

Aus dem Institut für Klinische Chemie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Komm. Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. D. Seidel

**Frühzeitige Beurteilung  
der Wirksamkeit einer Chemotherapie  
bei Patienten mit Lymphomen und  
akuter myeloischer Leukämie  
durch zirkulierende Nukleosomen**

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**SUSANNE MÜLLER**

aus Markt Rettenbach

**2008**

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. D. Seidel

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.J. Kolb  
Prof. Dr. P. Eyer  
Prof. Dr. P. Sommerhoff

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Stefan Holdenrieder  
Dr. Petra Stieber

Dekan: Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 24.01.2008

## **Publikationen:**

**Mueller S, Holdenrieder S, Stieber P, Haferlach T, Schalhorn A, Braess J, Nagel D, Seidel D.**

Early prediction of therapy response in patients with acute myeloid leukaemia by circulating DNA fragments.

**BMC Cancer. 2006 May 30; 6: 143.**

**Holdenrieder S, Mueller S, Stieber P.**

Stability of nucleosomal DNA fragments in serum.

**Clin Chem. 2005; 51 (6): 1026-9.**

## **Beiträge auf internationalen Kongressen in Form von Abstracts:**

08/2005            Symposium on Circulating Nucleic Acids in Plasma und Serum, CNAPS,  
in London, Großbritannien (Poster)

09/2005            Meeting of the International Society for Onco developmental Biology and  
Medicine, ISOBM,  
in Rhodos, Griechenland (Poster)

11/2005            Hamburg Symposium on Tumor Markers, HSTM,  
in Hamburg (Vortrag)

# INHALTSVERZEICHNIS

Seite

<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2. Hintergrund</b>	<b>8</b>
2.1 Krankheitsbilder	8
2.1.1 Lymphome	8
2.1.1.1 Morbus Hodgkin	8
2.1.1.2 Non-Hodgkin-Lymphome	10
2.1.2 Akute myeloische Leukämie	17
2.2 Wirkmechanismen der Chemotherapie	23
2.3 Apoptose und Nukleosomen	27
<b>3. Patienten und Methoden</b>	<b>30</b>
3.1 Ein- und Ausschlusskriterien	30
3.2 Patienten	30
3.2.1 Lymphome	30
3.2.2 Akute myeloische Leukämie	31
3.3 Studienablauf	33
3.4 Therapie	35
3.4.1 Lymphome	35
3.4.2 Akute myeloische Leukämie	36
3.5 Staging und Beurteilung des Therapieansprechens	37
3.5.1 Lymphome	37
3.5.2 Akute myeloische Leukämie	38
3.6 Methoden	39
<b>4. Statistik</b>	<b>42</b>

<b>5. Ergebnisse</b>	<b>44</b>
5.1 Wertigkeit von Serummarkern bei Lymphomen	44
5.1.1 Nukleosomen	44
5.1.2 Leukozyten	49
5.1.3 Thrombozyten	52
5.1.4 Hämoglobin	54
5.1.5 LDH	57
5.1.6 Weitere Parameter	60
5.2 Wertigkeit von Serummarkern bei aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen	67
5.2.1 Nukleosomen	67
5.2.2 Weitere Parameter	70
5.3 Wertigkeit von Serummarkern bei akuter myeloischer Leukämie	75
5.3.1 Nukleosomen	75
5.3.2 Leukozyten	79
5.3.3 Thrombozyten	82
5.3.4 Hämoglobin	84
5.3.5 LDH	86
5.3.6 Thymidinkinase	88
5.3.7 Blasten	90
<b>6. Diskussion</b>	<b>95</b>
6.1 Aussagekraft der Marker bei Lymphomen	95
6.2 Aussagekraft der Marker bei akuter myeloischer Leukämie	103
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>
<b>9. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>120</b>
<b>10. Anhang</b>	<b>123</b>

# 1 Einleitung

Bei malignen Erkrankungen ist eine differenzierte Erst-Diagnose-Stellung von wesentlicher Bedeutung, um ein präzises Bild der Erkrankungsentität und des genauen Subtyps zu erhalten. Dieser ist in vielen Fällen von wesentlicher Bedeutung für die Abschätzung der Prognose und die Stratifizierung der Patienten für zur Verfügung stehende Therapieoptionen.

Bei den systemischen Krebserkrankungen wird vor Therapiebeginn meist die Prognose hinsichtlich des Überlebens des Patienten abgeschätzt und abhängig davon das Therapieverfahren eingeleitet. Es sind viele Prognosefaktoren beschrieben, wie zum Beispiel die Histologie, die Zytogenetik, das Alter, das Stadium, der Performancestatus sowie verschiedene Labor- und Tumormarker.

Zur Kontrolle der Therapieeffizienz erfolgen bereits prätherapeutisch, während des Therapieverlaufs und am Ende der Therapie Staging-Untersuchungen. Dazu sind je nach Tumorerkrankung aufwendige Bildgebung und invasive Untersuchungen, wie zum Beispiel Knochenmarkbiopsien bei Leukämien notwendig. Diese Staging-Untersuchungen erfolgen meist im Abstand von mehreren Wochen.

Nicht immer korreliert die initial gestellte Prognose mit dem tatsächlichen Therapieansprechen. Deshalb ist eine möglichst frühe und sichere Einschätzung der Therapiewirkung erstrebenswert, um bei mangelnder Effizienz rechtzeitig die Therapie umstellen zu können. Außerdem können dadurch Nebenwirkungen reduziert und eine Übertherapie verhindert werden, was das Risiko eines Zweitmalignoms durch Chemotherapie herabsetzt. Eine Möglichkeit das Therapieansprechen frühzeitig zu beurteilen, ist die engmaschige Kontrolle von Tumormarkern während Therapie.

Ein wesentlicher Mechanismus von zytostatischen Therapien ist die Induktion des Tumorzell-Tods. Ein Zelltodprodukt sind die Nukleosomen, die ins Blut freigesetzt werden und dort mittels immunologischer Methoden gemessen werden können.

Bei Patienten mit soliden Tumoren zeigte sich, dass die Nukleosomen im Serum für die frühzeitige Beurteilung des Therapieansprechens hilfreich sein können (Holdenrieder 2004a, Kremer 2005). Da systemische Tumorerkrankungen eine andere Pathophysiologie aufweisen, stellt sich nun die Frage, ob auch bei Lymphomen und der akuten myeloischen Leukämie (AML), der am häufigsten im Erwachsenenalter vorkommenden Leukämie, eine frühzeitige Beurteilung des Therapieansprechens in ähnlicher Weise möglich ist.

**Die vorliegende Studie untersuchte folgende Fragestellungen:**

1. Wie ist der Verlauf der Nucleosomenwerte und weiterer Marker (Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, Thymidinkinase, Laktatdehydrogenase, beta2-Mikroglobulin, CA125, CYFRA 21-1) bei Lymphom-Patienten während der Chemotherapie und bei AML-Patienten während der Induktionstherapie?
2. Ist eine frühzeitige Beurteilung des Therapieansprechens durch die Nucleosomen und die obengenannten weiteren Marker bei Lymphomen und AML möglich?
3. Gibt es eine Korrelation der Leukozyten und Blasten mit den Nucleosomen und kann dadurch erklärt werden, dass die Nucleosomen aus diesen Zellen freigesetzt werden?

## 2 Hintergrund

### 2.1 Krankheitsbilder

#### 2.1.1 Lymphome

Die Lymphome werden in zwei große Gruppen eingeteilt: Morbus Hodgkin und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL).

##### 2.1.1.1 Morbus Hodgkin

Morbus Hodgkin wird definiert als eine maligne lymphatische Systemerkrankung, die durch wenige Tumorzellen („Hodgkin“-Zellen und „Sternberg-Reed“-Riesenzellen) sowie Granulationsgewebe gekennzeichnet ist.

#### Epidemiologie

Nach Angaben des Krebsregisters im Saarland betrug die Inzidenz von 1998 – 2000 bei Männern 2,6 und bei Frauen 1,4/100.000 Einwohner/Jahr. Das National Cancer Institute beschrieb eine Gesamt-Inzidenzrate einschließlich aller Rassen von 2,8/100.000 Einwohner/Jahr. Die Mortalität wurde angegeben mit 0,6 bei Männern und 0,4/100.000 Einwohner/Jahr bei Frauen. Es werden zwei Häufigkeitsgipfel unterschieden: 20.-30. Lebensjahr und > 60. Lebensjahr. Das 5-Jahres-Überleben hängt vom Stadium ab. Im Stadium I und II erreichen > 90% und im Stadium III und IV 70-90% der Patienten eine komplette Remission. (Ries 2004)

#### Ätiologie

Bezüglich der Ätiologie gibt es verschiedene Theorien. Zum einen besteht ein Zusammenhang zwischen Morbus Hodgkin und Infektionskrankheiten, wie HIV, EBV und weiteren Herpesviren-Erkrankungen, zum anderen werden aufgrund der Beschreibung familiärer Häufung genetische Faktoren diskutiert. Dabei spielen HLA-Genotypen eine wichtige Rolle beim Auftreten des Morbus Hodgkin. (Cartwright 2004)

#### Klassifikation

Histologisch werden die Hodgkin-Lymphome nach Lukes und Butler (Rye 1965) in vier Subtypen eingeteilt. [Tabelle 1]

**Tabelle 1: Klassifikation der Hodgkin-Lymphome nach Lukes und Butler**

Subtyp	Häufigkeit
Lymphozytenreiche Form	5%
Noduläre Sklerose	50-60%
Gemischtzellige Form	30-40%
Lymphozytenarme Form	< 5%
Nicht klassifizierbar	bis zu 10%

Die klinische Stadieneinteilung erfolgt nach der Ann Arbor-Klassifikation von 1971. [Tabelle 2]

**Tabelle 2: Ann Arbor Klassifikation der Hodgkin-Lymphome**

Stadium	Definition	
I	Nodaler Befall einer einzelnen Lymphknotenregion (I N) oder Vorliegen eines einzelnen, lokalisierten nodalen Herdes (I E)	
II	Nodaler Befall (II N) und/oder lokalisierte extranodale Herde (II E) in zwei oder mehreren Regionen auf einer Seite des Zwerchfells	
III	Nodaler Befall (III N) und/oder lokalisierte extranodale Herde (III E) auf beiden Seiten des Zwerchfells	
	III1	Infradiaphragmaler Befall nur oberhalb des Truncus coeliacus (Milzhilus, zöliakale und/oder portale Lymphknoten)
	III2	Infradiaphragmaler Befall auch unterhalb des Truncus coeliacus (paraaortal, iliakale, mesenteriale und/oder inguinale Lymphknoten)
IV	Disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Lymphknotenbefall	
<b>A/B</b>	<b>Allgemeinsymptome</b>	
A	Keine Allgemeinsymptome	
B	Allgemeinsymptome: Fieber > 38°C, Nachtschweiß, Gewichtsverlust > 10% des Ausgangsgewichts innerhalb von 6 Monaten	

## Diagnostik

Zur Diagnostik zählen neben der klinischen Untersuchung, der Laboruntersuchung inklusive Differentialblutbild, Routinelabor und Virusserologie, dem Röntgenthorax und der Sonografie von Abdomen und Hals eine histologische Diagnosesicherung. Diese erfolgt durch eine Lymphknotenhistologie, Knochenmarkhistologie und evtl. Leberbiopsie. Weitere Bildgebung (CT Abdomen/Thorax/Hals, Skelettszintigrafie und evtl. PET-Untersuchung) erfolgt zur genauen Stadieneinteilung und zur späteren Verlaufskontrolle.

## Therapie

Das Therapieziel bei Morbus Hodgkin ist kurativ. Das Erkrankungsstadium und das Vorliegen von Risikofaktoren, wie B-Symptomatik, großer mediastinaler oder extranodaler Befall, bestimmen das Therapieschema. Im Frühstadium ohne Risikofaktoren führt bei bis zu 90% der Patienten eine alleinige Radiotherapie zum Erfolg. Ab dem Stadium IB/IIA wird abhängig vom Therapieprotokoll eine Chemotherapie oder eine Kombination aus Chemotherapie und Strahlentherapie durchgeführt. Diese Behandlungsstrategie wird auch angewandt bei Patienten im Frühstadium mit Risikofaktoren oder bei Rezidiven. Verwendet werden Chemotherapieprotokolle, die aus einer Kombination von vier bis acht verschiedenen Substanzen bestehen. Aktuelle Chemotherapieschemata sind: ABVD, BEACOPPbasis und BEACOPPeskaliert (siehe Anhang). Bei Patienten ohne Ansprechen auf die Chemotherapie oder bei Rezidivpatienten wird häufig eine Hochdosischemotherapie mit dem Dexa-BEAM-Schema mit anschließender Stammzellapherese durchgeführt. Das DHAP-Protokoll wird bei Spätrezidiven angewandt (siehe Anhang). In Deutschland ist eine Therapie der Hodgkin-Patienten im Rahmen von Studienprotokollen der Deutschen Hodgkin-Studiengruppe, DHSG, erwünscht, um verbesserte Therapiekonzepte zu erarbeiten. (Brandt 2001a)

### 2.1.1.2 Non-Hodgkin-Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome sind Neoplasien des lymphatischen Gewebes, ausgehend vom B-Zell-System (B-NHL) oder T-Zell-System (T-NHL). Sie werden unterschieden in aggressive und indolente Lymphome.

## Epidemiologie

Im Jahr kommt es laut dem Saarländischen Krebsregister in Deutschland bei Männern zu 18 und bei Frauen zu ungefähr 12 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner. Diese Inzidenzen sind bezogen auf die Jahre 1998-2000. Seit 1975 sind nach Angaben des National Cancer Institute die Inzidenzraten in den USA von 11,1 Fälle/100.000 Einwohner/Jahr auf 19,3 Fälle/100.000 Einwohner/Jahr gestiegen. Im Vergleich zu den Hodgkin-Lymphomen gibt es bei den NHL bezüglich der Altersstruktur keine Erkrankungsgipfel, sondern eine stark ansteigende Inzidenz ab einem Alter von 55 Jahren. (Ries 2004)

## Ätiologie

Bei der Pathogenese spielen verschiedene ätiologische Faktoren eine Rolle. Es besteht ein Zusammenhang des Non-Hodgkin-Lymphoms mit viralen und bakteriellen Infektionserkrankungen, z.B. EBV und Helicobacter pylori. Patienten mit angeborener oder erworbener Immundefizienz, z.B. AIDS, haben ein erhöhtes Risiko an NHL zu erkranken. Dies allein erklärt jedoch noch nicht die gestiegene Anzahl an Neuerkrankungen. Deshalb werden zahlreiche Umweltfaktoren als zusätzliche Einflussgrößen diskutiert: Ionisierende Strahlung, Pestizide, Chemikalien, Haarfärbemittel und Rauchen. (Weisenburger 1994)

## Klassifikation

Hinsichtlich der Klassifikation der Lymphome hat es über Jahrzehnte verschiedene und nicht vergleichbare Einteilungen gegeben. Im deutschsprachigen Europa wurde die Kiel-Klassifikation angewandt. Im Jahre 1994 erstellten die Internationale Lymphomstudien-Gruppe (ILSG) eine neue Klassifikation, die Revised-European-American-Lymphoma-(REAL)-Klassifikation. Die aktuelle Version der REAL-Klassifikation wurde von der WHO aktualisiert und als WHO-Klassifikation bezeichnet [Tabelle 3]. Zur genauen Einteilung werden morphologische, klinische, immunphänotypische und molekulargenetische Merkmale herangezogen. (Stein 2000, Uppenkamp 2002)

### **Tabelle 3: Neue WHO-Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome 2001**

#### B-Zell-Lymphome

---

##### B-Zell-Vorläufer-Neoplasien

B-Zell-Vorläufer lymphoblastisches Lymphom

---

##### Reife (periphere) B-Zell-Neoplasien

B-Zell chronische lymphatische Leukämie

Kleinzelliges lymphozytisches Lymphom

Lymphoplasmazytoides Lymphom

Mantelzell-Lymphom

Folikuläres Lymphom (Grad 1-3)

Follikelzentrums-Lymphom, diffus, kleinzellig

Extranodale Marginalzonenlymphome des MALT

Nodales Marginalzonen B-Zell Lymphom

Marginalzonen-Lymphom der Milz

Haarzell-Leukämie

Plasmozytom / Plasmazell-Myelom

Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom

Primäres mediastinales großzelliges B-Zell-Lymphom

Burkitt Lymphom; Hochmalignes B-Zell Lymphom, Burkitt-ähnlich

---

#### T-Zell-Lymphome

---

##### T-Zell-Vorläufer-Neoplasien

T-Zell-Vorläufer lymphoblastisches Lymphom

---

##### Reife (periphere) T-Zell-Neoplasien

T-Zell chronische lymphatische Leukämie, prolymphozytäre Leukämie

Leukämie großer granulärer Lymphozyten-T-Zellen

Aggressive NK-Zell Leukämie

Mycosis fungoides/ Sézary Syndrom

Peripheres T-Zell Lymphom, nicht spezifiziert (gemischt, mittelgroß- und großzellig)

