile Anstiege, die auch alle von einem Rezidiv begleitet wurden. Vier (67%) der sechs Patienten sind den Komplikationen der Grunderkrankung erlegen. Bei drei weiteren Patienten (27%) war jeweils ein einzelner Peak zu verzeichnen, welchem bei einem Patienten ein Rezidiv folgte und bei einer Patientin Ausdruck einer massiven Monozytose war. Beide Patienten sind an den Folgen der AML verstorben. Bei zwei Patienten (18%), die an MDS erkrankt waren, trennte sich ohne erkennbaren Grund das Oberflächenantigen CD 19 von CD 10 und verlief auf einem sehr hohen Niveau. Insgesamt waren bei den elf Patienten mit Trennung der Oberflächenantigene sieben Rezidive (64%) aufgetreten, und sechs Patienten (54%) sind verstorben.

Ein weiterer Teil der Untersuchung beschäftigte sich mit der Frage, ob der Verlauf der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 mit einem bestimmten myeloischen Oberflächenantigen assoziiert ist und ob sich daraus eine prognostische Aussagekraft ableiten lässt. Es zeigten sich keine eindeutigen Ergebnisse.

Keine Korrelation war bei 17 Patienten zu verzeichnen. Vier Patienten zeigten eine enge Korrelation von CD 10 oder CD 10 und CD 19 mit CD 34, nur bei einem Patienten ist ein Rezidiv zu beobachten gewesen. Einen gemeinsamen Verlauf von CD 19 mit CD 13 und CD 34 wiesen zwei Patienten auf, die beide ein Rezidiv erlitten. Auch die Kombination von CD 19 mit CD 33 und CD 34 war bei einem Patienten mit einem Rezidiv verbunden. Bei vier Patienten verlief CD 19 mit CD 13 und CD 33 zusammen. Dabei sind drei Rezidive aufgetreten. Einen gemeinsamen Verlauf aller Oberflächenantigene ohne Auftreten von Rezidiven war bei vier Patienten zu verzeichnen.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse zu den Untersuchungen der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 zeigen die Tabellen 12 und 13.

Tabelle 12: Zusammenfassung der Ergebnisse hinsichtlich Alter, Subtyp nach FAB, Rezidivrate, Assoziation mit myeloischen Oberflächenantigenen, Verlauf und Letalität bei den 12 Patienten mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene CD10 und CD19.

Patient	Alter bei Diagnose	Subtyp	Rezidiv	Assoziation	Verlauf	Tod
1	61	sek. AML	-	CD 13/33/34	gemeinsam	ja
2	47	M 3	ja	-	gemeinsam	-
3	56	M 1	klin. Rezidiv keine KM- Ergebnisse	-	gemeinsam	ja
4	67	M 1	mehrere	-	gemeinsam	-
5	48	M 6	mehrere	CD 34	gemeinsam	-
6	69	M 6	ja	-	gemeinsam	ja
7	66	M 3	-	CD 13/33/34	gemeinsam	-
8	59	M 1	-	-	gemeinsam	-
9	47	M 4	-	CD 13/33/34	gemeinsam	-
10	58	M 4	-	CD 34	gemeinsam	-
11	65	M 0	mehrere	-	gemeinsam	-
12	37	M 3	-	CD 13/33/34	gemeinsam	-

Tabelle 13: Zusammenfassung der Ergebnisse hinsichtlich Alter, Subtyp nach FAB, Rezidivrate, Assoziation mit myeloischen Oberflächenantigenen, Verlauf und Letalität bei den 20 Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19.

Patient	Alter bei Diagnose	Subtyp	Rezidiv	Assoziation	Verlauf	Tod
1	78	sek.AML	ja	CD 13/34	getrennt	ja
2	66	M 1	-	-	gemeinsam	-
3	46	M 1	-	CD 13/33	getrennt	-
4	35	M 1	-	-	gemeinsam	-
5	71	M 2	mehrere	CD 13/33	getrennt	-
6	67	M 1	ja	CD 33/34	getrennt	ja
7	21	M 5	mehrere	-	getrennt	ja
8	46	M2	-	-	gemeinsam	ja
9	60	M 4	ja	CD 13/33	getrennt	-
10	55	MDS	-	-	getrennt	
11	62	MDS	-	CD 34	getrennt	-
12	33	MDS	ja	-	gemeinsam	-
13	44	M 1	-	-	gemeinsam	ja
14	73	M 1	ja	CD 13/33	getrennt	ja
15	60	M 3	-	-	gemeinsam	-
16	29	M 2	-	-	gemeinsam	ja
17	56	M 2	mehrere	-	gemeinsam	ja
18	74	M 2	mehrere	CD 13/34	getrennt	ja
19	42	M 2	-	-	gemeinsam	-
20	63	M 4	- Meningeosis leucaemica	CD 34	getrennt	ja

## 6. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, im Verlauf der Erkrankung die Änderung der Expression der Oberflächenantigene, die von den leukämischen Vorläuferzellen präsentiert werden, zu untersuchen.

Ansatzpunkt war die Annahme, dass bei Änderungen der Verhältnisse im Knochenmark, auch die Expression der Oberflächenantigene variiert und damit vielleicht sogar frühzeitig Veränderungen im Verlauf der Krankheit angezeigt werden können. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob sich die Expression von Oberflächenantigenen möglicherweise als Verlaufsparemeter eignet, deren Monitoring zur Verbesserung der Prognose der AML beitragen könnte. Da die AML noch immer eine ungünstige Prognose hat, wären die frühzeitige Erkennung eines drohenden Rezidivs und die daraus entstehende Möglichkeit zur rechtzeitigen Intervention von entscheidender Bedeutung. Besonders im Hinblick darauf, dass die Oberflächenantigene auch im Blut nachweisbar und damit einfacher erfassbar sind, stellt sich die Frage, welchen Stellenwert der Nachweis der Expression von Oberflächenantigenen in Zukunft bei der Behandlung von Akuten Myeloischen Leukämien hat.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen, zumindest in begrenzten Fallzahlen, einen Beitrag zu den genannten Fragestellungen leisten.

### 6.1 Einteilung der Kurven in einen stabilen und instabilen Verlauf der Oberflächenantigene

Um die Kurvenverläufe der myeloischen Oberflächenantigene der 32 Patienten mit AML genauer vergleichen zu können, wurden die Kurven in einen stabilen und einen instabilen Verlauf der Oberflächenantigene eingeteilt. Als Kriterium wurde dabei der Schwellenwert von 30% für die jeweiligen Oberflächenantigenmuster positiven Zellen angenommen, denn es hatte sich gezeigt, dass bei Patienten ohne Schwankungen im Kurvenverlauf die führenden Marker die Schwelle von 30% nicht überschritten, während bei den Patienten mit erheblichen Schwankungen im Kurvenverlauf die Oberflächenantigene die 30%-Marke zu einzelnen Zeitpunkten weit überstiegen.

Weiterführend stellte sich heraus, dass der stabile Verlauf der Oberflächenantigene meist mit einem klinisch eher günstigen Verlauf einhergeht. Im Gegensatz dazu ist der instabile Verlauf mit häufigen Komplikationen verbunden. Der Schwellenwert von 30% findet auch Anlehnung an den histologisch-zytologischen Werten der Zytomorphologie, die momentan der Goldstandard in der Beurteilung der AML sind. In der Zytomorphologie wird die Diagnose einer AML gestellt, wenn die Blasten im Knochenmark die Schwelle von 20 - 30%, bezogen auf alle Knochenmarkszellen, überschreiten (Harris et al. 1999, Kern et al. 2003). Ebenso wird auch im Verlauf der Krankheit ein Rezidiv durch mindestens 20 - 30% Blasten im Knochenmark gekennzeichnet. Die Ergebnisse der Arbeit zeigen eine enge Korrelation zwischen der Blastenzahl im Knochenmark und den in der Durchflusszytometrie erfassten Zellen, welche die untersuchten Oberflächenantigene exprimieren. Vor diesem Hintergrund findet der in dieser Arbeit erhobene Schwellenwert von 30% für das jeweilige Oberflächenantigen positiven Zellen seine Berechtigung.

## **6.2 Altersabhängigkeit der Kurvenverläufe**

Die AML ist eine Krankheit, deren Inzidenz mit zunehmendem Alter ansteigt. Exakte Daten zur altersabhängigen Inzidenz aus Deutschland liegen nicht vor, aber das amerikanische SEER-Programm (Surveillance Epidemiology and End-Result) des National Cancer Institute (NCI) hat zur Epidemiologie umfassende Analysen durchgeführt. Da die AML keine geographischen Unterschiede zeigt, können die Angaben zur Inzidenz auch für Deutschland gelten. Bei Patienten unter 60 Jahren liegt die Inzidenz in der Literatur bei 2 - 3 Patienten pro 100 000 Einwohner (Kern et al. 2004, Büchner et al. 1999). Aber schon ab einem Alter von 60 Jahren steigt die Zahl der Neuerkrankungen stetig und steil bis auf über 15 pro 100 000 Einwohner bei einem Alter von über 85 Jahren an (Wedding et al. 2003). Das mediane Erkrankungsalter wird dadurch in der Literatur zwischen 60 und 70 Jahren (Kern et al. 2004, Sekeres et al. 2002, Büchner et al. 1999) angegeben. Umgekehrt proportional dazu fällt bei zunehmendem Alter die Fünfjahresüberlebensrate. Bei Patienten unter 45 Jahren liegt sie noch bei 35,9%, aber bei 55- bis 64-jährigen beträgt sie nur noch 10%. Die durchschnittliche Fünfjahresüberlebensrate der unter 65-jährigen liegt bei 24,8%. Die schlechteste Prognose haben die Patienten im Alter von über 65 Jahren mit einer Fünfjahresüberlebensrate von unter 5% (Büchner et al.

2004, Wedding et al. 2003). Die schlechte Prognose bei älteren Patienten (Chang et al. 2004, Valet et al. 2003, Iwakiri et al. 2002, de Nully-Brown et al. 1997) ist bedingt durch die Zunahme ungünstiger Chromosomenveränderungen (Kern et al. 2004, Schoch et al. 2001, Wahlin et al. 2001) sowie der Komorbidität (Chen et al. 2005) mit steigendem Alter und dem daraus resultierenden verminderten Ansprechen der Therapie (Grigg et al. 2005, Stasi et al. 1996).

In diesen Zusammenhang können auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eingeordnet werden.

Die fünfzehn Patienten mit stabilem Kurvenverlauf der Oberflächenantigene weisen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einen Altersmedian von 46 Jahren auf. Damit verbunden zeigt sich ein zumeist klinisch komplikationsloser Verlauf der AML. Insgesamt sind in dieser Gruppe von 15 Patienten vier Patienten (24%) verstorben. Drei dieser Patienten sind aber nicht der Primärerkrankung sondern den Komplikationen der Transplantation oder einer Zweiterkrankung erlegen.

Bei den 17 Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene liegt der Altersmedian von 63 Jahren deutlich höher, ebenso wie die Rezidivrate und der damit verbundene häufigere Wechsel der Therapiestrategien. Neun Patienten (53%) sind innerhalb des Beobachtungszeitraumes verstorben, sieben (78%) von diesen bedingt durch die Grunderkrankung.

Damit wird die Erfahrung, dass ältere Patienten oft eine schlechtere Prognose haben, von den Ergebnissen der Patienten mit starken Schwankungen im Kurvenverlauf der Oberflächenantigene unterstützt.