Angioimmunoblastisches Lymphom

Angiozentrisches Lymphom

Adultes T-Zell Lymphom/Leukämie

Intestinales T-Zell Lymphom

Anaplastisches großzelliges Lymphom, T- und Null-Zell Typen

Neben der morphologischen Einteilung ist vor allem auch die klinische Einteilung der Patienten wichtig, um sich für das am besten geeignete Therapieschema zu entscheiden. [Tabelle 4]

**Tabelle 4: Vorgeschlagenes Schema für die klinische Eingruppierung der malignen Lymphome nach der R.E.A.L.-Klassifikation**

B-Zell-Ursprung	T-Zell-Ursprung
<b>I. Indolente Lymphome (low risk)</b>	
Chronische lymphozytische Leukämie/ lymphozytisches Lymphom Lymphoplasmazytisches Lymphom/ Immunozytom/M. Waldenström Haarzell-Leukämie Splenisches Marginalzonenlymphom Marginalzonenlymphom - Extranodales (MALT-B-Zell Lymphom) - Nodal (monozytoid) Follikelzentrums-Lymphom/follikulär, GradI Follikelzentrums-Lymphom/follikulär, GradII	Leukämie großer granulärer Lymphozyten, vom T- und NK- Zell Typ Mycosis fungoides/Sézary Syndrom „Smoldering“ und chronische adulte T-Zell Leukämie/Lymphom (HTLV+)
<b>II. Aggressive Lymphome (intermediate risk)</b>	
Prolymphozytenleukämie Plasmazytom/Multiples Myelom Mantelzell-Lymphom Follikelzentrums-Lymphom/follikulär, GradIII Diffuses großzelliges B-Zell Lymphom Primäres mediastinales (thymisches) großzelliges B-Lymphom Hochmalignes B-Zell Lymphom, Burkitt-ähnlich	Prolymphozytenleukämie Peripheres T-Zell Lymphom, nicht spezifiziert Angioimmunoblastisches Lymphom Angiozentrisches Lymphom Intestinales T-Zell Lymphom Anaplastisches großzelliges Lymphom (T- und Null Zell Typ)
<b>III. Sehr aggressive Lymphome (high risk)</b>	
Vorläufer B-lymphoblastisches Lymphom/Leukämie Burkitt-Lymphom/akute B-Zell Leukämie Plasmazell-Leukämie	Vorläufer T-lymphoblastisches Lymphom/Leukämie Adultes T-Zell Lymphom/Leukämie
<b>IV. Morbus Hodgkin</b>	

(Hiddemann 1996)

Die Stadieneinteilung erfolgt nach der Ann Arbor-Klassifikation. Diese bezieht sich zum einen auf die Lokalisation der befallenen Lymphknoten und/oder Organe und zum anderen auf die klinische Symptomatik. [Tabelle 5]

**Tabelle 5: Stadieneinteilung der Non-Hodgkin-Lymphome nach der Ann Arbor-Klassifikation (1971)**

<b>Stadium</b>	<b>Definition</b>			
I	Nodaler Befall einer einzelnen Lymphknotenregion (I ) oder Vorliegen eines einzelnen, lokalisierten extranodalen Herdes (I E)			
II	Nodaler Befall (II) und/oder lokalisierte extranodale Herde (II E) in $\geq$ zwei Regionen auf einer Seite des Zwerchfells			
	<table border="1"> <tr> <td>II1</td> <td>Befall von 2 benachbarten Lymphknotenregionen (II1) oder einer Lymphknotenregion mit lokalisiertem Übergang auf benachbartes Organ (II1E) oder Befall zweier benachbarter extralymphatischer Organe (II1E)</td> </tr> <tr> <td>II2</td> <td>Befall von 2 nicht benachbarten oder <math>&gt;2</math> benachbarten Lymphknotenregionen (II2) oder Befall eines extralymphatischen Organs mit Lymphknotenbeteiligung über die regionären Lymphknoten hinaus (II2E) oder Befall zweier nicht benachbarter extralymphatischer Organe (II2E)</td> </tr> </table>	II1	Befall von 2 benachbarten Lymphknotenregionen (II1) oder einer Lymphknotenregion mit lokalisiertem Übergang auf benachbartes Organ (II1E) oder Befall zweier benachbarter extralymphatischer Organe (II1E)	II2
II1	Befall von 2 benachbarten Lymphknotenregionen (II1) oder einer Lymphknotenregion mit lokalisiertem Übergang auf benachbartes Organ (II1E) oder Befall zweier benachbarter extralymphatischer Organe (II1E)			
II2	Befall von 2 nicht benachbarten oder $>2$ benachbarten Lymphknotenregionen (II2) oder Befall eines extralymphatischen Organs mit Lymphknotenbeteiligung über die regionären Lymphknoten hinaus (II2E) oder Befall zweier nicht benachbarter extralymphatischer Organe (II2E)			
III	Nodaler Befall (III) und/oder lokalisierte extranodale Herde (III E) auf beiden Seiten des Zwerchfells, ggf. mit Milzbefall (IIIS oder IIISE)			
IV	Diffuser oder disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Lymphknotenbefall			
<b>A/B</b>	Allgemeinsymptome			
A	Keine Allgemeinsymptome			
B	Allgemeinsymptome (Fieber $> 38^{\circ}\text{C}$ , Nachtschweiß, Gewichtsverlust $> 10\%$ des Ausgangswertes innerhalb von 6 Monaten)			

### Diagnostik

Eine ausführliche Diagnostik ist notwendig, um eine exakte Diagnose nach den Klassifikationen zu treffen und die Patienten dem richtigen Stadium zu zuweisen. Voraussetzung für die weiterführenden Untersuchungen ist die Anamnese einschließlich B-Symptomatik, die klinische Untersuchung mit Lymphknotenstatus, Palpation der Milz und eine Laboruntersuchung inklusive Blutbild, Differentialblutbild, LDH, BSG, Eiweißelektrophorese und Immunologie. Durch die immunzytologische Untersuchung, bei der Zelloberflächenantigene und intrazytoplasmatische Antigene mit spezifischen Antikörpern markiert werden, können die Zellen des hämatopoetischen Systems unterschiedlichen

Zelllinien (B- oder T-Zell-lymphatisch, myeloisch) und Differenzierungsstadien (unreif- oder reifzellig) zugeordnet werden. Zur Sicherung der Diagnose ist eine histologische Untersuchung des Lymphknotens, Knochenmarks oder des befallenen Organs notwendig. Die Ausbreitung der Lymphomerkrankungen wird mit Hilfe der Bildgebung, d.h. Röntgen, Sonografie, CT Hals/Thorax/Abdomen und weiterer Bildgebung festgestellt. (Weissinger 1997)

## Therapie

Nach abgeschlossener Diagnostik werden die Non-Hodgkin-Lymphome in die Gruppen indolente oder aggressive Lymphome eingeteilt. Dies ist Entscheidungskriterium für die folgende Therapie.

Die Intention der Behandlung bei indolenten Non-Hodgkin-Lymphomen hängt von der Stadieneinteilung ab. Sie ist in den Stadien I und II kurativ, wobei eine alleinige Radiotherapie durchgeführt wird (Weissinger 1997, Brandt 2001b, ESMO 2003). Der überwiegende Teil der Patienten mit indolenten Non-Hodgkin-Lymphomen befindet sich zum Zeitpunkt der Diagnose im Stadium III und IV. Diese Stadien können zur Zeit lediglich palliativ behandelt werden. Standard bei neu diagnostiziertem indolentem NHL ist die „wait and watch“-Methode, da eine Radio- oder Chemotherapie bei asymptomatischen Patienten keinen Überlebensvorteil mit sich bringt (Fisher 2003) und 15-20% der Patienten eine spontane Remission aufweisen (ESMO 2003). Eine Therapie ist indiziert bei Auftreten von B-Symptomatik, bei hämatopoetischer Insuffizienz, sehr großen Lymphomen oder rascher Progredienz der Erkrankung (Weissinger 1997). Geeignete Chemotherapeutika sind Alkylanzien, wie Chlorambucil oder Cyclophosphamid. Diese können als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Substanzen gegeben werden. Eine weitere Möglichkeit der Monotherapie ist der Einsatz von Purinanaloga, besonders von Fludarabin. Die nächste Stufe ist die Anwendung aggressiverer Kombinationsschemata, CHOP und FCM (siehe Anhang), die vor allem bei Rezidiven zum Einsatz kommen (Fisher 2003, Hennessy 2004). Seit wenigen Jahren wird mit monoklonalen Antikörpern, anti-CD20, Rituximab therapiert. Rituximab ist allein eine hochwirksame Substanz und wurde im Zusammenhang mit CHOP und FCM getestet (Hiddemann 2003). Dabei zeigten sich in den mit Rituximab kombinierten Schemata höhere Raten an kompletter Remission (Dreyling 2003, Zinzani 2004). Neue Ansätze sind eine Kombination aus Chemotherapie und Radioimmunotherapie, wie zum Beispiel mit anti-CD20 Radioimmunokonjugaten (Hagemeyer 2005).

Die Behandlungsintention bei aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen ist kurativ. Die lokalisierten Stadien I und II werden aus einer Kombination von Radio- und Chemotherapie

behandelt (Kimby 2001). Die Standardtherapie in den letzten 25 Jahren in den disseminierten Stadien III und IV war das CHOP-Schema. Allerdings nur ein Drittel dieser Patienten konnte mit dieser Therapie geheilt werden und besonders bei alten Menschen kam es häufig zu Unverträglichkeiten (Coiffier 2003). Da die Kombination aus Rituximab und CHOP bereits bei indolenten Non-Hodgkin-Lymphomen Erfolge gezeigt hat, wurden auch bei aggressiven Lymphomen Studien bezüglich dieser Therapieoption durchgeführt. Vor allem bei älteren Patienten kam es zu einer klinischen Verbesserung (Coiffier 2003, Schmits 2001). Weitere neue Studien behandeln die Erweiterung des CHOP-Schemas mit Etoposid (CHOEP) und eine Hochdosischemotherapie mit Stammzell-Transplantation (Schmits 2001).

Während und nach Therapie sind Staging-Untersuchungen obligat und die Nachsorgeuntersuchungen finden nach definierten Zeitintervallen statt, wie bereits beim Morbus Hodgkin beschrieben.

### Prognose und Risikoabschätzung

Aggressive NHL sprechen in der Regel besser auf eine Chemotherapie an als indolente Lymphome. Aber auch innerhalb dieser Gruppen gibt es Patienten mit unterschiedlicher Prognose, deshalb wurden für die aggressiven NHL ein „internationaler prognostischer Index“ entwickelt, der vor allem auf klinischen Charakteristika basiert. Nach folgenden Faktoren werden die Patienten einer Risikokategorie zugeordnet: Alter, Serum LDH, Performance-Status nach WHO, Stadium nach Ann-Arbour und extranodale Beteiligung. (Shipp 1993, Weissinger 1997, Bairey 2006) [Tabelle 6]

**Tabelle 6: Internationaler prognostischer Index für aggressive Non-Hodgkin-Lymphome**

Risikofaktor	Nein	Ja
Alter	≤ 60 Jahre	> 60 Jahre
Serum LDH	Normal	Erhöht
Performance-Status	0 oder 1	2, 3 oder 4
Stadium nach Ann-Arbour	I oder II	III oder IV
Extranodale Beteiligung	≤ 1 Manifestation	> 1 Manifestation
Risikokategorie	Anzahl der Risikofaktoren	
Niedriges Risiko	0 – 1	
Niedriges-Intermediäres Risiko	2	
Intermediäres-Hohes Risiko	3	
Hohes Risiko	4-5	

Einige Tumormarker, wie das  $\beta$ -2-Mikroglobulin, gelten als Prognosefaktoren bei Lymphom-Erkrankungen. Erhöhte Werte von  $\beta$ -2-Mikroglobulin gehen einher mit einem niedrigeren Therapieansprechen bzw. niedrigerem Gesamtüberleben (Litam 1991, Johnson 1993). Außerdem sind erhöhte Werte messbar bei Patienten im Stadium III oder IV nach Ann Arbour oder bei hepatischer Lymphominfiltration (Johnson 1993). Ein weiterer Tumormarker ist die Thymidinkinase, die ebenfalls prognostisch relevant ist und im Therapieverlauf bei Remission abfallende Werte aufweist, während sie bei Entwicklung eines Rezidivs ansteigen (Hallek 1988 und 1992, Poley 1997). Ein dritter Marker ist CA125, das häufig in fortgeschrittenen Stadien und vor allem bei abdominellem und mediastinalem Lymphombefall erhöht ist. Patienten mit kompletter Remission weisen am Ende der Therapie CA125-Werte im Referenzbereich auf, im Gegensatz zu den Patienten ohne komplette Remission, die teilweise sogar einen Anstieg von CA125 aufweisen (Lazzarino 1998, Dilek 2005).

### 2.1.2 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie ist eine systemisch maligne Erkrankung des Blutes. Durch Transformation einer frühen myeloischen Vorläuferzelle im Knochenmark kommt es zu keiner weiteren Differenzierung dieser Zellen. Diese undifferenzierten Zellen proliferieren ungehemmt, was zur Anhäufung dieses Klons führt. Die Folge ist eine Streuung unreifer pathologischer Zellen ins Blut und die Verdrängung normaler Blutzellen der weißen und anderer Blutreihen im Knochenmark. Die unterschiedlichen Typen der AML werden eingeteilt nach der Differenzierungsstufe myeloischer Progenitorzellen. (Stone 2004)

#### Epidemiologie

Die Inzidenz der AML betrug in den Jahren 1998-2002 3,8 Fälle/100.000 Einwohner/Jahr und war stark altersabhängig. Patienten unter 65 Jahren zeigten eine Inzidenzrate von 1,8 Fälle/100.000 Einwohner/Jahr im Gegensatz zu den Patienten über 65 Jahren mit 17,9 Fällen/100.000 Einwohner/Jahr. Die Inzidenzrate hat sich in den letzten 30 Jahren kaum verändert. Auch die 5-Jahres-Überlebensrate war deutlich altersabhängig. Sie betrug bei allen Patienten 19,5% in den Jahren 1995-2000, 32,7% bei den unter 65 Jährigen und 3,8% bei den über 65 Jahre alten Patienten. Diese statistischen Zahlenangaben stammen aus dem National Cancer Institute (Ries 2004).

#### Ätiologie

Ein Risikofaktor für die akute myeloische Leukämie (AML) ist die Knochenmarkschädigung durch Noxen, z.B. ionisierende Strahlung, alkylierende Substanzen, Benzol und Zigarettenrauch. Desweiteren sind gewisse hämatologische Erkrankung prädisponierend für die AML, wie die myelodysplastischen und myeloproliferativen Syndrome, die aplastische

Anämie und das multiple Myelom. Auch genetische Faktoren spielen eine Rolle. Bei Trisomie 21 und Fanconi-Anämie besteht ein erhöhtes Risiko an AML zu erkranken.

### Klassifikation

Die Einteilung der akuten myeloischen Leukämie erfolgt nach der französisch-amerikanisch-britischen (FAB-)Klassifikation nach der Morphologie in die Gruppen M<sub>0</sub> – M<sub>7</sub>. [Tabelle 7]

**Tabelle 7: FAB-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämien**

FAB-Typ	
M0	Minimale Markdifferenzierung, undifferenzierte Blasten ohne Granula nur durch Zytochemie unterscheidbar
M1	Deutliche Markdifferenzierung, vereinzelte diskrete Granulation im Plasma
M2	Mit morphologischer Ausreifung, > 10% der Blasten tragen feinste Granula
M3	Akute Promyelozytenleukämie
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M5	a) akute Monoblastenleukämie b) akute Monozytenleukämie
M6	Akute Erythroleukämie
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie

Neben der Morphologie geben auch die Chromosomenanalysen wichtige Informationen über die Prognose und die Therapiemöglichkeiten. Bei der aktuellen WHO-Klassifikation werden somit genetische, morphologische und anamnestische Befunde berücksichtigt. [Tabelle 8]

**Tabelle 8: WHO-Klassifikation der AML**

#### AML mit spezifischen zytogenetischen Translokationen

- Mit t(8;21) (q22;q22), AML1/ETO
- Akute Promyelozytenleukämie (AML M3 mit t(15;17) (q22;q11-12) und Varianten, PML/RAR-alpha
- Mit abnormen KM-Eosinophilen und (inv16) (p13;q22) oder t(16;16) (p13;q22); CBFβ/MYH 11
- Mit 11q23 (MLL)-Anomalien

#### AML mit multilineärer Dysplasie (2-3 Linien betroffen)

- Mit vorausgegangener Myelodysplasie/Myeloproliferativem Syndrom
- Ohne vorausgegangenes Myelodysplastisches Syndrom

#### Therapieinduzierte AML und MDS

- Nach Alkylanzien
- Nach Etoposid/Phylloxytoxin
- Andere Auslöser

---

## AML ohne andere Einordnungsmöglichkeit

- AML minimal differenziert
  - AML ohne Ausreifung
  - AML mit Ausreifung
  - Akute myelomonozytäre Leukämie
  - Akute monozytäre Leukämie
  - Akute Erythroleukämie
  - Akute Megakaryoblastenleukämie
  - Akute Basophilenleukämie
  - Akute Panmyelose mit Myelofibrose
  - Myelosarkom/Chlorom
  - Akute biphänotypische Leukämie
- 

## Diagnostik

Die erste diagnostische Maßnahme bei Verdacht auf eine akute Leukämie ist die Analyse des Blutbildes. Das Hämoglobin ist aufgrund der Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark erniedrigt bei erniedrigter Retikulozytenzahl. Die Zahl der Leukozyten ist meistens erhöht durch das Auftreten atypischer Rundzellen, kann aber auch normal oder erniedrigt sein. Die Thrombozyten sind erniedrigt. Bei auffälligem Blutbild kann mit Hilfe eines Blutaustrieches die Morphologie leukämischer Zellen bestimmt werden und mit anschließender zytochemischer Untersuchung die Feindifferenzierung vorgenommen werden. Dazu wird die Peroxidase-Reaktion als Charakteristikum der myeloischen Reihe angewendet und die Esterase-Reaktion, die bei der Monozytenreihe bei M4-Leukämien positiv ist. Zur weiteren Charakterisierung der Leukämiezellen wird die Immunphänotypisierung herangezogen, wobei Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie oder Immunfluoreszenz bestimmt werden.