### **6.3 Verteilung der Subtypen**

Die Einteilung der AML in verschiedene Subtypen anhand morphologischer und zytochemischer Kriterien wurde 1976 durch die FAB-Klassifikation standardisiert (Benett et al. 1976). Das Auftreten der drei Oberflächenmarker CD 13, CD 33 und CD 34 wird bei allen Subtypen beschrieben (Büchner et al. 1999, Scheinberg et al. 1997). Die Verteilung der Subtypen zwischen den Patienten mit stabilem und instabilem Verlauf der Oberflächenantigene zeigt keine signifikanten Unterschiede. Am häufigsten treten die Untergruppen AML M1 und AML M2 (Tabelle 4, Abbildung 10) auf, diese werden auch mit 18,8% für die M1 und mit 33,9% für die M2 in der Literatur (Kern et al. 2004) als am zahlreichsten beschrieben. Sie treten in den

beiden verschiedenen Verläufen der Oberflächenantigene etwa gleich häufig auf. In den letzten Jahren hat sich mit Verbesserung der Behandlungsstrategien zunehmend gezeigt, dass die Klassifikation nach FAB wenig klinische Relevanz besitzt (Wedding et al. 2003), sondern die Zytogenetik von entscheidender Bedeutung ist. Eine Studie der German AML Cooperativ Group (Haferlach et al. 2003) ergab, außer für die eher mit günstigen Chromosomenveränderungen assoziierten AML M3 und M4, keine prognostischen Unterschiede zwischen den Subtypen. Damit ist auch die annähernd gleiche Verteilung der Subtypen AML M1 und M2 unter den beiden verschiedenen Verläufen der Oberflächenantigene erklärbar. Lediglich eine leichte Häufung des Subtyps AML M3 bei Patienten mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene, die aufgrund der geringen Patientenzahlen in der Arbeit aber nur als tendenziell beschrieben werden kann, lässt sich mit den guten Therapieerfolgen, die mit der All-trans-Retin-Säure erlangt werden, erklären. Alle Patienten mit einem Myelodysplastischen Syndrom sind in der Gruppe mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene zu finden. Dies ist mit der für das MDS festgelegten Grenze von 5 - 30% Blasten im Knochenmark zu erklären (Lübbert und Lindemann 2002, Renz-Polster et al. 2001). Dass die Subtypen AML M0 und M4 - M6 fast ausschließlich bei Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene auftreten, hat wohl einerseits, ebenfalls in den geringen Fallzahlen begründet, einen eher zufälligen Charakter, andererseits wird aber die Prognose der AML M5, die häufig mit einer Veränderung der Bande 11q23 assoziiert ist, als ungünstig eingeschätzt. Während hingegen die AML M1 bis M4 eher mit prognostisch günstigen Translokationen assoziiert sind (Haferlach et al. 2004, Kern et al. 2004, Wilhelm et al. 2000). Die sekundäre AML weist ebenfalls eine ungünstigere Prognose auf (Repp et al. 2003). Diese Erkenntnis kann aber nicht mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit beurteilt werden, da sich mit nur jeweils einem Patienten in jeder Gruppe eine gleiche Verteilung findet.

## **6.4 Rezidivhäufigkeit**

Bei den Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene wurde eine signifikant höhere Rezidivrate als bei den Patienten mit stabilem Verlauf (Abbildung 11) ermittelt. Dies in Verbindung mit dem hohen Altersmedian der Gruppe und der davon abhängigen schlechteren Prognose bei der Behandlung gesehen,



unterstreicht die Aussagekraft der Oberflächenantigene auf den leukämischen Vorläuferzellen. Die signifikant höhere Rezidivrate bei Patienten mit instabilem Verlauf zeigt, dass auftretende Rezidive tatsächlich durch Anstiege der Oberflächenantigene über den Schwellenwert von 30% erfassbar sind.

Bei den 16 auswertbaren Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene sind dreizehn Rezidive (81%) aufgetreten. Bei der Patientin ohne Vergleichsdaten aus der Zytomorphologie kann durch die klinische Symptomatik ebenfalls von einem Rezidiv ausgegangen werden. Drei Patienten zeigten im Untersuchungszeitraum trotz größerer Schwankungen im Kurvenverlauf der Oberflächenantigene kein Rezidiv. Allerdings erreichte keiner dieser drei Patienten das Therapieziel einer kompletten Remission. Bei einer von diesen drei Patienten manifestierte sich eine extramedulläre Meningeosis leucaemica. Damit zeigt sich, dass selbst wenn kein Rezidiv auftritt, bei Erhöhung des Anteils an leukämischen Vorläuferzellen, welche die myeloischen Oberflächenantigene exprimieren, von keinem optimalen Erfolg der Behandlung ausgegangen werden kann.

Hingegen sind bei 13 (93%) von den vierzehn auswertbaren Patienten ohne größere Schwankungen im Kurvenverlauf der Oberflächenantigene keine Rezidive aufgetreten. Lediglich bei einer Patientin (7%) wurde im Rahmen ihres Myelodysplastischen Syndroms klinisch ein Rezidiv festgestellt. Zwar sind bei einem weiteren Patienten, der ebenfalls an einem MDS erkrankt war, grenzwertig hohe Blastenzahlen im Knochenmark nachzuweisen gewesen, die aber mit der Expression der Oberflächenantigene übereinstimmten. Bei der Patientin ohne Vergleichswerte aus der Zytomorphologie handelt es sich auch um eine Patientin mit MDS, deren klinische Daten aber auf kein Rezidiv hinweisen. Da das Myelodysplastische Syndrom schon definitionsgemäß eine höhere Blastenzahl zwischen 5 - 30% aufweist, aber dennoch eher nur einen langsam progredienten Verlauf der Erkrankung zeigt, stehen diese Ergebnisse wiederum mit dem stabilen Verlauf der Oberflächenantigene im Einklang. Folglich ist eine geringe Dynamik der Expression von Oberflächenantigenen auf den leukämischen Zellen zumeist mit einem komplikationslosen Verlauf der Erkrankung verbunden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Einteilung in einen stabilen und einen instabilen Verlauf der Oberflächenantigene sehr genau den Verlauf der Akuten Myeloischen Leukämie hinsichtlich des Auftretens von Rezidiven beschreiben kann.

## **6.5 Zusammenhang zwischen Therapie und Verlauf der Oberflächenantigene**

In dieser Arbeit wurden nicht einzelne Therapiestrategien auf ihre Wirksamkeit analysiert, sondern die Untersuchungen sollten viel mehr der Beobachtung individueller Krankheitsverläufe dienen.

Nach Komplikationen durch Rezidive oder refraktärer AML erfolgen häufig Therapiewechsel, während bei einem klinisch komplikationslosen Verlauf der AML eher eine Therapie ohne Wechsel des Behandlungsschemas durchgeführt wird. Dies wird auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deutlich. Signifikant häufiger waren Therapiewechsel bei Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene zu beobachten, die meistens eine Umorientierung von den Standardprotokollen Ara-C mit Idarubicin bei Patienten unter 60 Jahren und Ara-C und Mitoxantron bei Patienten über 60 Jahren auf das Ida/Flag-Protokoll beinhalteten. Auch wurden häufiger Salvage-Therapien mit hochdosiertem Ara-C und Cyclophosphamid (hAC-Protokoll) bei partiellen Remissionen oder Rezidiven durchgeführt. Transplantationen im Sinne einer ultima ratio oder alternative Therapieverfahren mit palliativem Ansatz kamen ausschließlich bei Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene zum Einsatz.

Bei den Patienten ohne größere Schwankungen im Kurvenverlauf der Oberflächenantigene stellt sich ein völlig anderes Bild dar. Hier wurde bei nahezu allen Patienten ein durchgängiges Therapiekonzept angewandt: beginnend mit einer Induktionstherapie, gefolgt von einer Konsolidierungstherapie und gegebenenfalls daran im Anschluss eine Erhaltungstherapie oder Transplantation, um die erreichte komplette Remission zu sichern. Therapiewechsel beschränkten sich auf eine Salvage-Therapie nach dem hAC-Protokoll bei einzelnen Patienten, die keine komplette Remission erreicht hatten. Patienten, die an einem Myelodysplastischen Syndrom erkrankt waren, wurden keiner Chemotherapie zugeführt.

Das in den beiden Gruppen sehr unterschiedliche Therapieverhalten als ein Maß für den klinischen Verlauf der Erkrankung unterstreicht damit ebenfalls die Aussagekraft der Einteilung der Oberflächenantigene in einen stabilen und instabilen Verlauf.

## **6.6 Zusammenhang zwischen Letalität und Verlauf der Oberflächenantigene**

In diesem Sinne sind auch die Letalitätsraten in den beiden Gruppen zu bewerten. Insgesamt sind 13 von 32 Patienten, also mehr als ein Drittel, innerhalb eines Beobachtungszeitraums von insgesamt zweieinhalb Jahren verstorben. Bei einem Altersmedian von allen 32 Patienten von 58,5 Jahren und einem Mittelwert von 55 Jahren ist die dennoch relativ geringe Letalitätsrate verwunderlich, da in der Literatur eine Fünfjahresüberlebensrate von 24,8% bei Patienten unter 65 Jahren angegeben wird (Kern et al. 2004). Allerdings handelt es sich bei der Angabe um eine Fünfjahresüberlebensrate, während sich der Beobachtungszeitraum nur über zweieinhalb Jahre erstreckte.

Der sehr große und sehr steile Anstieg bei fünf Patienten, die wenig später der Erkrankung erlagen, könnte einen Indikator für einen fulminanten Verlauf darstellen. Von den 17 Patienten mit instabilem Verlauf sind neun (53%) verstorben, hauptsächlich an Komplikationen der Grundkrankheit. Dieses Ergebnis lässt sich gut mit dem hohen Altersmedian von 63 Jahren bei den Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene und der damit verbundenen schlechteren Prognose vereinbaren. Bei den 15 Patienten mit stabilem Verlauf sind mit vier Patienten (27%) deutlich weniger gestorben, als in der Vergleichsgruppe. Auffälligerweise erlagen die Patienten oft den Folgen der Therapie, also Graft-versus-host-Reaktionen nach der Transplantation oder sie sind an Zweiterkrankungen verstorben. Die bessere Prognose könnte in dem geringen Altersmedian von 47 Jahren und den damit verbundenen prognostisch eher günstigeren Chromosomenveränderungen sowie der niedrigeren Komorbidität begründet sein.

## 6.7 Etablierung eines Leitwertes

Der größte Teil der vorliegenden Arbeit hat sich mit der Beschreibung der Kurvenverläufe der Oberflächenantigene beschäftigt, um deren Aussagekraft als Verlaufsparemeter der AML zu untersuchen. Ziel war es, bestimmte Konstellationen der Kurvenverläufe sowie Richtwerte anzugeben, die ein frühzeitiges Erkennen von Veränderungen wie Rezidiven ermöglichen.

Daher ist die Frage, welches der Oberflächenantigene am genauesten den Entwicklungsprozess der Akuten Myeloischen Leukämie widerspiegelt, von großer Relevanz.

Zunächst ist zu sagen, dass alle drei Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34 den Verlauf der Krankheit darstellen können, allerdings mit unterschiedlicher Häufigkeit (Tabelle 6, Abbildung 12). Eine genauere Aussage kann man bei Betrachtung der unterschiedlichen Ergebnisse in den beiden Gruppen treffen.

Bei den Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene wird die Progression der AML durch CD 13 und CD 34 allein sowie durch die Kombinationen von CD 13 mit CD 33, CD 13 mit CD 34 oder von CD 33 mit CD 34 beschrieben.

Die Oberflächenmarker CD 33 und CD 34 oder die Kombination aus beiden kann als charakteristisch für den Krankheitsverlauf bei Patienten ohne größere Schwankungen im Kurvenverlauf der Oberflächenantigene angesehen werden.

In der Literatur wird hauptsächlich Stellung zur prognostischen Aussagekraft der einzelnen Oberflächenmarker genommen. Dabei differieren die Ergebnisse der verschiedenen Studien mitunter sehr (Kanda et al. 2000). Die Ursache dafür kann in den methodischen Unterschieden bei der Bestimmung der Oberflächenantigene begründet sein sowie auch in den untersuchten Patientenpopulationen, die oft sehr unterschiedlich groß und ungleich in der Zusammensetzung waren. Auch die verschiedenen Therapieregime, die angewandt worden sind, können einen Einfluss haben (Bene et al. 1999, Rigolin et al. 1995).