Ein weiterer diagnostischer Schritt ist die Knochenmarkbiopsie. Im Ausstrich eines Knochenmarkbröckels wird die Zelldichte beurteilt, die vor allem bei stark regenerativen Prozessen, wie Leukämien, erhöht ist. Bei der Knochenmarkzytologie wird zum einen das Verhältnis der roten zur weißen Zellreihe bestimmt und zum anderen die Verteilung und Zellqualität innerhalb der Erythropoese und Granulopoese. Eine Linksverschiebung der Granulopoese kann bei beginnenden Leukämien auftreten. Eine weitere Beurteilung des Knochenmarks kann wie im Blut durch Zytochemie erfolgen. Besonders wichtig für die Einteilung und Prognose der AML ist die zytogenetische Untersuchung mit der Suche nach Chromosomenaberrationen.

## Klinik

Die entarteten und ungehemmt proliferierenden weißen Vorläuferzellen infiltrieren das Knochenmark und verdrängen die Zellen der normalen Hämatopoese. Daraus resultieren die klinischen Symptome der Leukämie mit Müdigkeit und Schwäche durch die Anämie, Schleimhautblutungen und Blutergüsse durch die Thrombozytopenie und opportunistische und andere Infektionen durch den Mangel an funktionstüchtigen Granulozyten. Knochenschmerzen können durch die Knochenmarkinfiltration hervorgerufen werden. Auch extramedullärer Befall ist möglich durch leukämische Infiltrate der Haut oder im ZNS.

## Therapie

Die Therapie ist zweigegliedert und besteht aus einer Induktions- und einer Postremissionstherapie. Ziel der Induktion ist das Erreichen einer kompletten Remission durch die Zerstörung aller hämatopoetischer Zellen im Knochenmark mit anschließender Repopulation normaler Zellen, wobei der Blastenanteil  $< 5\%$  beträgt. Als Standard-Induktion seit über 20 Jahren wird ein Anthrazyklin für drei Tage und Cytarabin für sieben Tage verabreicht. Die German AML Cooperative Group verwendet in ihren Studien das TAD- und HAM-Schema. TAD ist eine Kombination aus Cytarabin, Daunorubicin und dem Metabolit 6-Thioguanin über neun Tage. HAM setzt sich zusammen aus Cytarabin und Mitoxantron und wird in fünf Tagen appliziert (siehe Anhang). Meistens werden zwei Zyklen dieser Schemata in verschiedener Kombination verabreicht. Erweitert man diese Therapien durch die zusätzliche Gabe von G-CSF oder GM-CSF führt dies zu einer verstärkten Cytarabin-Zelltoxizität gegenüber leukämischen Blasten.

Die Postremissionstherapie bei den Patienten, die eine komplette Remission erreichten, dient zur Aufrechterhaltung der Remission und zur Elimination versteckter residueller Leukämiezellen. Es gibt verschiedene risikoabhängige Postremissionsmodelle. Die höchste Therapieeffizienz weist die allogene Stammzelltransplantation auf, die allerdings mit einer hohen Mortalitätsrate vergesellschaftet ist. Sie ist somit für die Patientengruppe mit guten Heilungschancen nicht sinnvoll. Eine weitere Möglichkeit besteht in der autologen Stammzelltransplantation nach Hoch-Dosis-Chemotherapie allerdings mit einer hohen Gefahr des Wiederauftretens der Erkrankung. Desweiteren gibt es mehrere Chemotherapiemodelle mit Konsolidierungs- und folgender Erhaltungstherapie. Dabei kann es sich um eine niedrig dosierte Erhaltungstherapie handeln, die über einen Zeitraum von 1-2 Jahren gegeben wird, oder eine intensiviertere Therapie über eine kürzere Zeitspanne von 4-6 Monaten. (Büchner 1999, 2003; Ferrara 2004, Löwenberg 2003, Stone 2004)

65-80% der AML-Patienten unter 60 Jahren weisen nach Induktionstherapie eine komplette Remission auf. Deutlich niedrigere Ansprechraten zwischen 38-62% zeigen sich bei älteren Patienten. Gründe dafür sind, dass das Vorkommen ungünstiger Chromosomenabnormalitäten

im Alter zunimmt, eine AML häufiger aus einem myelodysplastischen Syndrom entsteht und intensive Chemotherapien vom Körper weniger gut toleriert werden (Stone 2004).

### Prognose und Risikoabschätzung

Alle neu diagnostizierten AML-Patienten erhalten eine Induktionstherapie. Bereits vor Therapie werden Prognosefaktoren bezüglich des Therapieansprechens und Gesamtüberlebens ermittelt. Der wichtigste Prognosefaktor ist die Zytogenetik, nach der drei Prognosegruppen je nach Karyotyp erstellt werden (Grimwade 1998, 2001):

- Günstige Risikogruppe
  - t(15;17)(q22;q21)
  - t(8;21)(q22;q22)
  - inv(16)(p13;q22)
- Mittlere Risikogruppe
  - Normaler Karyotyp
  - Nichtkomplexe Abnormalitäten
- Ungünstige Risikogruppe
  - Komplexer Karyotyp: Monosomie von Chromosom 5 oder 7  
Deletion auf langen Arm von Chromosom 5  
3q-Abnormalität

Die Risikoabschätzung erfolgt neben der Zytogenetik durch zahlreiche weitere Prognosefaktoren. Dazu zählt vor allem das Alter. Die Altersgrenze in Studien wird meist bei 60 Jahren festgelegt. Patienten unter 60 Jahren weisen deutlich höhere Ansprechraten auf als diejenigen über 60 Jahren (Nannya 2002, Winton 2003, Smith 2004). Andere anamnestische Prognosefaktoren sind das Vorliegen eines vorangegangenen Myelodysplastischen Syndroms oder eine frühere Chemotherapie (Winton 2003). Ebenso haben Patienten mit praetherapeutisch hohen Leukozytenwerten, hohem Blastenanteil im Knochenmark, hoher Konzentration der Laktatdehydrogenase und der Thymidinkinase eine schlechtere Prognose (Jahns-Streubel 1997, Nannya 2003, Chang 2004). Nach dem ersten Induktionszyklus spricht ein schneller Blastenrückgang für ein gutes Ansprechen (Kern 2003). Alle diese Parameter sind nicht nur wichtig für das Voraussagen einer kompletten Remission (complete remission = CR), sondern auch für die weitere Risikoabschätzung hinsichtlich des Gesamtüberlebens (overall survival = OS). [Tabelle 9]

Da ungefähr 50% der AML-Patienten keinen pathologischen zytogenetischen Befund aufweisen, werden bei Patienten mit normalem Karyotyp molekulargenetische Untersuchungen durchgeführt, um auch in dieser Patientengruppe prognostische Aussagen treffen zu können. Verschiedene Biomarker sind in der Literatur beschrieben. Am

bekanntesten sind Punktmutationen oder „internal tandem duplications“ des FLT3-Gens (fms-like tyrosin kinase 3). Die Folge ist eine Produktion von Proteinen, die die Leukemogenese ankurbeln (Bienz 2005, Marcucci 2005). Bei Vorliegen dieser Genveränderung zeigen die Patienten eine schlechte Prognose (Gilliland 2002). Weitere Molekularmaker sind Mutationen des CEBPA-Gens (CCAAT/enhancer binding protein-alpha), in dessen Zusammenhang die Prognose günstig ist, Überexpression des BAALC-Gens (brain and acute leukemia, cytoplasmic) (Bienz 2005, Marcucci 2005), Duplikatur des MLL-Gens (mixed lineage leukemic) (Poppe 2004) und eine hohe Expression des EVI1-Gens (Barjesteh van Waalwijk 2003).

In zahlreichen Studien werden weitere Parameter als mögliche Prognosemarker beschrieben, die in der gegenwärtigen Praxis allerdings keine Rolle spielen. Hinsichtlich des Immunphänotyp ist prognostisch günstig der positive Nachweis von CD15, CD33, CD38 und CD64, sowie der fehlende Nachweis von CD9, CD11b, CD13, CD34 und CD41 (Repp 2003, Chang 2004). Außerdem wurden Angiogenesefaktoren, wie Angiogenin und VEGF (vascular endothelial growth factor) bei AML-Patienten untersucht mit dem Ergebnis, dass diese Marker im Gegensatz zu Gesunden erhöht sind, aber keine signifikante Korrelation zwischen Angiogenin und kompletter Remission besteht (Verstovsek 2001, Brunner 2002). Der Marker Tryptase im Serum zeigt bei AML-Patienten mit erhöhten prätherapeutischen Werten im Therapieverlauf einen Abfall bei kompletter Remission und gleichbleibende Werte bei persistierender Erkrankung (Sperr 2001). Die Untersuchung von Survivin, einem Apoptoseinhibitor, im Knochenmark und in peripheren Blutzellen, ergab ebenfalls keine signifikante Unterscheidung bezüglich des Therapieansprechens und des Gesamtüberlebens (Adida 2000). In einer weiteren Studie wurde das nm23-H1-Protein, ein Differenzierungs-inhibitorischer Faktor einer undifferenzierten Leukämie-Zelllinie, im Plasma von AML-Patienten bestimmt. Die Patienten wiesen im Vergleich zu Gesunden erhöhte Werte auf und zusätzlich ergab sich ein kürzeres Gesamtüberleben bei hohen nm23-H1-Werten (Niitsu 2000).

Die Risikoabschätzung ist wichtig für die Postremissionstherapie, die risikoadaptiert erfolgt. Es besteht die Wahl zwischen verschiedenen Chemotherapien oder der Durchführung einer autologen oder allogenen Stammzelltransplantation.

**Tabelle 9: Prognosefaktoren bei AML-Patienten**

	Prognosefaktoren	Prognose für
Prae Induktion	Zytogenetik	CR, OS
	Alter	CR, OS
	Immunphänotypisierung	CR, OS
	Thymidinkinase	CR
	Leukozyten	CR, OS
	LDH	CR, OS
	Blastenanteil im Knochenmark	OS
Post Induktion	Blastenanteil im Knochenmark (blast clearance)	OS, RFS (relapse free survival, EFS (event free survival)

## 2.2 Wirkmechanismen der Chemotherapeutika

Die Standardoptionen der Krebstherapie sind Operation, Strahlentherapie oder Chemotherapie, eventuell Hormon- oder Antikörpertherapien, oder eine Kombination aus diesen Methoden. Die Art der Behandlung hängt von vielen Faktoren ab, wie zum Beispiel der Art des Tumors, der Histologie, vom Stadium und Performance Status des Patienten.

Die Chemotherapie erfolgt mittels synthetisch hergestellter Wirkstoffe, die Zellen von Neoplasien möglichst ohne Schädigung der umgebenden Gewebe im Wachstum hemmen oder abtöten.

Die Intention einer Chemotherapie maligner Erkrankungen ist kurativ oder palliativ. Kurativ heißt, dass das Ziel der Therapie eine komplette Remission ist. Wenn eine Heilung unwahrscheinlich ist, wird eine palliative Chemotherapie durchgeführt, die meist besser verträglich ist und weniger Nebenwirkungen aufweist. Im Vordergrund steht eine Verbesserung der Lebensqualität und eventuell eine Verlängerung der Überlebenszeit.

Eine Chemotherapie erfolgt entweder primär, adjuvant oder als Rezidivtherapie. Ist die Chemotherapie die erste Behandlung eines neudiagnostizierten malignen Tumors, so spricht man von einer primären Therapie. Wird die Chemotherapie einer anderen Behandlungsmethode, meist einer Operation, angeschlossen, um den Resttumor zu reduzieren oder um Mikrometastasen zu vernichten, handelt es sich um eine adjuvante Therapie. Eine neoadjuvante Chemotherapie wird vor einer Operation durchgeführt mit dem Ziel den Tumor auf eine resektable Größe zu schrumpfen. Tritt bei einem Patienten ein Lokalrezidiv oder Metastasen auf, wird meist eine Rezidivtherapie durchgeführt.

## Der Zellzyklus – Angriffsort der Chemotherapeutika

Chemotherapeutika haben verschiedene Angriffspunkte und Wirkmechanismen, die zum Zelltod führen. Es gibt viele chemotherapeutische Substanzen, die zellzyklusspezifisch sind und in den verschiedenen Phasen der sich teilenden Zellen angreifen und letztlich zur Apoptose führen können (Barry 1990, Halicka 1997, Hannun 1997, Debatin 2003). [Tabelle 10]

Die Teilung der Zellen erfolgt nach einer streng geordneten und kontrollierten Reihenfolge, dem Zellzyklus. Der Zellzyklus besteht aus zwei Teilen. Die Teilung der Zelle in zwei identische Tochterzellen findet in der Mitosephase statt, in der Interphase wird dann die nächste Mitose vorbereitet. Die Interphase beginnt mit der G1-Phase, in der durch die Einwirkung von Wachstumsfaktoren auf die Zelle und den anschließenden Ablauf einer Signaltransduktionskaskade Proteine für die DNS-Replikation synthetisiert werden. Bei fehlenden Wachstumsfaktoren und fehlenden Substraten tritt die Zelle in die G0-Phase ein, das heißt die Zelle befindet sich in einer Ruhephase und kann erst durch Wachstumsfaktoren zur Zellteilung stimuliert werden (Ford1999).

Auf die G1-Phase folgt die S-Phase mit Replikation der DNS. Für die DNS-Synthese werden zahlreiche Enzyme benötigt, die zugleich Angriffsorte vieler Chemotherapeutika bei der Antitumortherapie sind. Zur Entwindung der Doppelhelixstruktur der DNS wird die Topoisomerase benötigt. Die Helicase trennt die DNS in zwei Einzelstränge. Für die DNS-Replikation sind DNS-Bausteine (Ribophosphate, Basen) und mehrere Enzyme notwendig: Polymerase I und III, Primasen, Ligasen und Telomerasen.

Ist die S-Phase abgeschlossen, wird die DNS-Replikation in der G2-Phase überprüft und die Zelle bereitet sich auf die Mitosephase vor.

**Tabelle 10: Angriffspunkte der Zytostatika in den Phasen des Zellzyklus**

Phase	Zytostatika
G1-Phase	Asparaginase
G1-/S-Phase	Platinderivate Gemcitabin Mitomycin C
S-Phase	Cytarabin 6-Thioguanin Methotrexat 5-Fluorouracil Hydroxyharnstoffe
S-/G2-Phase	Anthrazykline Mitoxantron Etoposid Alkylantien
G2-/M-Phase	Bleomycin Irinotecan Taxane Vinca-Alkaloide
Nicht zellzyklusspezifisch	Nitrosoharnstoffe

Berger 2002

#### Stressinduzierter Weg

Die gebräuchlichen Zytostatika wirken an verschiedenen Angriffspunkten in den Zellen. Viele führen zu einer direkten Schädigung der DNA. Weitere Ziele sind RNA, Mikrotubuli und Proteine (Barry 1990, Hannun 1997). [Tabelle 11]

**Tabelle 11: Wirkungsort der Zytostatika**

Angriffspunkte	Zytostatika
DNA	Adriamycin 5-Fluorouracil Bleomycin Methotrexat Etoposid Cytarabin MitomycinC
RNA	Hydroxyharnstoffe 6-Mercaptopurin
Mikrotubuli	Taxol Vincristin
Proteine	L-Asparaginase

Hannun 1997

Nach Zellschädigung kann Apoptose über den stressinduzierten Weg ausgelöst werden. Dabei kommt es zur Aktivierung des Tumorsuppressor-Proteins p53, das entweder eine Reparatur der DNA ermöglicht, zum Wachstumsstillstand führt oder Apoptose auslöst (Ehlert 2001, Herr 2001). Über die weitere Aktivierung von Proteinen aus der Bcl-2-Familie, die die Mitochondrienmembran durchlässig machen, kommt es zu einer Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Nach mehreren Zwischenschritten wird dadurch die Caspase 9 aktiviert, die letztendlich die Effektorcaspase 3 aktiviert (Ehlert 2001).

#### Todesrezeptor-abhängiger Weg

Ein weiterer Weg, der zur Apoptose führt, wird durch die Aktivierung von Todesrezeptoren reguliert. Zytostatika führen zu einer erhöhten Expression von Todesrezeptoren und ihrer Liganden (Herr 2001, Petak 2001). Die Todesrezeptoren wie Fas-R (CD95) und TRAIL-R (TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor) binden ihre Liganden FasL und TRAIL und aktivieren über die Bildung eines „death receptor-induced signalling complex“ (DISC) direkt die Caspasen. Über die Aktivierung der Caspase 8 und nachfolgend der Caspase 3 kommt es zur Induktion der Apoptose (Debatin 1999, Ehlert 2001, Herr 2001, Petak 2001, Schultz 2003, Fadeel 2005).

#### Mechanismus von Rituximab

Rituximab ist ein monoklonaler Antikörper, der an CD20-Moleküle auf B-Zell-Oberflächen bindet (Johnson 2001). Nach Bindung von Rituximab kommt es zum Zelltod der B-Zellen. Dieser Antikörper wird deshalb in der Therapie von B-Zell-Lymphomen verwendet. Zum Zelltod kommt es durch eine Kombination von verschiedenen Wirkmechanismen. Rituximab wirkt einerseits immunvermittelt durch Komplement-abhängige Zytotoxizität oder durch Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität. Andererseits zeigt Rituximab einen direkten Effekt durch Wachstumshemmung der Zellen oder durch Induktion der Apoptose (Maloney 2002, Johnson 2003). Nach Bindung der Antikörper mit CD20 wird eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, die letztlich zur Aktivierung von Caspasen führt und Apoptose zur Folge hat (Shan 2000). Desweiteren macht Rituximab die Zellen sensibler für Chemotherapeutika (Johnson 2003) und wird deshalb häufig als Vorphase oder in Kombination mit anderen Zytostatika verabreicht.

#### Glucocorticoide und Apoptose

Glucocorticoide wirken immunsuppressiv, antiinflammatorisch und zytotoxisch. Sie werden in der Anti-Tumor-Therapie, besonders bei Lymphomen und Leukämien, eingesetzt wegen ihrer Fähigkeit, Apoptose in hämatologischen Zellen zu induzieren. Es gibt zwei Hypothesen über die Auslösung von Apoptose durch Glucocorticoide: Zum einen über die Aktivierung von todinduzierenden Genen und zum anderen über die Unterdrückung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren. (Greenstein 2002).

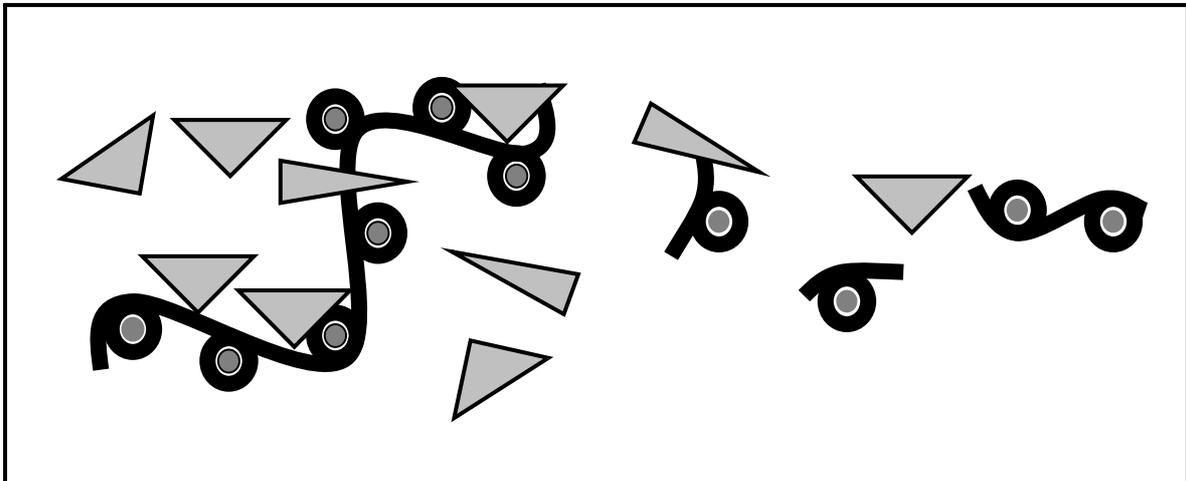
### 2.3 Apoptose und Nukleosomen

Die Apoptose läuft in drei großen Schritten ab. Zuerst kommt es zur Apoptosestimulierung in der Zelle über verschiedene Wege, wie bereits oben beschrieben. Die zweite Phase, die Exekution der Zelle, führt zu strukturellen Veränderungen und zuletzt werden die Überreste der Zelle durch Phagozytose eliminiert (Webb 1997).

Die verschiedenen Signaltransduktionswege der Apoptose münden letztendlich in die Aktivierung der Caspase 3. Dies hat eine Spaltung von Todessubstraten zur Folge, die zum morphologischen und biochemischen Bild der Apoptose führen. Morphologische Veränderungen sind die Schrumpfung der Zelle und die Kondensation des Chromatins. Im weiteren Verlauf führen Zellmembranstabilität zu Ausstülpungen der Zelle (Zeiose) und anschließend zur Abschnürung membranumschlossener Säckchen (Blebbing), die als „apoptotic bodies“ bezeichnet werden (Kerr 1994, Saikumar 1999, Krammer 2000). Außerdem kommt es nach Aktivierung der Caspase 3 zu Strangbrüchen der chromosomalen DNA in Fragmente von 180 Basenpaaren und Vielfachen, was auf eine Spaltung in nukleosomale Fragmente schließen lässt. Diese Teilung erfolgt durch aktivierte Endonukleasen, wie „caspase-activated deoxyribonuclease (CAD)“, an den Linker-Regionen der DNA (Arends 1990, Wyllie 1992, Kerr 1994, Enari 1998, Saikumar 1999, Fadeel 2005). Die dadurch entstandenen mono- und oligonukleosomalen Fragmente werden in die sogenannten „apoptotic bodies“ verpackt. Diese werden von Makrophagen und Nachbarzellen phagozytiert. (Webb 1997, Lichtenstein 2001, Hengartner 2001)

Die Nukleosomen sind aufgebaut aus einem Histon-Oktamer umwickelt von DNA und bilden somit eine sich ständig wiederholende Struktur des Chromatins. Der Histon-Komplex besteht aus jeweils zwei der vier Histone, H2A, H2B, H3 und H4, und ist umgeben von 147 Basenpaaren DNA. Diese Einheit wird als „core-particle“ bezeichnet. Bindeglied zwischen den „core“-Partikeln ist die „linker“-DNA, bestehend aus 20 bis 80 Basenpaaren, an der die Endonukleasen angreifen und das Chromatin in nukleosomale Fragmente teilen. (Kornberg 1974, 1999, Luger 2003, 2006) [Abb. 1]

**Abbildung 1: Spaltung des Chromatins an der Linker-DNA durch Endonukleasen in Mono- und Oligonukleosomen.**



In mehreren Studien wurden Nukleosomen im Plasma oder Serum bei verschiedenen Erkrankungen bestimmt. Im Gegensatz zu gesunden Personen wurde bei Patienten mit malignen Tumorerkrankungen und Patienten mit benignen Krankheiten höhere Nukleosomen-Konzentrationen festgestellt (Leon 1977, Shapiro 1983, Kuroi 2001, Holdenrieder 1999, 2001a, 2001b). Bei Patienten während Chemo- oder Radiotherapie sah man ein typisches Verlaufsmuster (Holdenrieder 2001c, Kremer 2005). Bereits 24-72 Stunden nach Beginn einer Chemotherapie stiegen die Nukleosomenwerte rapide an mit anschließendem Abfall auf das Niveau der Ausgangswerte am Ende der ersten Therapiewoche (Holdenrieder 2001a, Kuroi 2001). Es zeigte sich bei Lungenkarzinom-Patienten mit Remission nur ein geringer Anstieg der Nukleosomen mit einem anschließenden rapiden Abfall der Werte während des ersten Chemotherapiezyklus. Patienten mit Progression hatten jedoch einen stärkeren Anstieg und weniger deutlich abfallende Werte während der folgenden Tage. Die Fläche unter der Kurve von Tag 1 bis Tag 8 unterschied signifikant bezüglich des Therapieansprechens. Es zeigte sich somit, dass bereits frühzeitige Veränderungen der Nukleosomenwerte während des ersten Zyklus das spätere Therapieansprechen anzeigen können (Holdenrieder 2004).

Bei systemischen Tumorerkrankungen, wie den Lymphomen und Leukämien, zirkulieren die Tumorzellen im Blutkreislauf oder befinden sich im Knochenmark und sind somit den Chemotherapeutika direkt zugänglich. Die Freisetzung der Nukleosomen ist deshalb möglicherweise erleichtert und hängt nicht von der Blutversorgung des Tumors ab. Diese Studie untersuchte den Verlauf der Nukleosomen, weiterer Marker aus der klinischen Routine, wie Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin und Laktatdehydrogenase, und verschiedener Tumormarker, wie Thymidinkinase,  $\beta$ 2-Mikroglobulin, CA125 und CYFRA 21-1, bei Patienten mit Lymphomerkkrankungen und akuter myeloischer Leukämie während

der Chemotherapie. Eine Frage war, ob die Nukleosomen auch bei Patienten mit systemischen Krebserkrankungen, die mit Standardchemotherapien behandelt werden, das Therapieansprechen frühzeitig beurteilen können. Weiteres Ziel dieser Untersuchungen war es, den Verlauf der Nukleosomen bei systemischen Krebserkrankungen mit dem der Patienten mit soliden Tumoren zu vergleichen und die Unterschiede zu erklären.

## **3 Patienten und Methoden**

### **3.1 Ein- und Ausschlusskriterien**

Die Studie umfasst 75 Patienten mit systemisch malignen Erkrankungen, davon sind 50 Lymphom-Patienten und 25 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML). Alle diese Patienten erhielten eine Chemotherapie und wurden in die Studie aufgenommen, wenn sie sich nicht schon in einer laufenden Behandlung befanden. Weitere Ausschlusskriterien waren die Unzumutbarkeit zusätzlicher Blutabnahmen aufgrund schlechten Allgemeinzustandes und die Nicht-Einwilligung der betreffenden Person in die Studie.

### **3.2 Patienten**

#### **3.2.1 Lymphome**

Die 50 Lymphom-Patienten wurden zunächst in die zwei großen Gruppen der Hodgkin Lymphome (N=11) und Non-Hodgkin-Lymphome (N=39) unterteilt. Die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) wurden weiterhin nach R.E.A.L. klinisch eingruppiert in 7 indolente und 28 aggressive NHL. Vier Patienten konnten keiner dieser Untergruppen eindeutig zugeordnet werden.

Die Einteilung in Stadien erfolgte nach der Ann-Arbor-Klassifikation, die es sowohl für die Hodgkin-Lymphome wie auch für die NHL gibt. Dabei wurde zum einen die Ausbreitung des Lymphoms (Stadium I-IV) und zum anderen die klinischen Symptome (Stadium A/B) berücksichtigt. Der überwiegende Teil der Patienten befand sich zum Diagnosezeitpunkt in den fortgeschrittenen Stadien III und IV.

Die Patienten mit Morbus Hodgkin (MH) waren im Median 35 Jahre alt und somit jünger als die NHL-Patienten mit einem Median von 56 Jahren. Die Geschlechterverteilung war bei MH 4 Frauen zu 7 Männer und bei NHL 15 Frauen zu 24 Männer. [Tabelle 12]

**Tabelle 12: Einteilung der Lymphom-Patienten**

	Anzahl n =	Alter(J) Median	Geschlecht		Stadium							
			M n =	W n =	I n=	II n=	III n=	IV n=	? n=	A n=	B n=	? n=
Lymphome, insgesamt	50	52	31	19	3	8	10	17	12	18	13	19
Morbus Hodgkin	11	35	7	4	1	5	3	1	1	6	3	2
Nodulär sklerosierend	3	30	2	1		2			1	1	1	1
Mischzellig	6	37	3	3	1	1	3	1		3	2	1
Lymphozytenarm	1	31	1			1				1		
Lymphozytenreich	1	54	1			1				1		
Aggressive NHL	28	52	18	10	2	3	3	11	9	9	5	14
B-NHL, großzellig	17	49	12	5	1	3	2	7	4	5	4	8
Immunoblastisches	2	49	1	1					2			2
Mantelzelllymphom	2	63		2				2			1	1
Follikuläres NHL (G3)	3	54	1	2	1			2		3		
Plasmozytom	2	61	2				1		1	1		1
T-NHL, hochmaligne	2	51	2						2			2
Indolente NHL	7	68	4	3			2	4	1	2	3	2
Marginalzonenlymph.	1	69	1					1		1		
MALT-Lymphom	1	59	1				1				1	
Follikuläres NHL (G1,2)	2	53	0	2			1	1			1	1
CLL	3	62	2	1				2	1	1	1	1
Unbekannte NHL	4	55	2	2			2	2		2	2	

### 3.2.2 Akute myeloische Leukämie

An der Studie nahmen 25 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie teil. Bei 23 Patienten handelte es sich um eine neudiagnostizierte Leukämie, die zuerst mit einer Induktionstherapie behandelt wurde mit dem Ziel einer kompletten Remission. Die restlichen zwei Patienten erlitten ein Rezidiv und erhielten spezielle Rezidiv-Chemotherapien. Die Geschlechterverteilung belief sich auf 48% Frauen und 52% Männer und die Altersverteilung lag zwischen 22 und 76 Jahren mit einem Median von 62 Jahren. [Tabelle 13a und b]

**Tabelle 13a: Charakteristika der AML-Patienten**

	Median	Bandbreite
Alter (Jahre)	62	22 – 76
	Anzahl	Prozent
<b>Geschlecht</b>		
Frauen	12	(48,0)
Männer	13	(52,0)
<b>Histologie</b>		
M0	1	(4,0)
M1	7	(28,0)
M2	8	(32,0)
M3	1	(4,0)
M4	5	(20,0)
M6	3	(12,0)
<b>Zytogenetik</b>		
Normal	13	(12,0)
Trisomie 8	1	(4,0)
Trisomie 11	1	(4,0)
Trisomie 21, Isochrom X	1	(4,0)
Mosaik 46XX,45X0	1	(4,0)
Inversion 16	2	(4,0)
Inversion 3	1	(4,0)
Inversion 3, Monosomie 7	1	(4,0)
Perizentrische Inversion 4	1	(4,0)
Translokation (2;5)	1	(4,0)
Translokation (8;21)	1	(4,0)
Translokation (15;17)	1	(4,0)
<b>Immunphänotyp</b>		
MPO, CD13, CD33	15	(60,0)
MPO, CD13, CD33, CD 14	1	(4,0)
MPO, CD13, CD33, CD3, CD7, Cd2, TdT	1	(4,0)
CD33, CD117, cyCD3, (CD19)	1	(4,0)
Unbekannt	7	(28,0)
<b>Therapieschema</b>		
TAD	9	(36,0)
HAM	5	(20,0)
TAD/HAM	7	(28,0)
HAM/HAM	2	(8,0)
Rezidivtherapie	2	(8,0)
<b>Therapieansprechen</b>		
Komplette Remission	18	(72,0)
Nicht komplette Remission	7	(28,0)

**Tabelle 13b: Charakteristika der AML-Patienten**

Patient	Alter (Jahre)	FAB-Klassifikation	Zyto-genetik	Immunphänotyp	Therapieschema
1	27	M0	Normal	CD33, CD117, cyCD3, (CD19)	TAD/HAM
2	48	M1	Normal	MPO, CD13, CD33	HAM
3	62	M1	Normal	MPO, CD13, CD33	TAD
4	48	M1	Tris21, IsochromX	MPO, CD13, CD33, cCD3, CD7, CD2, TdT	HAM
5	54	M1	Inv 3, Monosomie7	MPO, CD13, CD33	TAD/HAM
6	68	M2	Normal		Rezidivtherapie
7	66	M2	Normal	MPO, CD13, CD33	HAM/HAM
8	54	M2	Normal		HAM/HAM
9	71	M2	Normal	MPO, CD13, CD33	TAD
10	42	M2	Inv 3	MPO, CD13, CD33	Rezidivtherapie
11	61	M2	t(8;21), -Y	MPO, CD13, CD33	HAM
12	69	M3v	t(15;17)		TAD
13	64	M4	Normal	MPO, CD13, CD33	TAD
14	65	M4	Normal	MPO, CD13, CD33	TAD
15	57	M4	Mosaik 44XX/45X0	MPO, CD13, CD33, CD14	TAD/HAM
16	68	M6	Normal	MPO, CD13, CD33	TAD/HAM
17	44	M6	Normal		HAM
18	65	M6	Tris 8		HAM
19	63	M1	Normal		TAD/HAM
20	69	M1	Pericentri Inv 4	MPO, CD13, CD33	TAD
21	44	M2	Normal	MPO, CD13, CD33	TAD/HAM
22	64	M1	Trisomie 11	MPO, CD13, CD33	TAD/HAM
23	73	M2	t(2;5)	MPO, CD13, CD33	TAD
24	76	M4Eo	Inv 16		TAD
25	22	M4Eo	Inv 16	MPO, CD13, CD33	TAD

### 3.3 Studienablauf

Patienten mit maligner Lymphomerkkrankung oder Leukämie, bei denen eine Chemotherapie geplant war, wurden über die Studie „Therapeutisches Monitoring anhand von Apoptose-Produkten im Serum bei Patienten mit malignen Tumoren während Chemotherapie“ aufgeklärt, sowie über den Ablauf der Studie und die Handhabung der Daten. Diese Studie wurde von der Ethikkommission genehmigt. Die Patienten unterschrieben vor Teilnahme an der Studie eine Einverständniserklärung. Nachdem die Patienten ihr Einverständnis gegeben hatten, wurde mit dem Sammeln der Blutproben begonnen.