Das Oberflächenantigen CD 34, ein Glycophosphoprotein, ist kennzeichnend für die Stammzellen. Scolnick et al. 2002 zeigten, dass CD 34 bei AML signifikant höher exprimiert wird, als auf normalen Myeloblasten und damit nützlich sein könnte für den

Nachweis persistierender Leukämiezellen (Minimal Residual Disease). Er verweist darauf, dass weiterführend CD 34 als möglicher Parameter für eine Therapieüberwachung untersucht werden sollte. Eine andere Studie von Haase et al. 1997 beschrieb progressions-assoziierte Chromosomenaberrationen bei CD 34 exprimierenden Stammzellen. Eine Vielzahl von Studien wies für Patienten, deren myeloische Vorläuferzellen sehr stark CD 34 exprimieren, eine schlechtere Prognose nach, die sich in einer niedrigeren kompletten Remissionsrate (Junghanss et al. 2005, Chang et al. 2004, Repp et al. 2003, Xu et al. 2003, Raspadori et al. 1997, Lauria et al. 1995, Solary et al. 1992, Lee et al. 1992, Thomas et al. 1992, Geller et al. 1990) sowie auch in einer geringeren Gesamtüberlebenszeit (Repp et al. 2003, Raspadori et al. 1997, Solary et al. 1992, Lee et al. 1992, Myint et al. 1992, Thomas et al. 1992) manifestiert.

Damit ist zu vereinbaren, dass bei fünf Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene CD 34 als führender Marker in Erscheinung tritt. Zudem war bei zwei weiteren Patienten sowie bei drei Patienten aus der Gruppe mit stabilem Verlauf zum Diagnosezeitpunkt kein CD 34 nachweisbar. Im folgenden Beobachtungszeitraum war der Krankheitsverlauf bei diesen Patienten stabil. Aber auch bei drei Patienten mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene war die Expression von CD 34 maßgeblich. Zudem entwickelte sich bei zwei Patienten mit instabilem Verlauf, die zu Beginn kein CD 34 exprimierten, dennoch ein Rezidiv. Dieses nicht ganz eindeutige Ergebnis lässt sich in die Studie von Kanda et al. 2000, der die Daten von 2483 Patienten aus 22 Studien verglichen hat, einordnen. Sie hat gezeigt, dass zwar die kombinierte Odds Ratio aller Studien bestätigt, dass die Expression von CD 34 mit einer schlechteren Prognose verbunden ist, jedoch die Odds Ratio der Studien, die nach 1994 publiziert worden sind, nicht so deutlich ausfiel und damit CD 34 nicht zwangsläufig mit einer schlechten Prognose assoziiert ist. Auch Sperling et al. 1995, de Nully-Brown et al. 1997 und Creutzig et al. 1995 beschrieben Patienten mit CD 34 positiver AML als eine heterogene Gruppe mit sowohl positiven als auch negativen Risikofaktoren und erklären, dass CD 34 keine prognostische Signifikanz zukommt. Während Maynadie et al. 2002 die unterschiedliche Prognose für CD 34 in der Expression verschiedener Epitope begründet sahen, die mit bestimmten strukturellen oder numerischen Chromosomenaberrationen assoziiert sind.

Einer erhöhten Expression von CD 13 wird eine prognostisch negative Aussagekraft für den Verlauf der AML zugeschrieben, verbunden mit einer signifikant niedrigeren kompletten Remissionsrate (Kristensen et al 1991, Griffin et al. 1986) und einer geringeren Gesamtüberlebenszeit (Repp et al. 2003, Valet et al. 2003, Kristensen et al. 1991, Schwarzinger et al. 1990).

Bei den vorliegenden Ergebnissen ist CD 13 und die Kombination von CD 13 und CD 33 sowie die Assoziation des CD 13 mit CD 34 tatsächlich wesentlich häufiger bei Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene zu finden gewesen und folglich mit einer höheren Rezidivrate und einer erhöhten Letalitätsrate vergesellschaftet. Während hingegen beim stabilen Verlauf dem CD 13 keine entscheidende Aussagekraft zukommt.

Für eine erhöhte Anzahl an leukämischen Vorläuferzellen, die durch CD 33 gekennzeichnet sind, wurde in der Studie von Repp et al. 2003 mit 716 Patienten eine höhere Gesamtüberlebensrate mit einem p-Wert von 0,05 nachgewiesen. Dieses Ergebnis wurde auch durch Studien von de Nully-Brown et al. 1997, Solary et al. 1992 und Kristensen et al. 1991 bestätigt.

Diese Ergebnisse zeigen sich ebenfalls in der vorliegenden Arbeit, denn CD 33 tritt vermehrt beim stabilen Verlauf der Oberflächenantigene auf. Allerdings ist auch die Kombination von CD 33 und CD 34 in dieser Gruppe häufiger vertreten. Baer et al. 2001 zeigten hingegen, dass die leukämischen Zellen bei einer Vielzahl der 136 untersuchten Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose und zum Zeitpunkt des Rezidivs CD 33 positiv waren oder bei Diagnose CD 33 negative Zellen beim Rezidiv CD 33 exprimierten. Dies wiederum würde die häufigen Kombinationen von CD 33 mit CD 13 und CD 33 mit CD 34 bei dem instabilen Verlauf der Oberflächenantigene erklären.

Einige Studien haben sich auch mit der Prognose bestimmter Kombinationen von Oberflächenantigenen beschäftigt. So zeigten Legrand et al. 2000 bei einer Studie mit 177 Patienten, dass kein einzelnes Oberflächenantigen mit einer höheren oder niedrigeren kompletten Remissionsrate assoziiert ist. Sie erklärten, dass lediglich die Expression eines panmyeloiden Phänotyps (MPO, CD 13, CD 33, CD w65 und CD 117) mit einer höheren kompletten Remissionsrate sowie einer höheren Gesamtüberlebenszeit verbunden ist. Auch Mason et al. 2005 beschrieben einen hohen diagnostischen Wert für den panmyeloiden Phänotyp.

Lanza et al. 1994 wiesen hingegen der Kombination von CD 33 und CD 34 eine unabhängige prognostische Aussagekraft bei allen FAB-Subtypen zu, die sich in einer kürzeren Überlebensrate widerspiegelt. Auch Thomas et al. 1992 ermittelten eine ansteigende Expression dieser beiden Marker beim Rezidiv.

Diese Ergebnisse lassen sich nicht durch die vorliegende Arbeit bestätigen. Zwar wird bei drei Patienten (18%) mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene der Verlauf durch CD 33 und CD 34 bestimmt, aber bei einer größeren Zahl an Patienten wird durch diese Markerkombination ein stabiler Verlauf gekennzeichnet.

Als Grund dafür kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht. Zum einen sind auch in den oben genannten Studien keine einheitlichen Ergebnisse zu finden, weder zum CD 33 noch zum CD 34. Zum anderen ist die von uns untersuchte Patientenpopulation relativ klein. Des Weiteren können in geringem Maße auch technische Fehlmessungen bei der Durchflusszytometrie eine Fehlerquelle sein. Falsch negative Ergebnisse können auftreten, da man bei manchen Fällen von Akuter Myeloischer Leukämie keine unreif imponierenden Zellen findet oder die Leukämiezellen nicht immer in der typischen Blastenregion liegen. Außerdem wurde für die Immunphänotypisierung erst die zweite Knochenmarkprobe herangezogen. Dabei kann es zur Blutverdünnung kommen und der Gehalt an unreifen Zellen gemindert werden. Falsch positive Ergebnisse können zudem auch durch Plasmazellen, rote Vorstufen, Basophile, Granulozyten, Thrombozytenaggregate oder Debris verursacht werden (Hübl et al. 2002). Da die meisten Antigenexpressionsmuster auch in normalem, insbesondere aber in regenerierendem Knochenmark in geringer Konzentration nachgewiesen werden können, sind zusätzliche fehlerhafte Messwerte denkbar (Reinhardt et al. 2002).

Allerdings beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mehr mit dem Verlauf der Oberflächenantigene in Bezug auf die Entwicklung der Krankheit. Die meisten Studien hingegen haben nur zu einzelnen definierten Zeitpunkten die Werte der Oberflächenantigene ermittelt und unter Berücksichtigung des klinischen Verlaufs daraus eine Aussage zur Prognose abgeleitet. Daher lassen sich die von uns erhobenen Daten nicht vollständig in die Erkenntnisse anderer Studien einordnen, aber eine Tendenz zur Übereinstimmung ist dennoch erkennbar.

So präsentiert sich beim instabilen Verlauf vermehrt CD 13 als maßgebend. Sowohl in der Kombination von CD 13 mit CD 34 als auch bei der Kombination von CD 13 mit CD 33 ist möglicherweise CD 13 der führende Marker.

Beim stabilen Verlauf der Oberflächenantigene präsentiert sich vor allem CD 33 als ausschlaggebend. Vielleicht kommt dabei CD 33 bei der mehrfach aufgetretenen Kombination CD 33 und CD 34 eine entscheidende Rolle zu.

Die Rolle des CD 34 ist jedoch nicht eindeutig. Zwar beschreibt CD 34 am häufigsten den Verlauf der AML, lässt sich aber nicht eindeutig mit einem besseren oder schlechteren Verlauf der Erkrankung in Verbindung bringen.

In die Studien bezüglich der prognostischen Aussagekraft der myeloischen Oberflächenantigene beim MDS lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nur teilweise einordnen. So zeigten Shao et al. 1998 eine vermehrte Expression der Oberflächenantigene CD 13 und CD 33 beim MDS, und Elghetany et al. 1998 wiesen für diese Marker sowie auch für CD 34 eine schlechtere Prognose nach. Bei den drei untersuchten Patienten mit MDS war jedoch ein stabiler Verlauf der Oberflächenantigene zu beobachten. Zwar verlief bei allen der Anteil an Zellen, die die myeloischen Oberflächenantigene exprimieren, auf einem relativ hohen Niveau, aber nur eine Patientin erlitt im Beobachtungszeitraum klinisch ein Rezidiv. Ein Übergang des MDS in eine sekundäre AML ist bei zwei Patienten aufgetreten. Bei beiden Patienten zeigte sich kein optimaler Behandlungserfolg. Die Patientin mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene erreichte nur eine partielle Remission, während der Patient mit instabilem Verlauf ein Rezidiv entwickelte. Beide Patienten verstarben. Diese Verläufe entsprechen der Studie von Shi et al. 2004, der für eine post MDS-AML eine höhere Expression von CD 13, CD 33 und CD 34 in Verbindung mit einer niedrigeren Remissionsrate und geringeren Überlebensrate nachwies.

Bei diesen fünf Patienten mit MDS und sekundärer AML zeigte sich jedoch, dass vor allem CD 13 und CD 34 mit einer schlechteren Prognose verbunden waren. CD 33 hingegen trat mehr bei einem komplikationslosen Verlauf in den Vordergrund. Diese Resultate würden wiederum die oben diskutierten Ergebnisse bezüglich der Aussagekraft der einzelnen myeloischen Oberflächenantigene zur Verlaufsbeobachtung bei AML bekräftigen.

Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen der Arbeit gelten nicht für die prognostische Aussagekraft der einzelnen Oberflächenantigene zu einem bestimmten Zeitpunkt, sondern nur für den Verlauf der Akuten Myeloischen Leukämie.



Jedes der Oberflächenantigene kann als Verlaufspareter herangezogen werden. Jedoch verdienen CD 33 und CD 34 allein sowie die Kombinationen von CD 13 mit CD 33 und CD 33 mit CD 34 besondere Beachtung, weil diese am ehesten dem Verlauf der Krankheit entsprechen und damit auch Veränderungen wie Rezidive erfassen können.

Dies wird besonders ersichtlich an den Abbildungen 13 und 15, die jeweils die Mittelwerte der Blastenzahl der Knochenmarkpunktionen vergleichend mit den Mittelwerten von CD 34 und von CD 13, CD 33 und CD 34 gemeinsam von Patienten mit stabilen und instabilen Verläufen der Oberflächenantigene darstellen. Dabei zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Patienten mit stabilem und instabilem Verlauf, sowohl bei den Ergebnissen der Zytomorphologie als auch bei den Werten der Oberflächenantigene. Jedoch weisen in Abbildung 13 und 15 sowohl die stabilen als auch die instabilen Kurvenverläufe der Oberflächenantigene einen sehr ähnlichen Verlauf wie die Ergebnisse der Knochenmarkuntersuchungen in der jeweiligen Gruppe auf. Insbesondere die in Abbildung 13 dargestellten Mittelwerte des CD 34 stimmen beim stabilen und instabilen Verlauf der Oberflächenantigene sehr genau mit den Ergebnissen der Zytomorphologie überein. Dies veranschaulicht die Bedeutung des CD 34 sowohl beim stabilen als auch beim instabilen Verlauf der Oberflächenantigene. In den Abbildungen 14 und 15 stellt sich kein so eindeutiges Bild dar, da die Graphen der Mittelwerte von CD 33 sowie von CD 13, CD 33 und CD 34 gemeinsam im Vergleich zu den Mittelwerten der Knochenmarkuntersuchungen insbesondere beim instabilen Verlauf voneinander abweichen.

Diese Diskrepanz kann zum Teil dadurch bedingt sein, dass die Kurvenverläufe der Patienten nicht von allen Oberflächenantigenen gemeinsam charakterisiert werden und somit das Ergebnis des Mittelwerts eines einzelnen Oberflächenantigens sowie auch des Mittelwertes aller Oberflächenantigene verfälscht werden kann. Zum anderen können wie Baer et al. 2001 gezeigt haben, auch Änderungen in der Expression des Immunphänotyps (Antigenshift) beim Auftreten von Rezidiven im Vergleich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung vorkommen. Außerdem sind die Daten der Zytomorphologie mitunter etwas lückenhaft, sodass nicht jeder Messung der Oberflächenantigene ein Vergleichswert aus der Knochenmarkuntersuchung gegenübersteht. Aus diesen Gründen ist ein Abweichen der Kurven voneinander möglich. Dennoch ist bei den Patienten mit stabilem und instabilem Verlauf jeweils

ein annähernd gleiches Verhalten der Kurven der Oberflächenantigene und der Knochenmarkergebnisse erkennbar.

## 6.8 Ermittlung einer Richtgröße

Ein Blastengehalt im Knochenmark von 20 - 30% ist derzeit das quantitative Kriterium für die Diagnose einer AML und auch für das Auftreten eines Rezidivs. Daran orientiert sich auch der in dieser Arbeit erhobene Schwellenwert von 30% für den jeweiligen Marker positiven Zellen im Knochenmark, anhand dessen die Einteilung in einen stabilen und instabilen Verlauf der Oberflächenantigene erfolgt.

Ein instabiler Verlauf mit vielen Schwankungen ist mit einer höheren Rezidivrate verbunden. Um also eine Richtgröße für einen Anstieg, der ein Rezidiv auch tatsächlich erfasst, festzulegen, ist zunächst die Grundvoraussetzung, dass der Anteil an Zellen, welche die myeloischen Oberflächenantigene exprimieren, über die Schwelle von 30% ansteigt.

Dies ist bei 13 (93%) von vierzehn Patienten, die ein Rezidiv entwickelten, eingetreten. Um den Anstieg näher zu beschreiben, wurde die Differenz vom Beginn des Anstieges bis zum Auftreten eines Rezidivs oder dem folgendem Abfall der Oberflächenantigene bestimmt. Dabei sollte die Zeitspanne nicht mehr als drei Monate betragen, damit der Begriff eines Anstieges überhaupt berechtigt ist.

Bei den 15 ausgewerteten Patienten mit instabilem Markerprofil zeigten die Verläufe der einzelnen Oberflächenantigene 41 deutliche Anstiege von minimal 20% bis maximal 94%. Dabei lagen die Mittelwerte der Anstiege, die mit einem Rezidiv verbunden waren, mit 54% für CD 13, 54% für CD 33 und 56% für CD 34 eng beieinander. Insgesamt sind bei 28 Anstiegen (68%) Rezidive aufgetreten. Lediglich sieben Anstiege (17%) zwischen 32% und 47%, die jedoch im unteren Bereich lagen, waren mit keinem Rezidiv verbunden.

Alle Patienten, deren Differenzen des Anstieges noch unter 30% lagen, selbst wenn der Schwellenwert von 30% positiven Zellen überschritten wurde, entwickelten bis auf einen Patienten mit einem Anstieg von 20% kein Rezidiv. Allerdings bewegte sich die Blastenzahl bei diesem Patienten schon vor dem Anstieg auf einem sehr hohen Niveau.

Bei zwei Patienten war für einzelne Oberflächenantigene kein größerer Anstieg zu verzeichnen. Allerdings lagen die Oberflächenantigene über einen längeren Zeitraum

auf einem grenzwertig hohen Niveau. Bei beiden Patienten haben die Blasten im Knochenmark die Schwelle zum Rezidiv überschritten, und einer dieser Patienten ist an der Krankheit verstorben.

Weist also der Verlauf eines der drei Oberflächenantigene CD 13, CD 33 oder CD 34 einen Anstieg von über 30% auf, ist signifikant häufiger mit dem Auftreten eines Rezidives zu rechnen. Zeigen die Oberflächenantigene hingegen keinen deutlichen Anstieg, bewegen sich aber dauerhaft auf einem sehr hohen Niveau, ist eine Blastenpersistenz, die sich grenzwertig zum Rezidiv bewegt, sehr wahrscheinlich.

## **6.9 Änderung der Oberflächenantigene im Verlauf**

Um die Entwicklung der Krankheit verfolgen oder möglicherweise vorhersagen zu können, sollte der Verlauf der Expression der Oberflächenantigene untersucht werden. Dabei wurde das Verhalten der einzelnen Oberflächenantigene zueinander überprüft und versucht, Unterschiede sowohl im stabilen Verlauf als auch im instabilen Verlauf der Oberflächenantigene darzustellen, die eine Aussage zum Krankheitsverlauf ermöglichen.

Es hat sich gezeigt, dass bei acht (53%) der 15 Patienten ohne größere Schwankungen im Kurvenverlauf ein gemeinsamer Verlauf der Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34 zu finden war. Hinzu kommen noch die drei Patienten, deren Oberflächenantigene zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine Trennung von CD 13 und CD 33 von CD 34 aufwiesen, dann aber im weiteren Verlauf nach der ersten Induktionstherapie einen gemeinsamen Verlauf ohne Komplikationen zeigten. Bei zwei weiteren Patienten entfernten sich die Verläufe der Oberflächeantigene voneinander, trennten sich aber nicht über den Wert von 20%, der in der vorliegenden Arbeit als Kriterium für eine Trennung angesetzt wurde. Insgesamt kann man also bei 13 (87%) von 15 Patienten von einem gemeinsamen Verlauf der Oberflächenantigene sprechen. Nur eine Patientin, die an einem MDS erkrankt war, erlitt im Beobachtungszeitraum klinisch ein Rezidiv. Zwei Patienten zeigten eine Trennung, bei der es sich beide Male um eine Abweichung des CD 13 von CD 33 und CD 34 handelte. Da im Abschnitt 6.7. gezeigt wurde, dass der Verlauf von CD 13 beim stabilen Verlauf der Oberflächenantigene eher eine untergeordnete Rolle spielt, ist diesem Ergebnis wohl keine größere Bedeutung beizumessen.

Beim instabilen Verlauf der Oberflächenantigene wies lediglich ein Patient (6%) einen gemeinsamen Verlauf der Oberflächenantigene auf, der allerdings auch mit einem Rezidiv verbunden war. Bei allen anderen vierzehn auswertbaren Patienten haben sich die Kurvenverläufe der Oberflächenantigene über 20% voneinander getrennt.

Bei elf (79%) von diesen 14 Patienten kam es zum Zeitpunkt der Trennung der Kurvenverläufe der Oberflächenantigene oder kurze Zeit danach zu einem Rezidiv. Drei Patienten (21%) waren in dieser Zeit rezidivfrei, wiesen aber alle zum Zeitpunkt der Trennung nur eine partielle Remission auf. Demnach ist bei Trennung der Oberflächenantigene mit keinem optimalen Behandlungserfolg, sondern eher mit Komplikationen zu rechnen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass ein gemeinsamer Verlauf der Oberflächenantigene signifikant häufiger mit einem stabilen Verlauf und damit einer klinisch stabilen Entwicklung der AML assoziiert ist, während eine Trennung der Kurvenverläufe der Oberflächenmarker mit einem signifikant erhöhten Rezidivrisiko behaftet ist.

### **6.10 Zeitlicher Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Oberflächenantigene und den Ergebnissen der Zytomorphologie**

Ein wesentlicher Aspekt der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Möglichkeit einer Früherkennung oder sogar Vorhersage von Rezidiven durch die Oberflächenantigene.

Grundlegend war die Einteilung in einen stabilen und instabilen Verlauf. Anhand der Rezidivhäufigkeit, der Therapiestrategien und der Todesursachen wurde gezeigt, dass diese Einteilung dem klinischen Verlauf der Erkrankung mit niedriger oder hoher Komplikationsrate entspricht. Daher galt der weitere Teil der Arbeit der Untersuchung des genauen Verlaufs der Oberflächenantigene, um einen dominanten Marker zu ermitteln und um eine Richtgröße festzulegen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv erfassen kann.

Diese Herangehensweise war Voraussetzung, um den zeitlichen Zusammenhang zwischen dem Verlauf der Oberflächenantigene und den Ergebnissen der Zytomorphologie zu untersuchen und um Aussagen zur Rezidivfrüherkennung mittels der Oberflächenantigene treffen zu können.

Beim stabilen Verlauf der Oberflächenantigene war bei 13 (93%) von 14 auswertbaren Patienten eine zeitgleiche Entwicklung der Oberflächenantigene und der Ergebnisse der Knochenmarkzytologie zu verzeichnen. Lediglich bei einem Patienten zeigten die Oberflächenmarker Veränderungen im Verlauf der Erkrankung vorzeitig an.

Bei den 15 auswertbaren Patienten mit instabilem Kurvenverlauf war eine annähernd gleiche Verteilung zwischen zeitgleich, bzw. leicht später und vorzeitig zu verzeichnen. Bei acht (53%) Patienten zeigten die Oberflächenantigene schon vorzeitig eine Veränderung im Krankheitsverlauf an, die dann im darauf folgenden Zeitraum auch von den Ergebnissen der Zytomorphologie bestätigt wurde. Fünf weitere Patienten (33%) wiesen zeitgleiche Veränderungen auf. Lediglich bei zwei Patienten (13%) folgten die Oberflächenantigene zeitlich nur leicht verzögert den Befunden der Knochenmarkuntersuchungen.

Insgesamt zeigte sich, dass die Immunphänotypisierung bei insgesamt neun (31%) der 29 auswertbaren Patienten ein Rezidiv früher erfasste als die Zytomorphologie. In dieses Resultat fließt jedoch noch ein anderer Gesichtspunkt mit ein. Denn Veränderungen im Krankheitsverlauf sind zumeist Ausdruck von Komplikationen und treten daher hauptsächlich beim instabilen Verlauf der Oberflächenantigene auf. Und in dieser Gruppe wurde immerhin bei mehr als der Hälfte aller Patienten ein Rezidiv frühzeitig erkannt. Damit könnte der Verlaufskontrolle der AML mittels der Oberflächenantigene CD 13, CD 33 und CD 34 in Zukunft klinisch eine große Bedeutung zukommen.