Bei den Patienten wurden während Chemotherapie täglich routinemäßig Laborkontrollen bestimmt einschließlich Hämoglobin, Leukozyten, Thrombozyten und Laktatdehydrogenase. Wir bestimmten zusätzlich die Nukleosomen im Serum (nach Stabilisation mit EDTA) prätherapeutisch, möglichst am selben Tag vor der ersten Applikation der Chemotherapie oder am Vortag. Anschließend wurde während der ersten Woche täglich am Morgen vor Gabe der Chemotherapie zur Bestimmung der Nukleosomen zusätzlich ein Röhrchen Serum mit abgenommen und mit EDTA stabilisiert. Stellte sich der Patient zu den weiteren Zyklen vor, wurde erneut vor jedem weiteren Zyklus eine Abnahme vorgenommen. Neben den Nukleosomen wurden weitere Tumormarker im Serum, vor allem vor den weiteren Zyklen bestimmt [Tabelle 14]. Die Dauer und Intervalle der Zyklen richteten sich nach den

Therapieschemata. Das Therapieschema bei den einzelnen Patienten während des Sammelns der Blutproben blieb konstant. Falls ein Wechsel des Therapieschemas erfolgte, wurde das Sammeln der Proben beendet.

Im Labor wurden die Blutproben zur Bestimmung der Nukleosomen bei 3000g zehn Minuten lang zentrifugiert und das Serum dekantiert. 1 ml der Serumprobe wurde mit 100µl 100mM EDTA versehen zur Stabilisierung der Nukleosomen. Die Zugabe von EDTA hemmt Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-abhängige Endonukleasen, und somit die invitro-Degradation von Nukleosomen im Serum. Die Proben wurden dann bei Temperaturen von -80 °C gelagert. (Holdenrieder 2001b)

Neben dem Sammeln und der Verarbeitung der Blutproben wurden die klinischen Daten der Patienten erfasst. Zur Dokumentation gehörten die Diagnose, der Erkrankungsbeginn, eventuell das Rezidivdatum, das Vorhandensein von Metastasen, gegebenenfalls das Todesdatum, Zeitpunkt und Art der Chemotherapie, Datum und Ergebnis der laborchemischen und bildgebenden Staginguntersuchungen und Nebenwirkungen der Chemotherapie.

Nach Beendigung des Sammelns der Proben und Erhebung der klinischen Daten wurden die Nukleosomenwerte mittels ELISA-Test gemessen.

**Tabelle 14: Abnahmeschema der Marker**

	Lymphome		AML
	Täglich während der ersten Woche	Vor den einzelnen Zyklen	Täglich während der ersten Woche
Nukleosomen	X	X	X
Leukozyten	X	X	X
Thrombozyten	X	X	X
Hämoglobin	X	X	X
LDH	X	X	X
Beta-2-Mikroglobulin		X	
Thymidinkinase		X	X
CYFRA 21-1		X	
CA 125		X	

### 3.4 Therapie

#### 3.4.1 Lymphome

Die Therapie der Lymphom-Patienten erfolgte meist im Rahmen von Studien. Hierbei wurde den Patienten ein bestimmtes Therapieschema nach vorgegebenen Studienkriterien zugewiesen. Die Art der Therapie richtete sich zunächst danach, ob es ein Patient mit Primär- oder Rezidivdiagnose war. Auch der Performancestatus und das Stadium wurden bei der Auswahl der Therapie beachtet. [Tabellen 15-17]

**Tabelle 15: Therapieschemata bei Morbus Hodgkin**

	Anzahl der Patienten
ABVD	4
BEACOPP	5
DHAP	2

Ausführliche Therapieprotokolle siehe Anhang

In manchen Therapieprotokollen war eine Vorphase entweder mit Rituximab, Vincristin, Prednisolon, Vincristin + Prednisolon oder einer Kombination aus diesen vorgesehen. Rituximab wurde *in der* Vorphase einen Tag vor Beginn der eigentlichen Chemotherapie verabreicht oder während der Chemotherapie gegeben. Die Gabe von Vincristin erfolgte in der Regel acht Tage vor Therapiebeginn, Prednisolon wurde täglich eine Woche zuvor gegeben und Vincristin + Prednisolon war die kombinierte Gabe von einmal Vincristin acht Tage vor Therapiebeginn und der anschließenden täglichen Applikation von Prednisolon.

**Tabelle 16: Therapieschemata mit Vorphase bei aggressiven NHL**

Therapieprotokoll	Anzahl der Patienten	Anzahl der Patienten mit Vorphase
CHOP	4	2
R-CHOP	2	2
CHOEP	7	4
R-CHOEP	3	2
DHA	1	
DHAP	2	
R-DHAP	2	1
Fludarabin	1	
R-FCM	1	
HyperCDT	1	
Campath-FCD	2	

Ausführliche Therapieprotokolle siehe Anhang

**Tabelle 17: Therapieschemata und Vorphase bei indolenten NHL**

Therapieprotokoll	Anzahl der Patienten	Anzahl der Patienten mit Vorphase
CHOP	4	
R-CHOP	3	3
Fludarabin	1	
R-DEXA-BEAM	1	1

Ausführliche Therapieprotokolle siehe Anhang

### 3.4.2 Akute myeloische Leukämie

Die Induktionstherapie bei neu diagnostizierter AML bestand aus einem oder zwei Zyklen nach dem TAD und/oder HAM-Protokoll. In den meisten Fällen wurde als erster Zyklus das TAD-Schema verabreicht, das sich aus Cytarabin, Daunorubicin und 6-Thioguanin zusammensetzt. Das HAM-Schema beinhaltet Cytarabin und Mitoxantron. Die Rezidivpatienten bekamen entweder Cytarabin kombiniert mit Daunorubicin oder das FS-

HAI-Schema. (Ausführliche Therapieschemata siehe Anhang)

### **3.5 Staging und Beurteilung**

#### **3.5.1 Lymphome**

Das Therapieansprechen wurde nach den Kriterien aus dem internationalen Workshop für Non-Hodgkin-Lymphome nach den Richtlinien der Arbeitsgruppe um Bruce D. Cheson eingeteilt (Cheson 1999). Das Staging erfolgte anhand von Computertomografie und Knochenmarksbiopsie innerhalb von zwei Monaten nach Therapie.

Eine komplette Remission (CR) wurde erreicht, wenn der Patient keine klinischen Symptome aufwies und die radiologische Bildgebung Normalbefunde zeigte. Das heißt, dass Lymphknoten, deren größter Durchmesser vor Therapie größer als 1,5 cm ist, sich auf eine Größe kleiner 1,5 cm zurückbilden und prätherapeutische Lymphknoten zwischen 1,1 und 1,5 cm nach Therapie weniger als 1 cm messen oder sich um 75% bezüglich des Produkts der beiden größten Durchmesser zurückbilden. Die Milz muss eine normale Größe aufweisen und es darf kein weiterer Organbefall oder eine Knochenmarkinfiltration bekannt sein.

Patienten, die einen Lymphknotenrückgang größer als 75% des Produkts der beiden größten Durchmesser haben, aber trotzdem noch einen Durchmesser des Lymphknotens von größer als 1,5 cm aufweisen, zählen zu den unbestätigten kompletten Remissionen (CRu/unconfirmed). Sonst treffen dieselben Kriterien wie bei der kompletten Remission zu. In dieser Studie wurde zwischen diesen beiden Gruppen nicht unterschieden.

Eine Teilremission (PR, Partial Remission) ist definiert durch einen Rückgang von mehr als 50% bezogen auf die sechs größten Lymphknoten bzw. Lymphknotenpakete. Eine Vergrößerung weiterer Lymphknoten, der Milz oder der Leber darf nicht vorliegen. Bekannte splenische und hepatische Läsionen müssen sich ebenfalls um 50% zurückbilden.

Progression (PD, Progressive Disease) wird definiert, wenn es zu einer Lymphknotenvergrößerung von mehr als 50% kommt oder neue Läsionen auftreten. Eine Änderung der Lymphknotengröße um weniger als 50%, sowohl zunehmend als auch abnehmend, wird definiert als „Stable Disease“ (SD).

In der Auswertung dieser Studie mit der Fragestellung nach der frühzeitigen Beurteilung des Therapieansprechens durch Nukleosomen wurde zwischen zwei Patientengruppen unterschieden. In der einen Gruppe waren alle Patienten mit kompletter Remission und in der anderen Gruppe alle Patienten mit nicht ausreichendem Therapieansprechen. Dazu gehörten die Patienten mit partieller Remission, „Stable Disease“ und „Progressive Disease“.

Die Gruppe der Chronisch Lymphatischen Leukämien gehört zu den indolenten Lymphomen und die Therapieantwort wird eingeteilt nach Kriterien der Arbeitsgruppe des National Cancer

Instituts (Cheson 1996). Dabei wird neben dem Lymphknotenstatus auch das Blutbild beurteilt. [Tabelle 18]

**Tabelle 18: Staging bei CLL**

Komplette Remission
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Unauffälliger körperlicher Untersuchungsbefund</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Patient symptomlos</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blutbild: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lymphozyten <math>&lt; 4 \times 10^9 / l</math></li> <li>• Neutrophile <math>&gt; 1,5 \times 10^9 / l</math></li> <li>• Thrombozyten <math>&gt; 100 \times 10^9 / l</math></li> <li>• <i>Hämoglobin</i>-Wert <math>&gt; 11 \text{ g/dl}</math></li> </ul> </li> </ul>
Teilremission
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lymphknotenrückgang um 50% und/oder</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rückgang des Leber- und Milzbefalls um 50%</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Blutbild <ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutrophile <math>&gt; 1,5 \times 10^9 / l</math></li> <li>• Thrombozyten <math>&gt; 100 \times 10^9 / l</math></li> <li>• <i>Hämoglobin</i> <math>&gt; 11 \text{ g/dl}</math> oder Besserung des <i>Hämoglobins</i> um 50%.</li> </ul> </li> </ul>
Progression
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vergrößerung der Lymphknoten</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zunahme des Leber- und/oder Milzbefalls</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zunahme der zirkulierenden Lymphozyten um mindestens 50%</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neue Läsionen</li> </ul>

### 3.5.2 Akute myeloische Leukämie

Nach dem zweiten Zyklus wurde das Staging mit Knochenmarksuntersuchung vorgenommen, das uns als Endpunkt bezüglich des Ansprechens der Therapie diente. Bei den Patienten die nur einen Zyklus der Induktion verabreicht bekamen, wurde das Ergebnis von Tag 16 herangezogen, welches in diesen Fällen stets eine komplette Remission aufwies. In unserer Studie wurden die AML-Patienten in zwei Gruppen eingeteilt: Patienten mit kompletter Remission und die restlichen Patienten ohne komplette Remission.

Als Kriterien für das Therapieansprechen wurden die Angaben der „German AML Cooperative Group“ verwendet [Tabelle 19]. Dafür notwendig waren zum einen die Knochenmarkuntersuchung und zum anderen Untersuchungen im peripheren Blut.

**Tabelle 19: Staging bei AML**

	<b>Komplette Remission</b>	<b>Keine komplette Remission</b>
<b>Knochenmarkbiopsie</b>	Zellularität 2+ (mindestens 20%) mit < 5% Blasten und kein Vorhandensein von Auer-Stäbchen	> Fünf % Blasten im Knochenmark
<b>Peripheres Blut</b>	Keine Blasten Granulozyten > 1,5 G/l Thrombozyten > 100 G/l	Blasten im peripheren Blut
<b>Sonstige Kriterien</b>	Kein Vorhandensein von extramedullären leukämischen Infiltraten	Langanhaltende Hypoplasie des Knochenmarks Tod in weniger als sieben Tagen nach dem ersten Induktionszyklus (early death) Tod während der therapie-induzierten schweren Knochenmarkhypoplasie in der Phase der Hypoplasie (hypoplastic death)

### 3.6 Methoden

#### Nukleosomen / ELISA

Die Quantifizierung der Nukleosomen im Serum erfolgte mit dem Cell Death Detection ELISA<sup>plus</sup> Test der Firma Roche Diagnostics, Penzberg. Die Methode basiert auf einem quantitativen Sandwich-Enzymimmunoassay-Prinzip, indem monoklonale Maus-Antikörper an DNA und Histone binden und somit die Nukleosomen spezifisch binden. Die Serumproben wurden mit einer Mischung aus biotinyliertem Anti-Histon-Antikörper, Peroxidase-markierte Anti-DNA-Antikörper und einem Inkubationspuffer in einer Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte für insgesamt zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einem Rüttler (500rpm) inkubiert. Dabei kam es zu einer Bindung des Immunkomplexes an die Mikrotiterplatte durch eine Streptavidin-Biotin Interaktion. Nach der Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper

ausgewaschen. Die gebundenen Peroxidase-markierten Komplexe wurden anschließend mit ABTS-Substrat (2,2'-Azino-di(3-Ethylbenzthiazolin-6-Sulfonat)) für 30 Minuten wieder auf dem Rüttler inkubiert. In dieser Zeit kam es zu einer Farbentwicklung, die proportional zur Anzahl der Nukleosomen war. Der photometrische Nachweis auf einem Tecan-Sunrise (Mikrotiterplatten-Reader) erfolgte bei 405 nm im Vergleich zu einer Blanko-Substratlösung mit einer Referenz-Wellenlänge von 492 nm. Zunächst wurden mittels Standardmaterialverdünnungen drei Messungen nach 7,5 Minuten (1:24), 15 Minuten (1:48) und 30 Minuten (1:96) durchgeführt. Ursprünglich wurden als 30-Minuten-Wert 1000 AU (15-Minuten-Wert 2000 AU, 7,5 Minuten 4000AU) definiert. 30 Minuten erwies sich als ausreichende Inkubation bezüglich Farbentwicklung und einem Fehler von <5% durch die Pipettierzeit. Zusätzliche Messungen erfolgten bei sehr hohen Werten zur Vermeidung von Wiederholungen der verdünnten Proben, bei denen mit einer Interassay-Variabilität zu rechnen wäre, so dass der zu erwartende Fehler durch das gewählte Vorgehen geringer war. Zu späterem Zeitpunkt wurde in allen Verdünnungen der Standardreihe die DNA-Konzentration mittels rtPCR gemessen, um die Nukleosomenkonzentration in absoluter Konzentration (ng/ml DNA) angeben zu können. Der Umrechnungsfaktor betrug 0,572. Somit entsprachen 1000 AU 572 ng/ml. Die Nachweisgrenze lag entsprechend der funktionellen Sensitivität (niedrigster zu messender Wert mit einem Impräzisions-Variationskoeffizienten <20%) bei 16 AU = 9,2 ng/ml Die Intraassay-Impräzision betrug 3,0 – 4,1% und die Interassay-Impräzision 8,6 – 13,5%, und erfüllte somit die zu erwartenden Normen eines manuellen Verfahrens (<10%/<15%)

#### CYFRA 21-1, CA125 / ELECSYS 2010

Die Marker CYFRA 21-1 und CA 125 wurden am Elecsys 2010-Analyser der Firma Roche gemessen. Das Messprinzip ist eine Bindung des Antigens mittels zweier spezifischer Antikörper und die Quantifikation mittels des Elektro-Chemolumineszenz-Immunoassay-Prinzips (ECLIA).

CYFRA 21-1 ist ein Fragment des Cytokeratins 19. Es gibt 20 verschiedene Cytokeratin-Polypeptide, die Strukturproteine sind und Untereinheiten der epithelialen Intermediärfilamente darstellen. Mit Hilfe zweier spezifischer monoklonaler Antikörper, dem biotinylierten anti-Cytokeratin 19,1 Antikörper und dem anti-Cytokeratin 19 Antikörper markiert mit Ruthenium-Komplex, kann CYFRA 21-1 analysiert werden.

CA 125 ist eine antigene Determinante und befindet sich auf einem hochmolekularen Glykoprotein, das aus Serum gewonnen wird. Die Serumprobe wird inkubiert mit einem biotinylierten monoklonalen CA 125 spezifischen Antikörper und einem mit Ruthenium-Komplex markierten monoklonalen CA 125 spezifischen Antikörper, die zusammen einen Sandwich-Komplex bilden. Somit kann das CA 125 quantitativ am Elecsys bestimmt werden.

## β2-Mikroglobulin / IMx

β2-Mikroglobulin, ein Protein, das auf der Oberfläche der meisten zellkernhaltigen Zellen und in besonders hohen Konzentrationen auf der Oberfläche der Lymphozyten nachgewiesen werden kann, wird am IMx (Abbott) nach der MEIA-Methode gemessen. Im Serum können erhöhte Konzentrationen bestimmt werden bei Niereninsuffizienz mit verminderter Ausscheidungsgeschwindigkeit oder bei vermehrter Synthese, wozu Erkrankungen des lymphatischen Systems zählen.