Die Studien der letzten Jahre haben sich hauptsächlich mit dem prognostischen Stellenwert der verschiedenen Oberflächenantigene zu bestimmten Zeitpunkten auseinandergesetzt. Zu den diagnostischen Möglichkeiten einer Verlaufsbeobachtung der Oberflächenantigene finden sich in der aktuellen Literatur keine Aussagen. Diese Arbeit ist die erste Untersuchung, die sich mit der Verlaufsbeobachtung der Oberflächenantigene zur frühzeitigen Rezidivdiagnostik bei

Akuter Myeloischer Leukämie beschäftigt. Daher sollten die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse zur Aussagekraft der Richtgröße von 30% sowie des gemeinsamen oder getrennten Verlaufs der Oberflächenantigene hinsichtlich einer frühzeitigen Diagnostik von Rezidiven in größeren Studien nachgeprüft werden. Ähnliches gilt für den zeitlichen Zusammenhang der Kurvenverläufe der Oberflächenantigene mit den Ergebnissen der Zytomorphologie.

## 6.11 Bedeutung der Expression von CD 10 und CD 19

Die Immunphänotypisierung hat sich ergänzend zur Zytomorphologie und Zytochemie bei der Diagnostik der AML durchgesetzt. Neben der Untersuchung der prognostischen Aussagekraft der einzelnen myeloischen Oberflächenantigene, galt in den letzten Jahren besonderes Augenmerk der aberranten Antigenexpression. Dazu zählt die Koexpression lymphatischer Oberflächenantigene sowie die asynchrone Antigenexpression, d.h. die gleichzeitige Expression unreifer und reifer Oberflächenantigene, die innerhalb der normalen Hämatopoese nur in unterschiedlichen Entwicklungsphasen nachweisbar sind (Fonatsch et al. 2003). Von speziellem Interesse war dabei die prognostische Bedeutung der lymphoiden Antigenexpression. Verschiedene Studien wiesen eine Koexpression lymphatischer Oberflächenantigene auf den myeloischen Vorläuferzellen bei AML nach. Die Angaben differierten zwischen 20% - 35% (Fonatsch et al. 2003, Xu et al. 2003, Zhu et al. 2002, Bahia et al. 2001, Tien et al. 1993, Ball et al. 1991). Die lymphoiden Oberflächenantigene waren zumeist das CD 2, CD 7 und das in der vorliegenden Arbeit untersuchte CD 19. Zhu et al. 2002 wiesen diese lymphoiden Antigene häufiger bei CD 34 positiver AML nach. Die prognostische Bedeutung der lymphoiden Antigenexpression ist umstritten. So zeigten Perea et al. 2005, Xu et al. 2003, Zhu et al. 2002, Stasi et al. 1996, Bradstock et al. 1994, Del Poeta et al. 1994 und Urbano-Ispizua et al. 1992 eine Assoziation mit einer niedrigeren kompletten Remissionsrate und Perea et al. 2005, Valet et al. 2003, Del Poeta et al. 1994 eine Auswirkung auf die Gesamtüberlebensrate. Während Legrand et al. 2000, de Nully-Brown et al. 1997, Creutzig et al. 1995 und Tien et al. 1993 keine prognostische Aussagekraft für die lymphoide Antigenexpression feststellen konnten. Ball et al. 1991 gaben hingegen für die lymphoide Antigenexpression von CD 2 und CD 19 eine höhere Remissionsrate und längere Überlebenszeit an. Auch Pituch-Noworolska

2001 ermittelte für die Kombination von CD 34 mit einem atypischen Immunphänotyp eine positive Wirkung auf Therapie und Remission.

In der vorliegenden Arbeit wurden bei 20 (63%) Patienten eine Expression der lymphoiden Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 beobachtet, die sich in einem instabilen Verlauf der Oberflächenantigene darstellt. Von diesen 20 Patienten entwickelten neun (45%) ein Rezidiv. Ein stabiler Verlauf ohne deutliche Ausprägung von CD 10 oder CD 19 fand sich bei zwölf Patienten (38%). Bei fünf (42%) von diesen Patienten sind Rezidive aufgetreten. Dieses Ergebnis zeigt keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Rezidivhäufigkeit zwischen den beiden verschiedenen Verläufen der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19. Hingegen sind von den 20 Patienten mit instabilem Verlauf der Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 insgesamt zehn (50%) Patienten verstorben, während von den zwölf Patienten mit stabilem Verlauf nur drei (25%) Patienten der Erkrankung erlagen. Unter Berücksichtigung dieses Gesichtspunktes würden die Ergebnisse am ehesten für eine schlechtere Prognose bei der Koexpression lymphatischer Oberflächenantigene sprechen und sich damit in die Mehrzahl der oben aufgeführten Studienergebnisse einreihen.

Deutliche, aber nicht signifikante Unterschiede, zeigten sich bei der genaueren Betrachtung des Verlaufes der Oberflächenantigene. Bei 21 Patienten (66%) verliefen die Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 gemeinsam, dabei sind nur sieben Rezidive (33%) aufgetreten. Während hingegen bei elf Patienten (34%) eine Trennung des CD 19 über das CD 10 erfolgte. Bei sieben Patienten (64%) waren damit Rezidive verbunden, und sechs von diesen Patienten (54%) sind der Krankheit erlegen. Vor allem die sehr steilen Anstiege waren mit einer hohen Rezidivwahrscheinlichkeit behaftet.

Einen weiteren auffälligen Punkt stellten die einzelnen Peaks dar, die bei neun Patienten (43%) mit gemeinsamem Verlauf der Oberflächenantigene auftraten. Diese Anstiege waren innerhalb kürzester Zeit nach einer Transplantation, einer Konsolidierungstherapie mit Cytosinarabinsid und Mitoxantron oder einer Erhaltungstherapie zu beobachten gewesen. Da jedoch diese kurzfristigen Spitzenwerte ohne prognostische Relevanz für den weiteren Verlauf der Erkrankung waren, bleibt die Bedeutung dieser Peaks fraglich.

Gegenstand weiterer intensiver Forschungsarbeit war die aberrante Antigenexpression in Bezug auf die Minimal Residual Disease (MRD), also der Nachweis persistierender Leukämiezellen, mit dem Ziel, Rezidive möglichst frühzeitig erkennen oder vorhersagen zu können.

Zum Nachweis der persistierenden Leukämiezellen wird neben den myeloischen Markern CD 13, CD 33 und CD 34 auch die aberrante Antigenexpression auf den leukämischen Blasten genutzt. Denn bei jedem Patienten weist die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose ein bestimmtes Muster an Oberflächenantigenen auf, von denen man annimmt, dass sie von den persistierenden Leukämiezellen trotz zytologisch kompletter Remission exprimiert werden und diese damit identifiziert werden können.

Die Daten der vorliegenden Arbeit sind nicht im Sinne einer Minimal Residual Disease zu interpretieren, sondern können nur in Orientierung an die Ergebnisse der Studien zur MRD ausgewertet werden.

Zum Zeitpunkt der Diagnose sind  $10^{12}$  Zellen im Knochenmark zu finden. Aber selbst bei einer kompletten Remission können noch bis zu  $10^{10}$  Zellen persistieren. Diese können kaum durch die Zytomorphologie erfasst werden, lassen sich aber mit Hilfe der Durchflusszytometrie im Rahmen der MRD nachweisen.

Die von uns erhobenen Daten sind hingegen Prozentangaben in Bezug auf alle Zellen, die im Lymphozytenfenster vom Durchflusszytometer ermittelt wurden und geben daher keine absoluten Zahlen für die persistierenden Leukämiezellen im Knochenmark an. In Abhängigkeit von der Gesamtzellzahl im Lymphozyten- und Blastenfenster können auf diese Weise auch sehr geringe Mengen an Blasten, welche die myeloischen und lymphoiden Oberflächenantigene exprimieren, erfasst werden. Da aber nicht über den ganzen Beobachtungszeitraum hinweg der Umfang des Lymphozytenfensters bestimmt wurde, sind genauere Angaben zu den persistierenden Zellzahlen und damit zur Minimal Residual Disease in dieser Arbeit nicht möglich.

Dennoch zeigten sich Ergebnisse, die entsprechend den Studien zur MRD bestimmte Rückschlüsse ermöglichen.

Bei etwa 80% der Patienten weisen die Blasten einen leukämieassoziierten Immunphänotyp (LAIP) auf (Vidriales et al. 2003, Voskova et al. 2003, Gal'tseva et al. 2003, Bahia et al. 2001, San Miguel et al. 1999). Häufig ist dabei ein Auftreten



aberranter Oberflächenantigene (Kern et al. 2003, Vidriales et al. 2003, Gal'tseva et al. 2003, Reinhardt et al. 2002, San Miguel et al. 2002 und 1999, Plata et al. 2000) zu beobachten. Auf Grund ihres speziellen Immunphänotyps unterscheiden sich die leukämischen Blasten von den normalen Zellen des Knochenmarks und ermöglichen somit den Nachweis persistierender leukämischer Zellen unter 1000 - 10 000 normalen Zellen im Knochenmark (Campana et al. 2004, Vidriales et al. 2003, Reinhardt et al. 2002, San Miguel et al. 1997). Allerdings wurde in verschiedenen Studien ein Wechsel in der Antigenexpression beim Rezidiv (Voskova et al. 2004, Baer et al. 2001, Hur et al. 2001, Tomova et al. 2001, San Miguel et al. 1999) festgestellt, der zu falsch negativen Ergebnissen führen kann. Daher ist der Einsatz eines breiten Spektrums von Oberflächenantigenen für den Nachweis einer MRD notwendig. Mehrere Studien haben auf Grund einer erhöhten Rezidivrate (Feller et al. 2004, Xu et al. 2004, Venditti et al. 2002 und 2000, Plata et al. 2000, San Miguel et al. 1997) oder einer kürzeren rezidivfreien Überlebenszeit (Venditti et al. 2002 und 2000, San Miguel et al. 1997) eine schlechtere Prognose für die Minimal Residual Disease nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei vielen Patienten eine lymphatische und damit auch aberrante Antigenexpression. Von besonderer Bedeutung war dabei das CD 19. Eine spezielle Assoziation mit einem der myeloischen Marker CD 13, CD 33 und CD 34 konnte nicht eindeutig belegt werden. Tendenziell zeigte sich aber bei einer engen Korrelation von CD 19 mit CD 13 und CD 33 sowie mit CD 33 und CD 34 eine schlechtere Prognose, während für CD 19 in Verbindung mit CD 34 eher ein klinisch komplikationsloser Verlauf nachweisbar war. Eine besondere Bedeutung kam dem gemeinsamen Anstieg der myeloischen Antigene mit dem lymphatischen Oberflächenantigen CD 19 zu, da dieser sehr häufig mit einem Rezidiv verbunden war. Außerdem waren Wechsel in der Antigenexpression, insbesondere in Bezug auf die lymphoiden Oberflächenantigene, zu beobachten gewesen.

Der Nachweis persistierender Leukämiezellen soll der Früherkennung von Rezidiven dienen. Die dargestellten Verläufe der Oberflächenantigene weisen ähnliche Merkmale wie die MRD auf, zumal sie auch sehr geringe Blastenzahlen mit entsprechender Antigenexpression erfassen können. Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, anhand der Verläufe der myeloischen Oberflächenantigene in Verbindung mit der Expression aberranter Antigene ebenfalls Rezidive frühzeitig diagnostizieren oder vorhersagen zu können.

## 6.12 Schlussfolgerungen und Ausblick

Bei genauerer Betrachtung der Rezidivhäufigkeit, des therapeutischen Vorgehens sowie bei der Untersuchung der Todesursachen zeigte sich, dass die Verlaufsuntersuchungen zu den Oberflächenantigenen CD 13, CD 33 und CD 34 ziemlich genau die Entwicklung der Akuten Myeloischen Leukämie beschreiben können und damit auch klinische Bedeutung für die frühzeitige Rezidivdiagnostik haben.

Dementsprechend wiesen Patienten mit instabilem Verlauf im Vergleich zu Patienten mit stabilem Verlauf der Oberflächenantigene eine wesentlich schlechtere Prognose auf, die sich in einer höheren Rezidivrate und den damit verbundenen häufigeren Therapiewechseln sowie auch in einer höheren Letalitätsrate widerspiegelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Rezidive recht exakt durch die Oberflächenantigene erfasst werden können. Vor allem CD 34 und Markerkombinationen mit CD 13 sind als Leitwert für die Verlaufskontrolle und der Erfassung von Rezidiven beim instabilen Verlauf von entscheidender Bedeutung.

Steigen die Oberflächenantigene über den Schwellenwert von 30% und zeigen zugleich einen Anstieg von mindestens 30% innerhalb von drei Monaten, kann mit relativ großer Wahrscheinlichkeit ein Rezidiv folgen.

Bei der Untersuchung des Verhaltens der Kurvenverläufe zueinander zeigte sich, dass ein gemeinsamer Verlauf aller drei Oberflächenantigene meistens bei Patienten mit stabilem Verlauf zu finden ist und damit auf eine bessere Prognose hindeutet. Beim instabilen Verlauf kann hingegen sehr häufig eine Trennung der drei Oberflächenantigene beobachtet werden, die mit einer erhöhten Rezidivrate verbunden ist.

Ähnliche Ergebnisse wurden für den Verlauf der aberranten Oberflächenantigene CD 10 und CD 19 ermittelt. Bei der Trennung von CD 19 über CD 10 zeigte sich ein häufigeres Auftreten von Rezidiven, während ein gemeinsamer Verlauf von CD 10 und CD 19 mit einer besseren Prognose assoziiert war. Die Einteilung in einen stabilen und instabilen Verlauf dieser beiden Oberflächenantigene war hingegen nicht eindeutig aussagekräftig für den Verlauf der Erkrankung. Dennoch lässt sich beim instabilen Verlauf aufgrund der höheren Letalitätsrate auf eine schlechtere Prognose schließen.

Ein zentraler Punkt der Arbeit war die Frage, ob mit Hilfe einer Verlaufskontrolle der Oberflächenantigene eine Früherkennung von Rezidiven möglich sei. Bei mehr als der Hälfte aller Patienten mit instabilem Verlauf zeigten die Oberflächenantigene Veränderungen im Krankheitsverlauf noch vor den erkennbaren Veränderungen der Zytomorphologie an, die gegenwärtig als Goldstandard in der Diagnostik der AML gelten. Damit ist also eine Rezidivfrüherkennung anhand des Verlaufes der Oberflächenantigene möglich.

Da in der vorliegenden Arbeit nur eine kleine Patientenpopulation untersucht wurde, müssten noch weitergehende Studien an größeren Patientenkollektiven durchgeführt werden.

Von besonderer klinischer Bedeutung sind die Ergebnisse, weil in letzter Zeit Studien veröffentlicht wurden, die belegen, dass bei der Immunphänotypisierung von Blasten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben, die aus dem Knochenmark oder aus dem peripheren Blut mit einem Blastengehalt von >30% gewonnen wurden, bestehen (Weinkauff et al. 1999, Rezaei et al. 2003). Dies würde bedeuten, dass eine Verlaufseinschätzung und auch eine Rezidivfrüherkennung mittels Oberflächenantigenen durch Entnahme von peripherem Blut möglich sein könnte. Damit wäre eine wesentlich genauere Überwachung der Erkrankung denkbar, da die Blutentnahmen im Gegensatz zu den zeitaufwändigen und für die Patienten sehr belastenden Knochenmarkpunktionen routinemäßig abgenommen werden können. Allerdings muss die Durchführbarkeit einer Verlaufskontrolle der AML durch die Oberflächenantigene im peripheren Blut erst noch in größeren Studien geprüft werden.

## 7. Literaturverzeichnis

**Auerbach** AD; Allen RG. 1991 Jan. Leukemia and preleukemia in Fanconi anemia patients. A review of the literature and report of the International Fanconi Anemia Registry. *Cancer Genet Cytogenet*, 51(1):1-12.

**Aul** C, Giagounidis A, Germing U, Ganser A. 2002. Myelodysplastische Syndrome- Aktueller Stand der Diagnostik und Therapie. *Medizinische Klinik*, 97(11): 666-676.

**Baer** MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sulé N, Mrózek K, Schiffer CA, Powell BL, Kolitz JE, Moore JO, Stone RM, Davey FR, Carroll AJ, Larson RA, Bloomfield CD. 2001 June. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection. *Blood*, 97(11): 3574-3580.

**Bahia** DM, Yamamoto M, Chauffaile Mde L, Kimura EY, Bordin JO, Filgueiras MA, Kerbauy J. 2001 August. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and its clinical significance. *Haematologica*, 86(8): 801-6.

**Ball** ED, Davis RB, Griffin JD, Mayer RJ, Davey FR, Arthur DC, Wurster-Hill D, Noll W, Elghetany MT, Allen SL. 1991 May. Prognostic value of lymphocyte surface markers in acute myeloid leukemia. *Blood*, 77(10): 2242-50.

**Bene** MC, Bernier M, Castoldi G, Faure GC, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Ofao A. 1999. Impact of Immunophenotyping on management of acute leukemias. *Haematologica*, 84: 1024-1034.

**Bennett** JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C, French American British (FAB) Cooperative Group. 1976. Proposals for the classification of acute leukaemias. *Haematology*, 33: 451-458.

**Bennett** JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. 1985. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). *Annals Intern Med*, 103: 460-462.

**Bennett** JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C: 1985. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Annals Intern Med*, 103: 620-625.

**Bennett** JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. 1991. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML M0). *British Journal of Haematology*, 78: 325-329.

**Berman** E; Heller G; Santorsa J; McKenzie S; Gee T; Kempin S; Gulati S; Andreeff M; Kolitz J; Gabilove J; et al. 1991 Apr. Results of a randomized trial comparing idarubicin and cytosine arabinoside with daunorubicin and cytosine arabinoside in adult patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia. *Blood*, 77(8):1666-74.

**Bradstock** K, Matthews J, Benson E, Page F, Bishop J. 1994 Aug. Prognostic value of immunophenotyping in acute myeloid leukemia. Australian Leukaemia Study Group. *Blood*, 84(4): 1220-122.

**Brincker** H. 1985. Estimate of overall treatment results in acute nonlymphocytic leukaemia based on age-specific rates of incidence and complete remission. *Cancer Treat Rep* 69: 5-11.

**Büchner** T, Lechner K, Schwarzingler I. 1999. Akute myeloische Leukämie (AML). In: Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K. *Kompendium Internistische Onkologie*. Dritte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag.

**Chang** H, Salma F, Yi QL, Patterson B, Brien B, Minden MD. 2004 January. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*, 28(1): 43-48.

**Chen** CC; Yang CF; Yang MH; Lee KD; Kwang WK; You JY; Yu YB; Ho CH; Tzeng CH; Chau WK; Hsu HC; Gau JP. 2005 Aug. Pretreatment prognostic factors and treatment outcome in elderly patients with de novo acute myeloid leukemia. *Ann Oncol*, 16(8):1366-73.

**Cimino G**, Papa G, Tura S, Mazza P, Rossi Ferrini P, Bosi A, Amadori S, Lo Coco F, D'Arcangelo E, Giannarelli D. 1991. Second primary cancer following Hodgkin's disease: updated results of an Italian multicentric study. *J Clin Oncol* 9: 432-437.

**Creutzig U**, Harbott J, Sperling C, Ritter J, Zimmermann M, Löffler H, Riehm H, Schellong G, Ludwig WD. 1995 Oct. Clinical significance of surface antigen expression in children with acute myeloid leukemia: results of study AML-BFM-87. *Blood*, 86(8): 3097-3108.

**Curtis RE**, Boice JD, Moloney WC, Ries LG, Flannery JT. 1990 May. Leukemia following chemotherapy for breast cancer. *Cancer Res* 50(9): 2741-2746.

**Curtis RE**, Hoover RN, Kleinerman RA, Harvey EB. 1985 Dec. Second cancer following cancer of the female genital system in Connecticut 1935-82. *Natl Cancer Inst Monogr* 68: 113-137.

**Del Poeta G**, Stasi R, Venditti A, Suppo G, Aronica G, Bruno A, Masi M, Tabillo A, Papa G. 1994 Mar. Prognostic value of cell marker analysis in de novo acute myeloid leukaemia. *Leukemia*, 8(3): 388-94.

**Elghetany MT**. 1998 Dec. Surface marker abnormalities in myelodysplastic syndrome. *Haematologica*, 83(12): 1104- 1115.

**European Working Group on Clinical Cell Analysis (EWGCCA)**. 1996. Consensus Document on Leukemia Immunophenotyping. *Leukemia*, 10: 877-895.

**Feller N**, van der Pol MA, van Stijn A, Weijers GW, Westra AH, Evertse BW, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. 2004 Aug. MRD parameters using immunophenotypic detection methods are highly reliable in predicting survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 18(8): 1380-1390.

**Fenaux P**; Chomienne C; Degos L. 2001 Mar. Treatment of acute promyelocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 14(1):153-74.

**Fonatsch** .C, Schwarzinger I, Mitterbauer G, Jäger U, Wiesner R, Mannhalter C, Lechner K. 2003. Akute myeloische Leukämien. In: Ganten D, Ruckpaul K. Molekulargenetische Grundlagen von hämatopoetischen Neoplasien. Erste Auflage. Heidelberg, Berlin: Springer Verlag.

**Gal'tseva** IV, Savchenko VG, Kulikov SM, Parovichnikova EN, Mite Maslova ER, Isaev VG. 2003. Detection of minimal residual disease in patients with acute myeloid leukaemia (Abstract). Ter Arkh. 75(7): 8-14.

**Ganser** A; Heil G. 1997 May. Use of hematopoietic growth factors in the treatment of acute myelogenous leukemia. Curr Opin Hematol. 4(3):191-5.

**Geller** RB, Zahurak M, Hurwitz CA, Burke PJ; Karp JE, Piantadosi S, Civin CI. 1990 Nov. Prognostic importance of immunophenotyping in adults with acute myelocytic leukaemia: the significance of stem-cell glycoprotein CD 34 (My 10). Br J Haematol. 76(3): 340-7.

**Griffin** JD, Davis R, Nelson DA, Davey FR, Mayer RJ, Schiffer C, McIntyre OR, Bloomfield CD. 1986 Dec. Use of surface marker analysis to predict outcome of adult myeloblastic leukemia. Blood. 68(6): 1232-1241.

**Grigg** AP; Reynolds J; McQuillan A; Juneja SK; Di Iulio J; Hui C; Smith C; Kimber R; Bradstock KF. 2005 Mar. Prognostic features for response and survival in elderly patients with de novo acute myeloid leukemia treated with mitoxantrone and intermediate dose cytarabine. Leuk Lymphoma. 46(3):367-75.

**Grimwade**; Walker H; Oliver F; Wheatley K; Harrison C; Harrison G; Rees J; Hann I; Stevens R; Burnett A; Goldstone A. 1998 Oct. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. Blood. 92(7):2322-33.

**Haase D**, Feuring-Buske M, Schäfer C, Schoch C, Troff C, Gahn B, Hiddemann W, Wörmann B. 1997. Cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations in AML and MDS characterized by the expression of CD38 and CD117. *Leukemia*. 11(5): 674-679.