## Thymidinkinase / RIA

Der Tumormarker Thymidinkinase kann mittels RIA im Serum quantifiziert werden. Unter Verwendung radioaktiv spezifisch (125J-) markierter Antikörper, die eine Bindung mit der zu bestimmenden Substanz eingehen, kann nach Isolierung dieser Verbindung die Strahlungsaktivität bestimmt werden und die Antigenkonzentration nach Vergleich mit Standards bekannter Aktivität ermittelt werden.

Die Thymidinkinase ist ein Zellenzym, das für den Einbau des Nukleosids Thymidin in die DNA verantwortlich ist, und stellt somit ein Maß für die Teilungsaktivität von Zellen dar. Besonders geeignet ist der Nachweis der Thymidinkinase bei Krebserkrankungen, des blutbildenden und lymphatischen Systems mit hohen Zellteilungsraten. In dieser Studie wurde der Thymidine Kinase REA-Test von Immunotech (Beckman Coulter Company) verwendet.

Die weiteren Parameter aus den Routineblutabnahmen wurden an folgenden Geräten bestimmt:

- Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin –Beckman-Coulter
- Laktatdehydrogenase – Olympus AU 2700

Die Knochenmarkuntersuchung, die an Tag 16 zur Prognosebestimmung und am Ende der Induktionstherapie zur Beurteilung des Therapieansprechens durchgeführt wurde, gab Aufschluss über

- den Blastenanteil im Knochenmark,
- den Immunphänotyp und
- die Zytogenetik.

## 4 Statistik

Alle Auswertungen wurden getrennt für die Gruppen der Lymphom-Patienten, die Untergruppe der aggressiven Non-Hodgkin-Lymphome sowie die Gruppe der AML-Patienten durchgeführt. In Tabelle 14 (s.o.) ist zu sehen, welche Parameter zu welchen Zeitpunkten in den Gruppen gemessen wurden. Im einzelnen wurden bei den Lymphom-Patienten folgende Variablen herangezogen:

- Die Werte vor den weiteren Zyklen (Z1-Z4), wobei Z1 dem prätherapeutischen Wert an Tag 1 entspricht.
- Der prätherapeutische Wert (Tag 1.)
- Die Werte jeweils an den Tagen 2 bis 5 und ein Wert von den Tagen 6 bis 8.

Bei den AML-Patienten wurde neben den Werten während der ersten Therapiewoche folgende zusätzliche Variablen herangezogen:

- Die Fläche unter der Kurve von Tag 2-4 (AUC 2-4) mit allen Werten von Tag 2-4.
- Der Abfall von Tag 2 zum prätherapeutischen Wert von Tag 1, angegeben in Prozent.

Zunächst wurden die Einzelwerte vor den einzelnen Zyklen und während der ersten Woche in DotPlot-Grafiken dargestellt, um den Verlauf der Werte während der Therapie zu zeigen. Die Patienten wurden nach Therapieansprechen in die zwei Gruppen mit kompletter Remission und ohne Remission eingeteilt und der Verlauf der Einzelwerte in DotPlot-Grafiken sowie Mediane und Wertebereich in Tabellen zum Vergleich nebeneinander dargestellt. Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden für die Werte vor den Therapiezyklen mittels Wilcoxon-Test auf Signifikanz geprüft. Für die Werte während des ersten Therapiezyklus wurde zunächst mittels einer Gesamtvarianzanalyse geprüft, ob eine Abhängigkeit der gemessenen Parameter vom Therapieansprechen und von den einzelnen Tagen während der Chemotherapie und zusätzlich, inwiefern eine Interaktion zwischen der Therapieantwort und den Markerveränderungen an den ersten 8 Tagen während Therapie besteht. Nur, wenn das Ergebnis der Gesamtvarianzanalyse hinsichtlich der Beurteilung des Therapieansprechens signifikant war, wurde in einem weiteren Schritt mittels Wilcoxon-Test getestet, inwieweit an den einzelnen Tagen während Chemotherapie signifikante Unterschiede zwischen den Patienten mit kompletter Remission und Patienten ohne komplette Remission bestehen.

Außerdem wurde bei den AML-Patienten getestet, ob eine Korrelation zwischen den Nukleosomenkonzentrationen und den Leukozytenwerten an den Tagen 1 und 2 besteht sowie bezüglich der prozentualen Differenz von Tag 2 zu Tag 1. Weitere Korrelationsberechnungen wurden durchgeführt zwischen den prätherapeutischen Nukleosomenwerten und der Fläche unter der Kurve von Tag 2-4 mit den Blastenwerten prätherapeutisch, an Tag 16 und dem prozentualen Blastenrückgang. Hierfür wurde der Spearman Rang-Korrelationskoeffizient berechnet.

Bei allen eingesetzten Methoden wurde ein p-Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant bewertet. Bei allen Kalkulationen wurde die Software von SAS angewendet (version 8.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Wertigkeit von Serummarkern bei Lymphomen

An der Studie nahmen 50 Lymphom-Patienten teil. Davon erreichten nach oben genannten Kriterien 25 Patienten eine komplette Remission. 28 der 50 Patienten hatten ein aggressives Non-Hodgkin-Lymphom, sieben ein indolentes NHL und elf einen Morbus Hodgkin. Vier Lymphom-Patienten konnten keiner dieser Gruppen eindeutig zugeteilt werden.

#### 5.1.1 Nukleosomen

Die Nukleosomen wurden bei allen Lymphom-Patienten vor den einzelnen Zyklen und meist täglich während des ersten Chemotherapiezyklus bestimmt. Der Wert von Zyklus 1 beziehungsweise Tag 1 war stets prätherapeutisch. Die Nukleosomenverteilung wurde zusätzlich vor den ersten vier Zyklen untersucht. Ebenso wurden die drei oben genannten Diagnosen-Gruppen hinsichtlich der Nukleosomen-Verteilung vor den einzelnen Zyklen und während der ersten Therapiewoche miteinander verglichen.

Unter Chemotherapie, die Apoptose auslöst, ist zu erwarten, dass bei erfolgreicher Therapie nach Absterben der Tumorzellen, die Nukleosomenwerte im Verlauf abfallen. Diese Hypothese bestätigte sich in einem kontinuierlichen Abfall der Nukleosomen vor den weiteren Zyklen [Abb. 2]. Diese Tendenz war in allen Untergruppen zu sehen. [Abb. 3]

Abbildung 2: Verteilung der Nukleosomen bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen

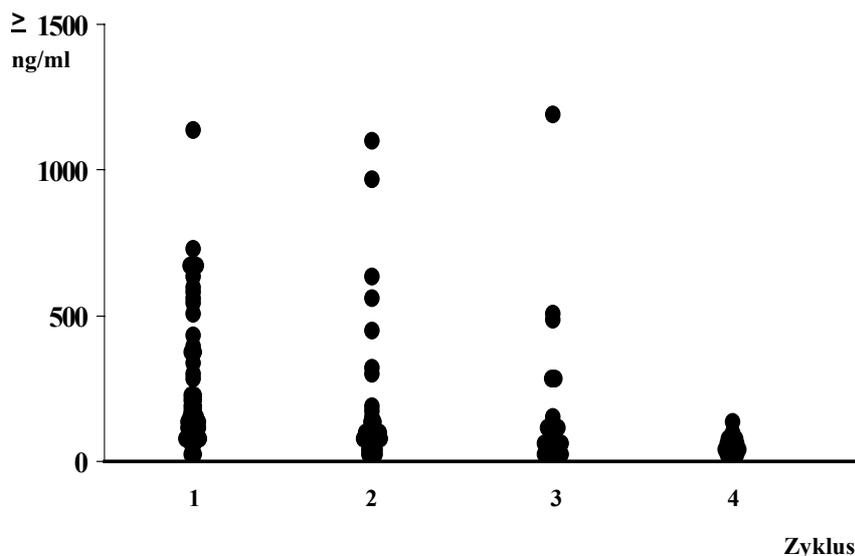
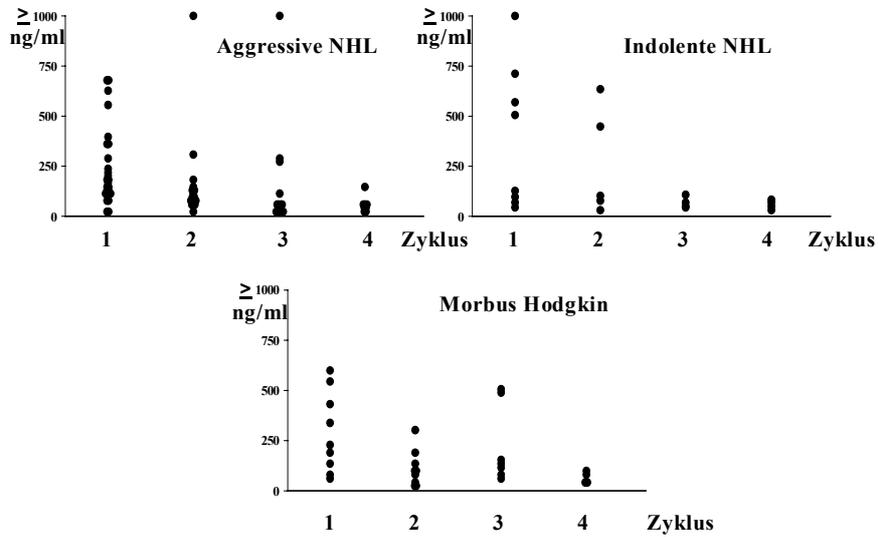


Abbildung 3: Verteilung der Nukleosomen bei Patienten mit aggressivem und indolentem NHL und MH vor den Zyklen



Diese abfallende Tendenz war ebenfalls bereits während des ersten Zyklus zu sehen. Auffallend war, dass an Tag 2 eine Tendenz zu mehr niedrigeren Werten bestand. Allgemein sanken die Werte bis zum Ende der Woche kontinuierlich ab [Abb. 4]. Beim Vergleich der Untergruppen wiesen die indolenten NHL im Durchschnitt etwas niedrigere Werte auf als die aggressiven NHL und die Patienten mit Morbus Hodgkin. Der Verlauf in den einzelnen Untergruppen war wiederum ähnlich. [Abb. 5]

Abbildung 4: Verteilung der Nukleosomen bei allen Lymphom-Patienten (n=50) während des 1. Zyklus

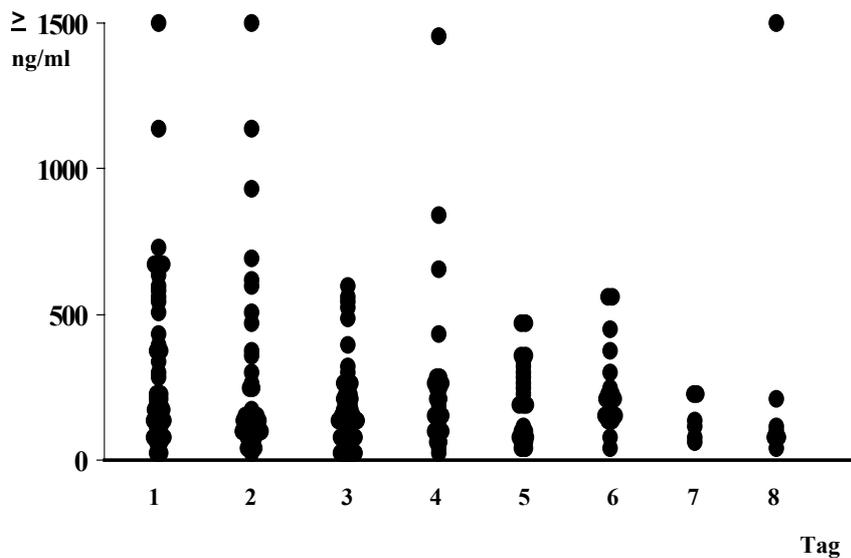
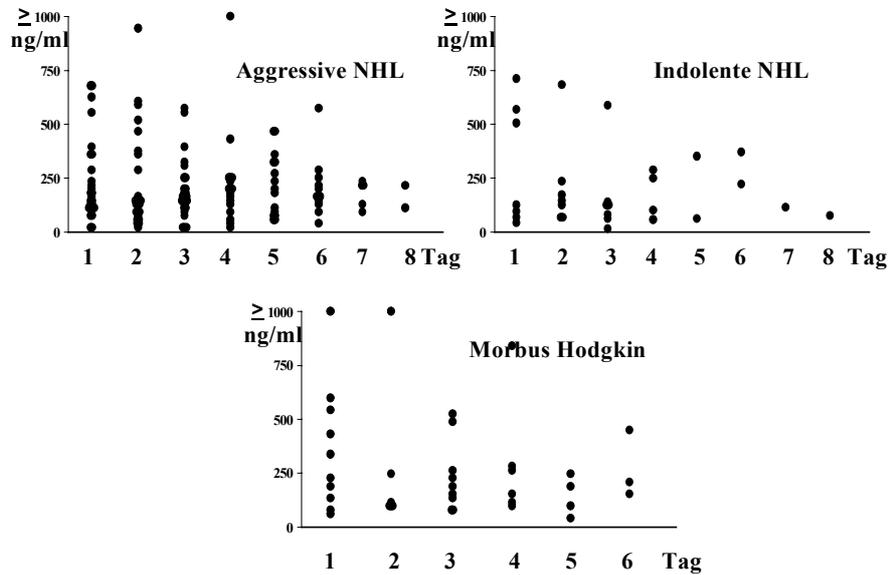


Abbildung 5: Verteilung der Nukleosomen bei Patienten mit aggressiven und indolenten Lymphomen und Morbus Hodgkin während des 1. Zyklus

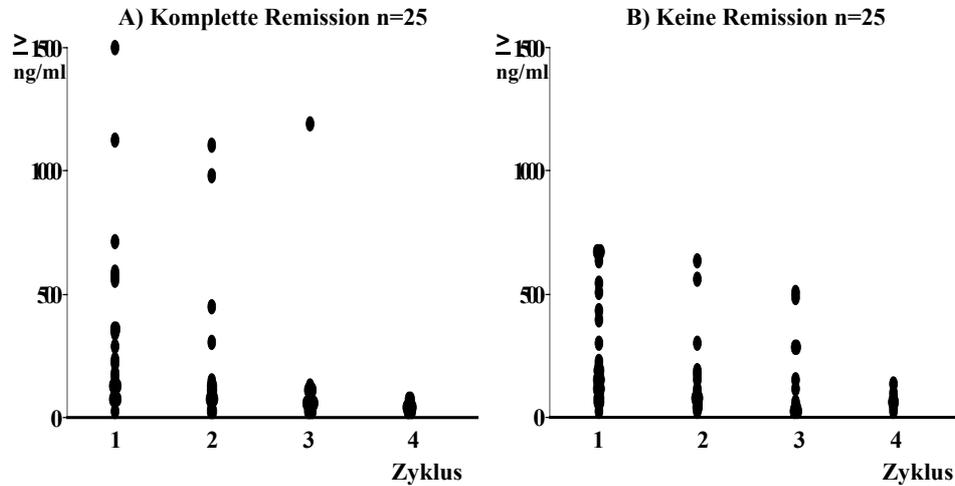


Bei den Lymphomen gab es zwölf Patienten, die vor jedem Chemotherapiezyklus eine Vorphase mit dem Antikörper Rituximab bekamen. Bei acht von diesen zwölf Patienten wurde ein prätherapeutischer Wert vor dieser Vorphase (= Tag 0) gemessen, mit der Frage, ob bereits dieser Antikörper Auswirkung auf die Nukleosomen hat. An Tag 1, einen Tag nach Applikation von Rituximab und kurz vor Gabe der Zytostatika, lagen die Nukleosomen bis auf eine Ausnahme höher als an Tag 0. Es zeigte sich somit eine Änderung in der Nukleosomenverteilung durch Rituximab.

Die Fragestellung der Studie ist, ob die Nukleosomen frühzeitig in der Lage sind, das Therapieansprechen anzuzeigen. Zu erwarten wäre bei erfolgreichem Therapieansprechen mit Absterben der Tumorzellen initial ein Anstieg der Nukleosomen und anschließend ein deutlicher Abfall. Dagegen wäre bei fehlendem Therapieansprechen mit einer geringeren Zelltodrate und somit mit niedrigeren Nukleosomenwerten zu rechnen.