**Haferlach T**, Schoch C, Löffler H, Gassmann W, Kern W, Schnittger S, Fonatsch C, Ludwig WD, Wuchter C, Schlegelberger B, Staib P, Reichle A, Kubica U, Eimermacher H, Balleisen L, Grüneisen A, Haase D, Aul C, Karow J, Lengfelder E, Wörmann B, Heinecke A, Sauerland MC, Büchner T, Hiddemann W. 2003. Morphologic dysplasia in de novo AML is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group Studies. *Journal of Clinical Oncology*. 21(2): 256-265.

**Haferlach T**, Schoch C, Schnittger S, Kern W. 2004. Aktuelle Diagnostik und Therapie der akuten myeloischen Leukämie. *Der Bayerische Internist*. 24(4): 204-213.

**Hasle H**; Clemmensen IH; Mikkelsen M. 2000 Jan. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet*. 355(9199):165-9.

**Hayes RB**; Yin SN; Dosemeci M; Li GL; Wacholder S; Travis LB; Li CY; Rothman N; Hoover RN; Linet MS. 1997 Jul. Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. Chinese Academy of Preventive Medicine-National Cancer Institute Benzene Study Group. *Natl Cancer Inst*. 89(14):1065-71.

**Hübl W**, Jilch R, Bayer PM. Möglichkeiten und Grenzen der durchflußzytometrischen Untersuchung hämatologischer Neoplasien.

**Hur M**, Chang YH, Lee DS, Park MH, Cho HI. 2001 June. Immunophenotypic and cytogenetic changes in acute leukemia at relapse. *Clin Lab Haematol*. 23(3): 173-179.

**Infante PF**, Rinsky RA, Wagoner JK, Young RJ. 1977 Jul. Leukaemia in benzene workers. *Lancet*. 2(8028): 76-78.



**Iwakiri R**, Otha M, Mikoshiba M, Tsutsumi H. 2002 Jan. Prognosis of elderly patients with acute myelogenous leukemia: analysis of 126 AML cases. *International Journal of Hematology*. 75(1): 45-50.

**Jackson GH**. 2004. Use of fludarabine in the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematol J*. 5 Suppl 1: S62-7.

**Junghanss C**, Waak M, Knopp A, Kleine HD, Kundt G, Leithauser M, Hilgendorf I, Wolff D, Caspar J, Freund M. 2005. Multivariant analysis of prognostic factors in acute myeloid leukaemia: relevance of cytogenetic abnormalities and CD 34 expression. *Neoplasia*. 52(5):402-10.

**Kaldor JM**, Day NE, Clarke EA, Van Leeuwen FE, Henry-Amar M, Fiorentino MV, Bell J, Pedersen D, Band P, Assouline D. 1990 Jan. Leukaemia following Hodgkin' disease. *N Engl J Med*. 322(1): 7-13.

**Kanda Y**, Hamaki T, Yamamoto R, Chizuka A, Suguro M, Matsuyama T, Takezako N, Kami M, Hirai H, Togawa A. 2000 June. The clinical significance of CD 34 expression in response to therapy of patients with acute myeloid leukemia: an overview of 2483 patients from 22 studies. *Cancer*. 88(11): 2529-2533.

**Kern W**, Behre G, Schilling v. C, Haferlach T, Adorf D, Jehn U, Waterhouse C, Brack N, Schnittger S, Petrides PE, Hiddemann W. 2003. *Manual Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome*. Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München.

**Kern W**, Danhauser-Riedl S, Ratei R, Schnittger S, Schoch C, Kolb HJ, Ludwig WD, Hiddemann W, Haferlach T. 2003 June. Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry for definition of leukemia-associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow. *Haematologica*. 88(6): 646-653.

**Kern W**, Haferlach T, Hiddemann W. 2004. Kapitel 75 – Akute myeloische Leukämie. In : Hiddemann W, Huber H, Bartram C. Die Onkologie- Teil 2. Erste Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer- Verlag

**Kern W**, Schnittger S. 2003 Sep. Monitoring of acute myeloid leukemia by flowcytometry. *Curr Oncol Rep.* 5(5): 405-412

**Kimby E**; Nygren P; Glimelius B. 2001. A systematic overview of chemotherapy effects in acute myeloid leukaemia. *Acta Oncol.* 40(2-3): 231-52.

**Kristensen JS**, Hokland P. 1991. Monoclonal antibodies in myeloid diseases: prognostic use in acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 15(8): 693-700.

**Lanza F**, Rigolin GM, Moretti S, Latorraca A, Castoldi G. 1994. Prognostic value of immunophenotypic characteristics of blasts in acute myeloid leukemia. *Leukemia and Lymphoma.* 13(1): 81-95.

**Lauria F**, Raspadori D, Ventura MA, Rondelli D, Testoni N, Tosi P, Michieli M, Damiani D, Motta MR, Tura S. 1995 Jul. The presence of lymphoid-associated antigens in adult acute myeloid leukemia is devoid of prognostic relevance. *Stem Cells.* 13(4): 428-34.

**Lee EJ**, Yang J, Leavitt RD, Testa JR, Civin CI, Forrest A, Schiffer CA. 1992 Nov. The significance of CD 34 and TdT determination in patients with untreated de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 6(11): 1203-1209.

**Legrand O**, Perrot JY, Baudard M, Cordier A, Lautier R, Simonin G, Zittoun R, Casadevall N, Marie JP. 2000 Aug. The immunophenotype of 177 patients with acute myeloid leukemia: proposal of a prognostic score. *Blood.* 96(3): 870-877.

**Liu Yin JA**; Johnson PR; Davies JM; Flanagan NG; Gorst DW; Lewis MJ. 1991 Nov. Mitozantrone and cytosine arabinoside as first- line therapy in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Br J Haematol.* 79(3):415-20.

**Lübbert M.** 2002. Kapitel 6.1.2 - Akute Myeloische Leukämie (AML). In: Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R. Das Rote Buch- Hämatologie und internistische Onkologie. Zweite Auflage. Landsberg/Lech: ecomed- Verlag.

**Lübbert M,** Lindemann A. 2002. Kapitel 6.2 - Myelodysplastische Syndrome. In: Berger DP, Engelhardt R, Mertelsmann R. Das Rote Buch- Hämatologie und internistische Onkologie. Zweite Auflage. Landsberg/Lech: ecomed- Verlag.

**MacCallum PK;** Rohatiner AZ; Davis CL; Whelan JS; Oza AM; Lim J; Love S; Amess JA; Leahy M; Gupta RK; et al. 1995 Jul. Mitoxantrone and cytosine arabinoside as treatment for acute myeloblastic leukemia in older patients. *Ann Hematol.* 71(1):35-9.

**Macey MG.** 1994. Immunophenotypic Analysis of Lymphocytes and Leukemias. In: Macey MG Flow cytometry. First Edition. Oxford, London, Edinburgh, Massachusettes, Carlton Victoria: Blackwell Scientific Publications.

**Marosi C;** Koller U; Koller-Weber E; Schwarzinger I; Schneider B; Jager U; Vahls P; Nowotny H; Pirc-Danoewinata H; Steger G. 1992 Jul. Prognostic impact of karyotype and immunologic phenotype in 125 adult patients with de novo AML. *Cancer Genet Cytogenet.* 61(1):14-25.

**Martinez A,** San Miguel JF, Vidriales MB, Ciudad J, Caballero MD, Berges MC, Moro MJ, Calmuntia MJ, Ortega F, Orfao A. 1999 Apr. An abnormal CD 34+ myeloid/ CD 34+ lymphoid ratio at the end of chemotherapy predicts relapse in patients with acute myeloid leukemia. *Cytometry.* 38(2): 70-75.

**Mason KD;** Juneja SK; Szer J. 2005 Sep. The immunophenotype of acute myeloid leukemia: is there a relationship with prognosis? *Blood Rev:* S0268-960X.

**Maynadie M,** Gerland L, Aho S, Girodon F, Bernier M, Brunet C, Campos L, Daliphard S, Deneys V, Falkenrodt A, Jacob MC, Kuhlein E, Le Calvez G, Moskovtchenko P, Philip P, Carli PM, Faure GC, Bene MC. 2002 Aug. Clinical value of the quantitative expression of the three epitopes of CD 34 in 300 cases of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 87(7): 795-803.

**Myint** H, Lucie NP. 1992 Aug. The prognostic significance of the CD 34 antigen in acute myeloid leukemia. *Leucemia and Lymphoma*. 7(5-6): 425-429.

**Nebe** T. 2000. Grundlagen der Durchflußzytometrie (Flowzytometrie). In: Thomas L. Labor und Diagnose. Erweiterte fünfte Auflage. Frankfurt: Th- Books Verlagsgesellschaft mbH.

**Nully** Brown P, Jurlander J, Pedersen- Bjergaard J, Victor MA, Geisler CH. 1997 Octobre. The prognostic significancs of chromosomal analysis and immunophenotyping in 117 patients with de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 21(10): 985-995.

**Perea** G; Domingo A; Villamor N; Palacios C; Junca J; Torres P; Llorente A; Fernandez C; Tormo M; Queipo de Llano MP; Bargay J; Gallart M; Florensa L; Vivancos P; Marti JM; Font L; Berlanga J; Esteve J; Bueno J; Ribera JM; Brunet S; Sierra J; Nomdedeu JF. 2005 Oct. Adverse prognostic impact of CD36 and CD2 expression in adult de novo acute myeloid leukemia patients. *Leuk Res*. 29(10):1109-16.

**Pituch-Noworolska** A. 2001. Biological properties and sensitivity to induction therapy of differentiated cells expressing atypical immunophenotype in acute leukemia of children. *Folia Med Cracov*. 42(3): 5-80.

**Plata** E, Chormi-Ppadopoulou H, Viglis V, Yataganas X. 2000 Oct. Flow-cytometric detection of minimal residual disease with atypical antigen combinations in patients with de novo acute myeloid leukemia, *Ann Hematol*. 79(10): 534-546.

**Raspadori** D, Lauria F, Ventura MA, Rondelli D, Visani G, de Vivo A, Tura S. 1997 July. Incidence and prognostic relevance of CD 34 expression in acute myeloblastic leukemia: analysis of 141 cases. *Leukemia Research*. 21(7): 603-607.

**Reinhardt** D, Langebrake C, Creutzig U, Vormoor J, Brune C, Thorwesten M, Ingiliz P, Hrusak O, Dworzak M, Griesinger F. 2002. Minimale Resterkrankung bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) im Kindesalter- Etablierung und Standardisierung der Immunphänotypisierung in der Therapiestudie AML-BFM-98. *Klinische Pädiatrie*. 214(4): 179-187.

**Renz-Polster** H, Braun J. 2001. Kapitel 3- Blut und blutbildende Organe. In: Renz-Polster H, Braun J. *Basislehrbuch Innere Medizin*. Zweite Auflage. München, Jena: Urban-Fischer Verlag.

**Repp** R, Schaekel U, Helm G, Thiede C, Soucek s and the AML-SHG Study Group. 2003 May. Immunophenotyping is an independent factor for risk stratifikation in AML. *Cytometry Part B*. 53B: 11-19.

**Rezaei** A, Adib M, Mokarin F, Tebianian M, Nassiri R. 2003 Aug. Leukemia markers expression of peripheral blood vs bone marrow blats using flow cytometry. *Medical Science Monitor*. 9(8): CR 359-362.

**Rigolin** GM, Lanza F, Castoldi G.1995. Photomultiplier voltage setting: possible important source of varability in molecular equivalents of soluble fluorochrome (MESF) calculation. *Cytometry*. 20: 362-368.

**Rinsky** RA; Smith AB; Hornung R; Filloon TG; Young RJ; Okun AH; Landrigan PJ. 1987 Apr. Benzene and leukemia. An epidemiologic risk assessment. *N Engl J Med*. 1987. 316(17):1044-50.