Es zeigte sich, dass die Nukleosomen sowohl in der Gruppe mit kompletter Remission als auch in der Gruppe ohne Remission vor den einzelnen Zyklen deutlich abfielen [Abb. 7]. Signifikante Unterschiede ergaben sich nicht. [Tabelle 20]

Abbildung 7: Verteilung der Nukleosomen im Serum zwischen allen Lymphom-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission vor den Zyklen

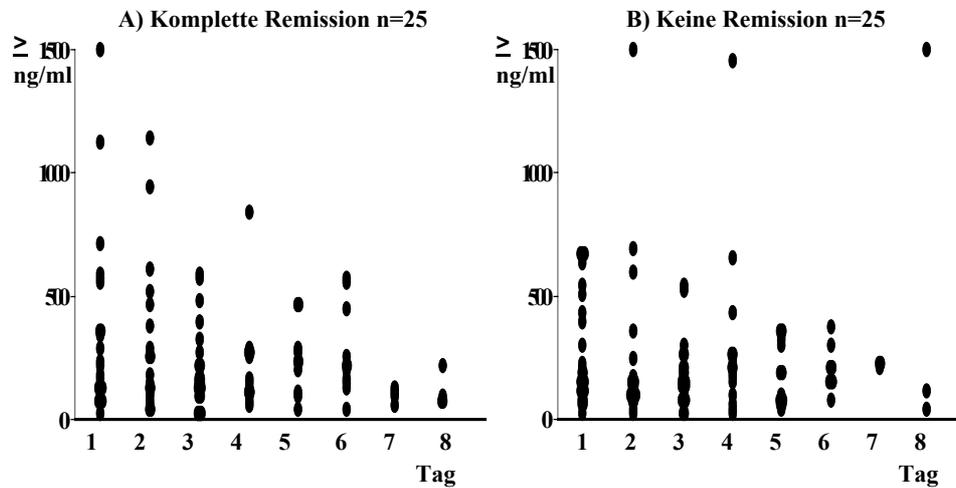


**Tabelle 20: Korrelation der Nukleosomen bezüglich des Therapieansprechens bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen**

Nukleosomen (ng/ml)							P-Wert
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
1. Zyklus	20	<b>185</b>	9 - 1120	24	<b>182</b>	9 - 671	1,000
2. Zyklus	17	<b>87</b>	9 - 1096	9	<b>68</b>	41 - 559	0,706
3. Zyklus	15	<b>57</b>	9 - 1189	9	<b>39</b>	9 - 475	0,835
4. Zyklus	11	<b>46</b>	13 - 111	5	<b>78</b>	38 - 131	0,089

Die Verteilung der prätherapeutischen Nukleosomenwerte zeigte keinen Unterschied hinsichtlich des Therapieerfolgs bei allen Lymphom-Patienten. Während bei den Patienten mit kompletter Remission die Nukleosomenwerte an Tag 2 nahezu konstant blieben, zeigten die Patienten ohne Remission an Tag 2 vorübergehend eine Tendenz zu niedrigeren Werten. An den weiteren Tagen war kein eindeutiger Unterschied sichtbar. [Abb. 8]

Abbildung 8: Verteilung der Nukleosomen im Serum zwischen allen Lymphom-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission während des 1. Zyklus



In der Gesamtvarianzanalyse ergab sich keine Abhängigkeit der Nukleosomen vom Therapieansprechen und von der Zeit während der ersten Therapiewoche. [Tabelle 21]

**Tabelle 21: Korrelation der Nukleosomen bezüglich des Therapieansprechens bei allen Lymphom-Patienten während des 1. Zyklus.**

Nukleosomen (ng/ml)							P-Wert
Abhängigkeit der Nukleosomen vom Therapieansprechen							0,181
Abhängigkeit der Nukleosomen von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)							0,499
Interaktion zwischen Therapieansprechen und Zeit							0,267
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Vorphase Tag 0	2	<b>135</b>	90 -179	6	<b>99</b>	66 -141	
Tag 1	20	<b>185</b>	9 - 1120	24	<b>182</b>	9 - 671	
Tag 2	18	<b>201</b>	31 - 1123	22	<b>105</b>	9 - 2047	
Tag 3	20	<b>149</b>	12 - 585	22	<b>163</b>	9 - 542	
Tag 4	12	<b>131</b>	55 - 1446	16	<b>191</b>	18 - 1443	
Tag 5	9	<b>230</b>	33 - 461	11	<b>174</b>	25 - 344	
Tag 6/7/8	14	<b>167</b>	29 - 557	14	<b>206</b>	13 - 1831	

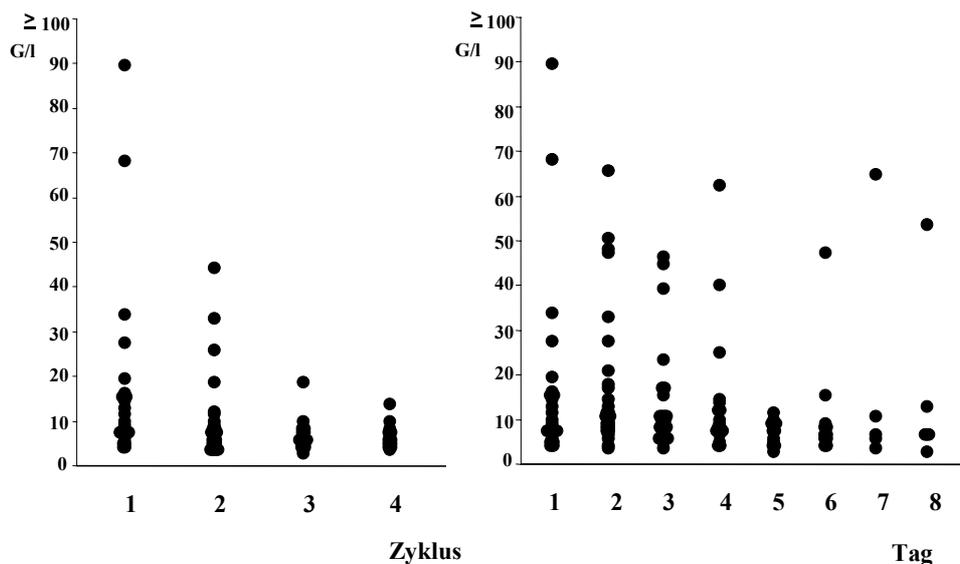
### 5.1.2 Leukozyten

Die Leukozyten können bei Lymphomen in zwei Richtungen pathologisch verändert sein. Durch Infiltration des Lymphoms in das Knochenmark werden die gesunden blutbildenden Zellen verdrängt und die Patienten leiden unter anderem an den Folgen der Leukopenie. In der Untergruppe der Chronisch Lymphatischen Leukämie (CLL) dagegen überwiegt die Proliferation von B-Lymphozyten, so dass im Differentialblutbild eine Leukozytose mit hohem Lymphozytenanteil gemessen wird. Bei den untersuchten Patienten waren die Leukozyten prätherapeutisch meistens im Referenzbereich bis 11 G/l. Einige Patienten allerdings wiesen eine Leukozytose auf.

Nach Beginn der Chemotherapie ist mit einem Abfall der Leukozyten aufgrund der myelotoxischen Wirkung der Zytostatika zu rechnen. Während des Therapieverlaufs vor den einzelnen Zyklen war aufgefallen, dass die Leukozytenwerte, wie zu erwarten, abfielen. Die Anzahl derer mit starker Leukozytose nahm mit steigender Anzahl der Chemotherapiezyklen ab. Während anfänglich kaum ein Patient Werte unter 4 G/l hatte, sanken diese nun gelegentlich in diesen leukopenischen Bereich ab. [Abb. 9]

Während der ersten Therapiewoche zeigte sich zwei Tage nach Therapiestart an Tag 3 ein Abfall der Leukozytenwerte. Davor beobachtete man bei vielen Patienten einen Anstieg. Am Ende der Woche lagen nur noch bei wenigen Patienten Leukozytenwerte, die aus Routineblutabnahmen herangezogen wurden, vor. Bis auf eine Ausnahme waren konstant niedrigere Werte als zu Beginn zu erkennen. [Abb. 9]

**Abbildung 9: Verteilung der Leukozyten bei allen Lymphomen-Patienten vor den Zyklen und während des 1. Zyklus**



Bei der Unterscheidung nach dem Therapieansprechen, zeigte sich vor den weiteren Zyklen kein eindeutiger Unterschied zwischen den Patienten mit kompletter Remission und ohne Remission. Ihnen war gemeinsam, dass vor den späteren Zyklen die Leukozytenwerte niedriger waren. [Abb. 10, Tabelle 22]

Abbildung 10: Verteilung der Leukozyten zwischen allen Lymphom-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission vor den Zyklen

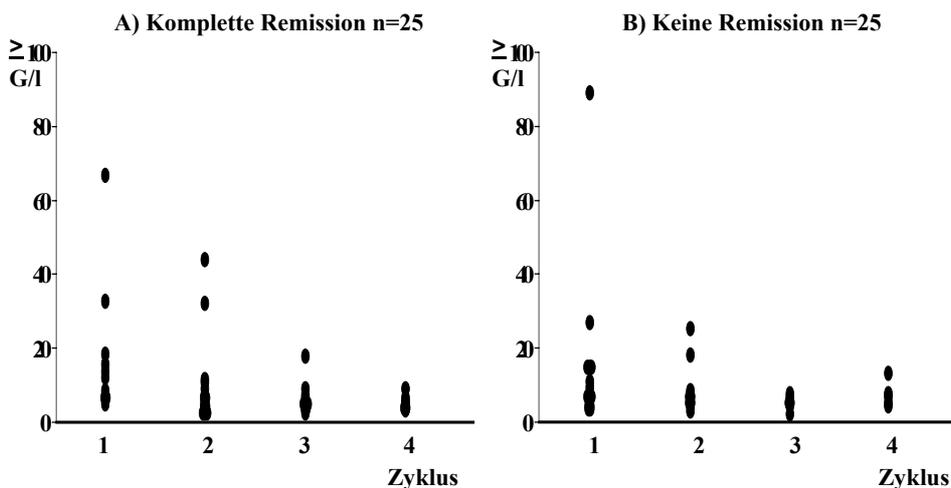
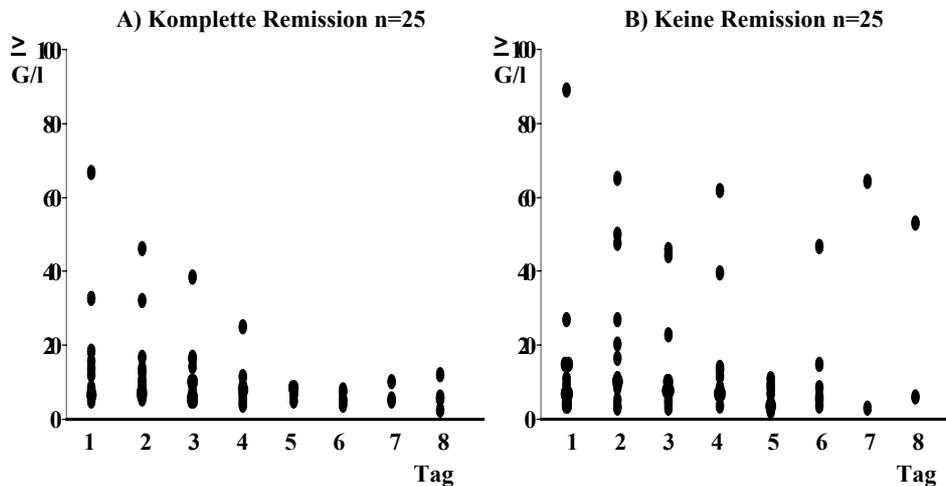


Tabelle 22: Korrelation der Leukozyten bezüglich des Therapieansprechens bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen.

Leukozyten (G/l)	P-Wert						
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
1. Zyklus	12	10,2	4,6 – 66,8	15	6,7	3,2 – 89,0	0,261
2. Zyklus	16	5,8	2,1 – 43,5	8	6,6	3,9 – 24,8	0,462
3. Zyklus	15	4,5	2,4 – 45,3	9	4,7	1,3 – 7,6	0,976
4. Zyklus	9	4,5	2,6 – 39,1	5	6,1	3,7 – 12,9	0,463

Die Patienten mit kompletter Remission zeigten einen Abfall der Leukozyten während der ersten Therapiewoche. Bei keinem dieser Patienten konnte am Ende der Woche eine starke Leukozytose nachgewiesen werden. Die Patienten ohne Remission wiesen hingegen mehr Ausnahmen bei auch abnehmender Tendenz auf. [Abb. 11]

Abbildung 11: Verteilung der Leukozyten zwischen allen Lymphom-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission während des 1. Zyklus



In der statistischen Auswertung waren die Leukozyten nicht vom Therapieansprechen abhängig. Aber es zeigte sich eine signifikante Beziehung zum zeitlichen Verlauf während des ersten Chemotherapiezyklus mit einem kontinuierlichen Abfall der Medianwerte. Zum Ende der Woche zeigten beide Gruppen niedrigere Werte. [Tabelle 23]

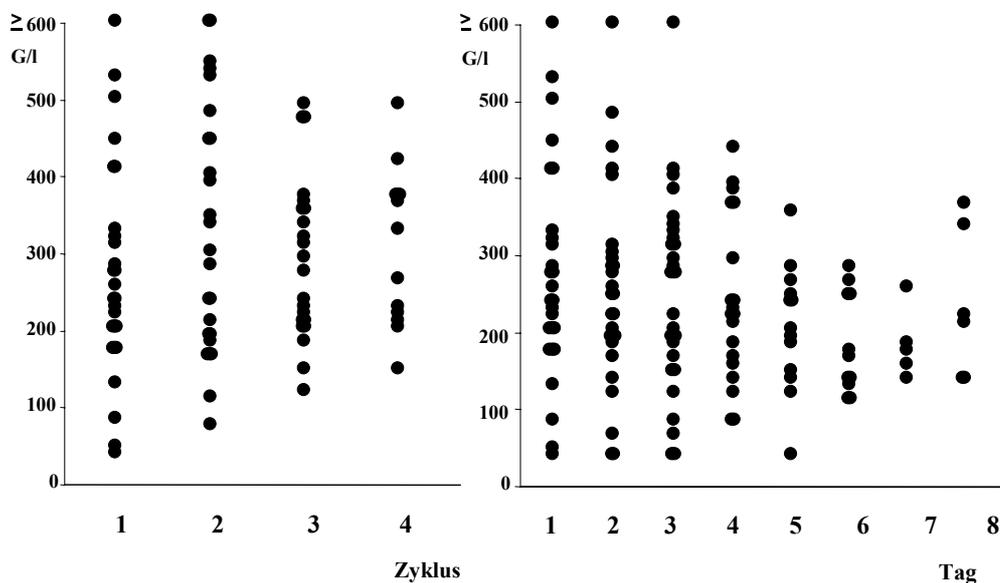
**Tabelle 23: Korrelation der Leukozyten bezüglich des Therapieansprechens bei allen Lymphom-Patienten während des 1. Zyklus.**

Leukozyten (G/l)							P-Wert
Abhängigkeit der Leukozyten vom Therapieansprechen							0,794
Abhängigkeit der Leukozyten von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)							<b>0,003</b>
Interaktion zwischen Therapieansprechen und Zeit							0,846
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Tag 1	12	<b>10,2</b>	4,6 – 66,8	15	<b>6,7</b>	3,2 – 89,0	
Tag 2	14	<b>9,5</b>	5,3 – 46,0	13	<b>10,1</b>	2,8 – 64,5	
Tag 3	16	<b>8,2</b>	4,7 – 38,0	13	<b>8,3</b>	2,4 – 45,9	
Tag 4	9	<b>7,2</b>	3,6 – 24,4	11	<b>7,7</b>	3,1 – 61,5	
Tag 5	5	<b>7,3</b>	4,6 – 8,4	8	<b>5,4</b>	1,6 – 10,2	
Tag 6/7/8	8	<b>5,2</b>	2,0 – 9,9	11	<b>5,7</b>	0,8 – 63,7	

### 5.1.3 Thrombozyten

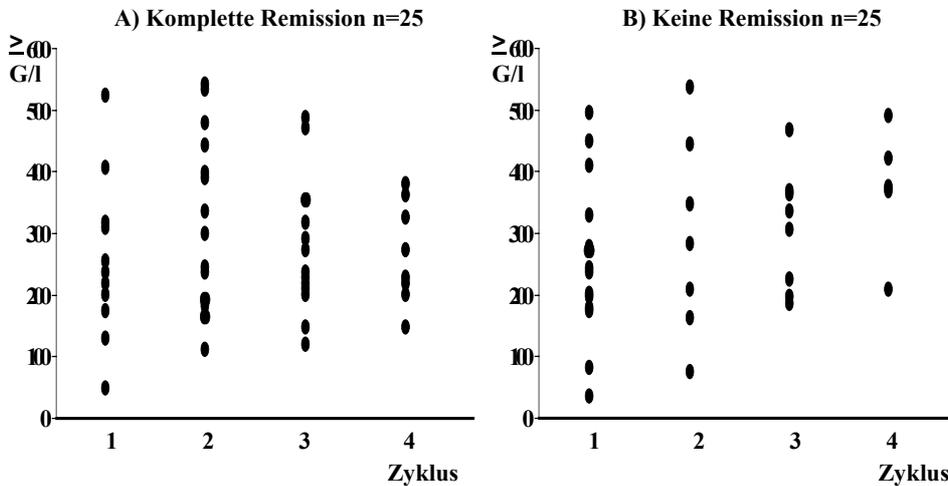
Die Bildung der Thrombozyten wird ebenfalls gehemmt, wenn eine Knochenmarksinfiltration vorliegt. Auch kann durch die Chemotherapie eine Thrombozytopenie induziert werden. Prätherapeutisch hatten in vorliegender Studie nur wenige Patienten Thrombozyten unterhalb des Referenzbereichs von 150 - 450 G/l. Bei der Beobachtung vor den Zyklen fiel auf, dass ab dem dritten Zyklus bei nur noch wenigen Patienten Thrombozytenwerte außerhalb des Referenzbereichs zu sehen waren. Selbiges galt für den Verlauf während des ersten Zyklus. [Abb. 12]

Abbildung 12: Verteilung der Thrombozyten bei allen Lymphomen-Patienten vor den Zyklen und während des 1. Zyklus



Hinsichtlich der Thrombozytenverteilung der beiden Gruppen zeigte sich bezüglich des Therapieansprechens kein eindeutiger Unterschied [Abb. 14]. Vor den einzelnen Zyklen hatten die Patienten ohne Remission tendenziell höhere Werte. [Abb. 13, Tabelle 24]

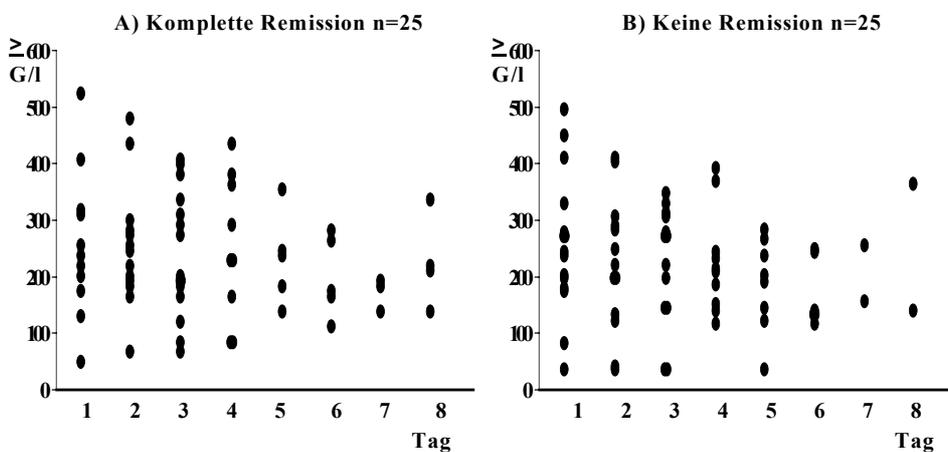
Abbildung 13: Verteilung der Thrombozyten zwischen allen Lymphom-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission vor den Zyklen



Tab. 24: Korrelation der Thrombozyten bezüglich des Therapieansprechens bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen.