**Samuels** BL; Larson RA; Le Beau MM; Daly KM; Bitter MA; Vardiman JW; Barker CM; Rowley JD; Golomb HM. 1988 Feb. Specific chromosomal abnormalities in acute nonlymphocytic leukemia correlate with drug susceptibility in vivo. *Leukemia*. 2(2):79-83.

**San Miguel** JF, Ciudad J, Vidriales MB, Orfao A, Lueio P, Porwit-MacDonald A, Gaipa G, Welin van E, Dongen van JJM. 1999. Immunophenotypical detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Critical Review in Oncology/Hematology*. 32: 175-185.

**San Miguel** JF, Martinez A, Macedo A, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Gonzales M, Caballero D, Garcia-Marcos MA, Ramos F, Fernandez-Calvo J, Calmuntia MJ, Diaz-Mediavilla J, Orfao A. 1997 Sep. Immunphenotyping investigation of minimal residual disease is a useful approach for predicting relapse in acute myeloid leukemia patients. *Blood*. 90(6): 2465-70.

**San Miguel** JF, Vidriales MB, Orfao A. 2002 Mar. Immunological evaluation of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukaemia (AML). *Best Pract Res Clin Haematol*. 15(1): 105-18.

**Scheinberg** DA, Maslak P, Weiss M. 1997. Acute Leukemias. In: De Vita V, Hellman S, Rosenberg S. *Cancer-Principles and Practise of Oncology*. 5<sup>th</sup> Edition. Philadelphia, New York: Lippincolt-Raven-Publishers.

**Schiffer** CA; Lee EJ; Tomiyasu T; Wiernik PH; Testa JR. 1989 Jan. Prognostic impact of cytogenetic abnormalities in patients with de novo acute nonlymphocytic leukemia. *Blood*. 73(1):263-70.

**Schoch** C; Haferlach T; Haase D; Fonatsch C; Loffler H; Schlegelberger B; Staib P; Sauerland MC; Heinecke A; Buchner T; Hiddemann W. 2001 Jan. Patients with de novo acute myeloid leukemia and complex karyotype aberrations show a poor prognosis despite intensive treatment: a study of 90 patients. *Br J Haematol* 112(1):118-26.

**Schwarzinger** I, Valent P, Koller U, Marosi C, Schneider B, Haas O, Knapp W, Lechner K, Bettelheim P. 1990 March. Prognostic significance of surface marker expression on blasts with de novo acute myeloblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 8(3): 423-430.

**Scolnik** MP, Morilla R, de Bracco MM, Catovsky D, Matutes E. 2002. CD34 and CD117 are overexpressed in AML and may be valuable to detect minimal residual disease. *Leukemia Research*. 26(7): 615-619.

**Sekeres** MA, Stone R. 2002 Sep. Older adults with acute myeloid leukaemia. *Curr Oncol Rep*. 4(5): 403-9.

**Shao** Z, Chen G, Lin Z, Zhang Y, Hao Y, Chu Y, Zheng Y, Qian L, Yang T, Yang C, Feng B. 1998 Jan. Immunophenotype of myeloid cells in myelodysplastic syndromes and its clinical implications (Abstract). *Chin Med J*. 111(1): 28-31.

**Shi** J, Shao T, Liu H, Song L, Zhang Y, Zheng Y, Chen G, Chu Y, HE H, Zhao M, He G, Feng B, Hao Y, Yang T, Yang C. 2001 Jul. Study of the transformation from myelodysplastic syndrom into acute leukemias (Abstract). *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 22(7): 351-354.

**Solary** E, Cassanovas RO, Campos I, Bene MC, Faure G, Maingon P, Falkenrodt A, Lenormand B, Genetet N. 1992 May. Surface markers in adult acute myeloblastic leukemia: correlation of CD 19+, CD 34+ and Cd 14+/DR—phenotypes with shorter survival. *Groupe d'Etude Immunologique des Leucemies (GEIL)*. *Leukemia* 6(5): 393-399.

**Sperling** C, Büchner T, Creutzig U, Ritter J, Harbott J, Fonatsch C, Sauerland C, Mielcarck M, Maschmeyer G, Löffler H,. 1995 May. Clinical, morphologic, cytogenetic and prognostic implications of CD 34 expression in childhood and adult de novo AML. *Leukemia and Lymphoma* 17(5-6): 417-426.

**Stasi** R, Venditti A, Del Poeta G, Aronica G, Dentamaro T, Cecconi M, Stipa E, Scimo MT, Masi M, Amadori S. 1996 Jun. Intensive treatment of patients age 60 years and older with de novo acute myeloid leukemia: analysis of prognostic factors. *Cancer*. 77(12): 2476-88.

**Terstappen** LWMM. 1994. Cell Differentiation and Maturation in Normal Bone Marrow and Acute Leukemia. In: Macey MG Flow cytometry. First Edition. Oxford, London, Edinburgh, Massachusetta, Carlton Victoria: Blackwell Scientific Publications.

**Thomas** X, Campos L, Archimbaud E, Shi ZH, Treille-Ritouet D, Anglaret B, Fiere D. 1992 May. Surface marker expression in acute myeloid leukemia at first relapse. British Journal of Medicine. 81(1): 40-44.

**Tien** HF, Wang CH, Chen YC, Shen MC; Lin DT, Lin KH. 1993 May. Characterization of acute myeloid leukaemia (AML) coexpressing lymphoid markers: different biologic features between T-cell antigen positive and B-cell antigen positive AML. Leukemia. 7(5): 688-95.

**Tomova** A; Babusikova O. 2001. Shifts in expression of immunological cell markers in relapsed acute leukemia. Neoplasma. 48(3):164-8.

**Travis** LB, Curtis RE, Boice JD, Hankey BF, Fraumeni JF. 1991 Apr. Second cancers following non-Hodgkin's lymphoma. Cancer. 67(7): 2002-9.

**Urbano-Ispizua** A, Matutes E, Villamor N, Sierra J, Pujades A, Reverter JC, Feliu E, Cervantes F, Vives-Corrons JL, Montserrat E. 1992 Jun. The value of detecting surface and cytoplasmic antigens in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 81(2): 178-83.

**Valet** G, Repp R, Ehninger A, Gramatzki M, SHG-AML Study Group. 2003 May. Pretherapeutic identification of high-risk acute myeloid leukemia (AML) patients from immunophenotypic, cytogenetic and clinical parameters. Cytometry Part B: Clinical Cytometry. 53B(1): 4-10.

**Venditti** A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Tamburini A, Cox C, Battaglia A, Catalano G, Del Moro B, Cudillo L, Posterino M, Masi M, Amadori S. 2000 Dec. Level of minimal residual disease after consolidation therapy predicts outcome in acute myeloid leukaemia. Blood 2000. 96(12): 3948-52.



**Venditti** A, Tamurini A, Buccisano F, Del Poeta G, Maurillo L, Panetta P, Scornajenghi KA, Cox C, Amadori S. 2002 Apr. Clinical relevance of minimal residual disease detection in adult acute myeloid leukaemia. *J Hematother Stem Cell Res.* 11(2): 349-57.

**Vidriales** MB, San-Miguel JF, Orfao A, Coustan-Smith R, Campana D. 2003 Dec. Minimal residual disease monitoring by flow cytometry. *Best Pract Res Clin Haematol.* 16(4): 599- 612.

**Vogler** WR; Velez-Garcia E; Weiner RS; Flaum MA; Bartolucci AA; Omura GA; Gerber MC; Banks PL. 1992 Jul. A phase III trial comparing idarubicin and daunorubicin in combination with cytarabine in acute myelogenous leukemia: a Southeastern Cancer Study Group Study. *J Clin Oncol.* 10(7): 1103-11.

**Voskova** D; Schoch C; Schnittger S; Hiddemann W; Haferlach T; Kern W. 2004 Nov. Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings. *Cytometry B Clin Cytom.* 62(1):25-38.

**Voskova** D; Valekova L; Fedorova J; Hudecek J; Kubisz P. 2003. Leukemic cells and aberrant phenotypes in acute leukemia patients: a flow cytometry analysis. *Neoplasma.* 50(6):422-7.

**Wahlin** A; Markevarn B; Golovleva I; Nilsson M. 2001 Oct. Prognostic significance of risk group stratification in elderly patients with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 115(1):25-33.

**Wedding** U, Bokemeyer C. 2003. Alte Patienten mit akuter myeloischer Leukämie - Charakteristika der Biologie, des Patienten und der Therapie. *Medizinische Klinik.* 98: 193-207.

**Weinkauff** R, Estey EH, Starostik P, Hayes K, Huh YO, Hirsch-Ginsl C, Andreef M, Keating M, Kantarjian HM, Freireich EJ, Albitar M. 1999 Jun. Use of peripheral blood blasts vs bone marrow blats for diagnosis of acute leukemia. *Am J Clin Pathol.* 111(6): 733-740.

**Weltermann** A, Fonatsch C, Haas OA, Geinix HT, Kahls P, Mitterbauer G, Jager U, Kainz B, Geissler K, Valent P, Sperr WR, Knobl P, Schwarzingler I, Gleiss A, Lechner K. 2004 Feb. Impact of cytogenetics on the prognosis of adults with de novo AML in first relapse. *Leukemia* 18(2): 293-302.

**Wilhelm** M, Wilms K. 2000. Neoplasien des hämatopoetischen und lymphatischen Systems – Akute Leukämien. In: Wilmanns W, Kuhn D, Wilms K. *Internistische Onkologie*. Zweite Auflage. Stuttgart: Thieme Verlag.

**Xu** B, Hu XD, Wu YH, Yi ZS, Yang Y, Meng FY, Feng R, Liu QF, Liu XL, Zheng WY. 2003 Oct. Immunophenotyping of 106 adult patients with acute leukemia by flow cytometry (Abstract). *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 23(10): 1043-1046.

**Xu** YL, Zhang XZ, Zhang L, Zhang XQ. 2004 Dec. Detection of residual leukemic cells after complete remission of patient with acute myeloid leukaemia (Abstract). *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 12(6): 858-60.

**Yunis** JJ; Brunning RD; Howe RB; Lobell M. 1984 sep. High-resolution chromosomes as an independent prognostic indicator in adult acute nonlymphocytic leukemia. *N Engl J Med.* 311(13):812-8.

**Zhu** H, Niu T, Meng W, Xu C, Lei S. 2002 Jan. Immunophenotype of acute leukemia and its clinical significance (Abstract). *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 33(1): 118-120.

## 8. Anhang

### Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Pachmann für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung bei Planung, Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei PD Dr. med. Fricke, PD Dr. med. Syrbe und Frau Theuer für die fachliche Beratung bedanken.

Außerdem danke ich Frau Basalla für die Hilfe bei der Erfassung der Patientendaten und Frau Franke für die Erlernung der Durchflusszytometrie.

Nicht zuletzt sei auch meiner Familie und meinem Freund gedankt für die moralische und praktische Unterstützung während meines Studiums, ohne welche die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau Prof. Dr. K. Pachmann,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 30. November 2005

Babette Linde

## Lebenslauf

Name: Babette Linde  
Adresse: Netzstrasse 39  
07749 Jena  
Telefon: 03641/ 444605  
Geburtstag: 28.07.1980  
Geburtsort: Jena  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

- 09/1987-07/1989 Polytechnische Oberschule „Werner- Seelenbinder“
- 09/1989-07/1999 Gymnasium „Adolf Reichwein“ mit sprachlicher Orientierung

### Studium:

- seit 10/1999 Humanmedizin an der Friedrich- Schiller- Universität Jena
- 08/2001 Ärztliche Vorprüfung
- 9/2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- seit 2002 Beginn der Promotionsarbeit in der Klinik für Innere Medizin 2 an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
- 04/ 2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- Seit 04/ 2005 Praktisches Jahr:
  - Neurologie im Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena,
  - Innere Medizin in der Thüringenklinik „Georgius Agricola“ in Saalfeld

Jena, im November 2005

Babette Linde