Thrombozyten (G/l)							P-Wert
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
1. Zyklus	12	240	40 - 1022	15	238	31 - 495	0,807
2. Zyklus	16	264	110 - 540	8	396	161 - 664	0,168
3. Zyklus	15	271	112 - 484	9	302	71 - 466	0,905
4. Zyklus	9	221	107 - 372	5	374	203 - 491	<b>0,046</b>

Abbildung 14: Verteilung der Thrombozyten zwischen allen Lymphom-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission während des 1. Zyklus



Wie die Leukozyten zeigten auch die Thrombozyten eine signifikante Abhängigkeit von der Zeit. Eine Signifikanz bezüglich des Therapieansprechens gab es nicht. [Tabelle 25]

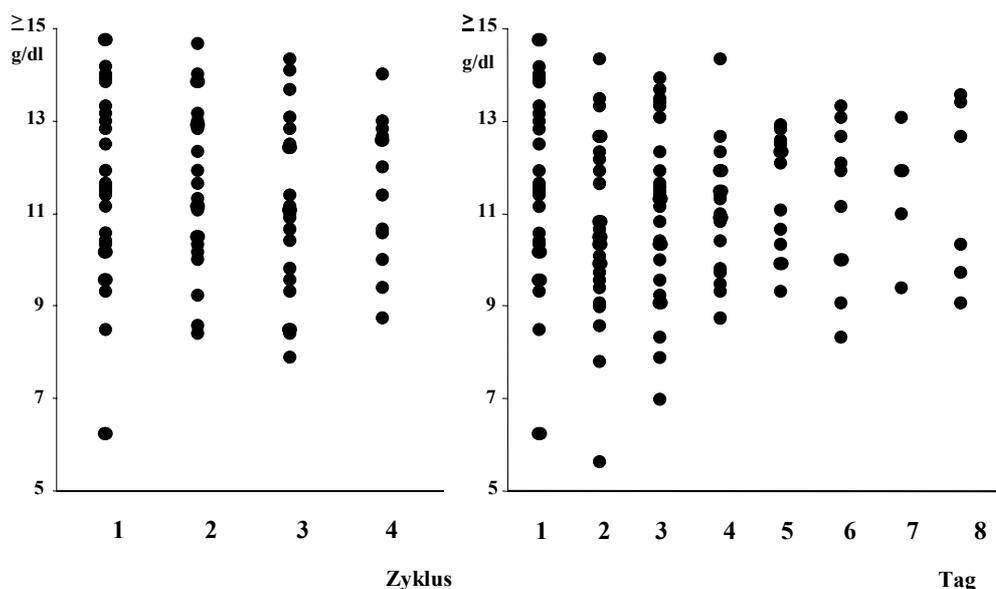
**Tabelle 25: Korrelation der Thrombozyten bezüglich des Therapieansprechens bei allen Lymphom-Patienten während des 1. Zyklus.**

Thrombozyten (G/l)						P-Wert	
Abhängigkeit der Thrombozyten vom Therapieansprechen						0,360	
Abhängigkeit der Thrombozyten von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)						<b>0,040</b>	
Interaktion zwischen Therapieansprechen und Zeit						0,665	
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Tag 1	12	<b>240</b>	40 - 1022	15	<b>238</b>	31 - 495	
Tag 2	14	<b>247</b>	62 - 1027	13	<b>220</b>	30 - 408	
Tag 3	16	<b>230</b>	63 - 945	13	<b>270</b>	32 - 346	
Tag 4	9	<b>221</b>	77 - 429	11	<b>204</b>	94 - 390	
Tag 5	5	<b>232</b>	133 - 349	8	<b>196</b>	30 - 281	
Tag 6/7/8	8	<b>219</b>	111 - 330	11	<b>156</b>	62 - 363	

#### 5.1.4 Hämoglobin

Durch die Knochenmarksdepression während der Chemotherapie zeigten sich gegen Ende der Woche eher niedrigere Hb-Werte. Die Bandbreite reichte prätherapeutisch von extrem niedrigen Werten bis zu 15 g/dl. Die Maximalwerte nahmen im Verlauf der Therapie sowohl während den Zyklen als auch während der ersten Therapiewoche leicht ab. [Abb. 15]

**Abbildung 15: Verteilung des Hämoglobins bei allen Lymphomen-Patienten vor den Zyklen und während des 1. Zyklus**



Der Vergleich der beiden Patientengruppen während den Zyklen ergab kaum Unterschiede. Bei den Patienten ohne Remission lagen geringfügig mehr Werte unterhalb von 9 g/dl. [Abb. 16, Tabelle 26]

Abbildung 16: Verteilung des Hämoglobins zwischen allen Lymphom-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission vor den Zyklen

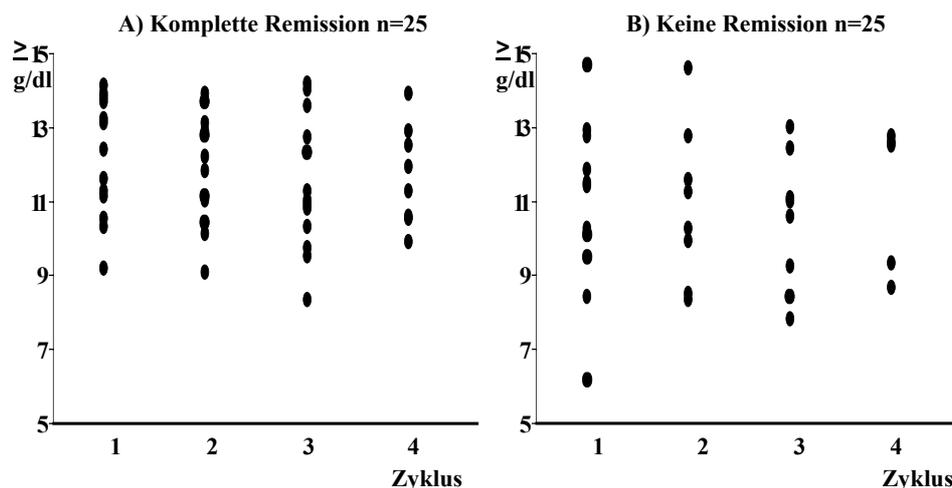
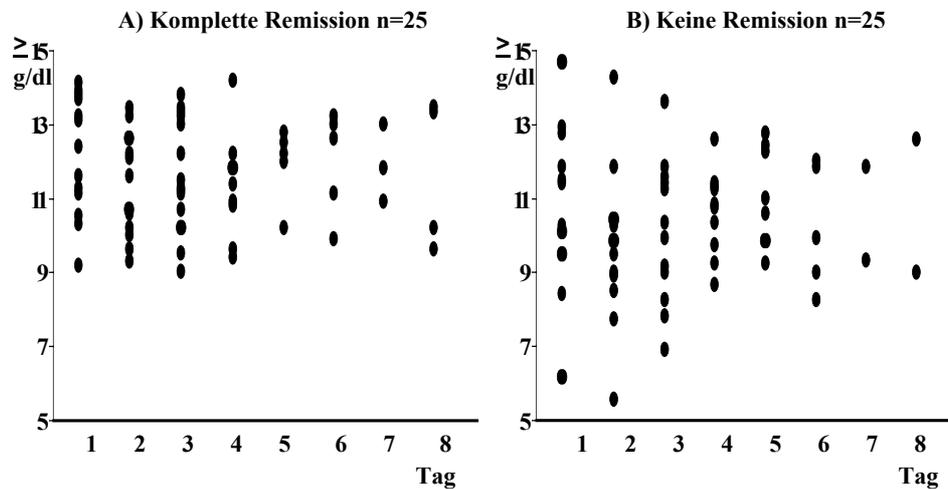


Tabelle 26: Korrelation des Hämoglobins bezüglich des Therapieansprechens bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen

Hämoglobin (g/dl)							P-Wert
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
1. Zyklus	8	12,0	9,2 – 14,1	9	10,2	6,1 – 14,7	0,136
2. Zyklus	6	12,0	9,1 – 13,9	6	10,7	8,3 – 14,6	0,188
3. Zyklus	8	11,3	8,3 – 14,2	5	10,6	7,8 – 13,0	0,144
4. Zyklus	4	11,3	8,8 – 13,9	3	12,5	8,6 – 12,7	0,947

Bei den Patienten mit kompletter Remission bewegten sich die Hämoglobin-Werte in einem konstant engen Bereich zwischen circa 9 und 14 g/dl. In der Gruppe der Patienten ohne Remission waren viele Werte unterhalb von 9 g/dl zu sehen, vor allem an den ersten drei Tagen. Außerdem nahmen im Verlauf die Maximalwerte deutlich ab. [Abb. 17]

Abbildung 17: Vergleich des Hämoglobins zwischen allen Lymphom-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission während des 1. Zyklus



Die Gesamtvarianzanalyse zeigte, dass die Hämoglobin-Werte bezüglich des Therapieansprechens signifikant unterscheiden, aber keine signifikante zeitliche Abhängigkeit besteht. Die Mediane der Patienten mit kompletter Remission lagen sowohl während der ersten Therapiewoche als auch vor den Zyklen oberhalb derer Patienten ohne Remission. In der univariaten Analyse war dieser Unterschied an Tag 2 und 3 signifikant. [Tabelle 27]

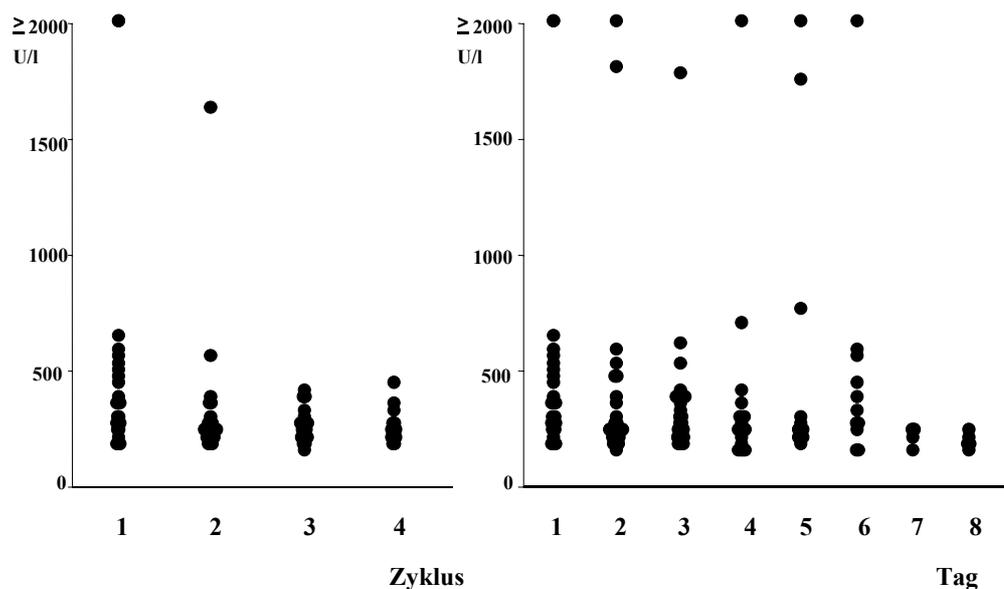
**Tabelle 27: Korrelation des Hämoglobins bezüglich des Therapieansprechens bei allen Lymphom-Patienten während des 1. Zyklus.**

Hämoglobin (g/dl)							P-Wert
Abhängigkeit des Hämoglobins vom Therapieansprechen							<b>0,015</b>
Abhängigkeit des Hämoglobins von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)							0,116
Interaktion zwischen Therapieansprechen und der Zeit							0,638
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Tag 1	8	<b>12,0</b>	9,2 – 14,1	9	<b>10,2</b>	6,1 – 14,7	0,136
Tag 2	7	<b>11,2</b>	9,3 – 13,4	9	<b>9,8</b>	5,5 – 14,2	<b>0,012</b>
Tag 3	9	<b>11,4</b>	9,0 – 13,8	9	<b>9,9</b>	6,9 – 13,6	<b>0,033</b>
Tag 4	3	<b>11,4</b>	9,4 – 14,2	8	<b>10,7</b>	8,6 – 12,6	0,171
Tag 5	5	<b>12,2</b>	10,2 – 12,8	5	<b>10,8</b>	9,2 – 12,7	0,240
Tag 6/7/8	5	<b>11,8</b>	9,6 – 13,2	7	<b>9,9</b>	8,2 – 12,6	0,136

### 5.1.5 LDH

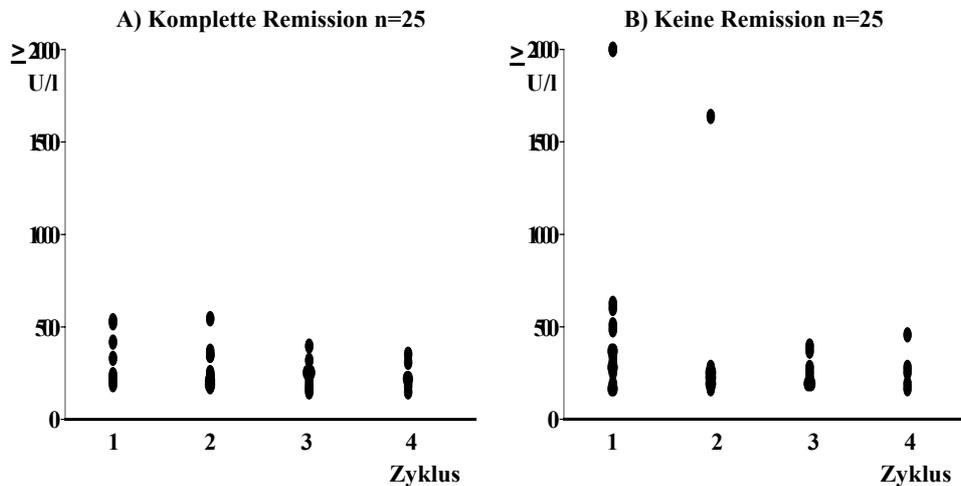
Vor Therapiebeginn hatten mehr als 2/3 der Patienten LDH-Werte über der 95%-Perzentile von 240 U/l in einem Bereich von bis zu ungefähr 650 U/l. Zwei Patienten hatten extrem hohe Werte von über 2000 U/l. Im Gegensatz zu den prätherapeutischen Werten war die LDH vor den weiteren Zyklen meist niedriger, vor allem zu Beginn des zweiten Zyklus. Trotz allem hatten einige Patienten Wertlagen oberhalb des Referenzbereichs. Während der ersten Woche waren an Tag 2 bereits vermehrt niedrigere LDH-Werte bestimmt worden. Gegen Ende der Woche war die LDH bei den noch gemessenen Patienten weitgehend im Referenzbereich. Bei den beiden Patienten mit sehr hoher LDH wurden an den Tagen 7 und 8, sowie vor den Zyklen 3 und 4, keine Werte mehr gemessen. [Abb. 18]

Abbildung 18: Verteilung der LDH bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen und während des 1. Zyklus



Der Kurs vor den Zyklen wies keine deutlichen Unterschiede bezüglich des Therapieansprechens auf. [Abb. 19, Tabelle 28]

Abbildung 19: Verteilung der **LDH** zwischen allen Lymphom-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission vor den Zyklen

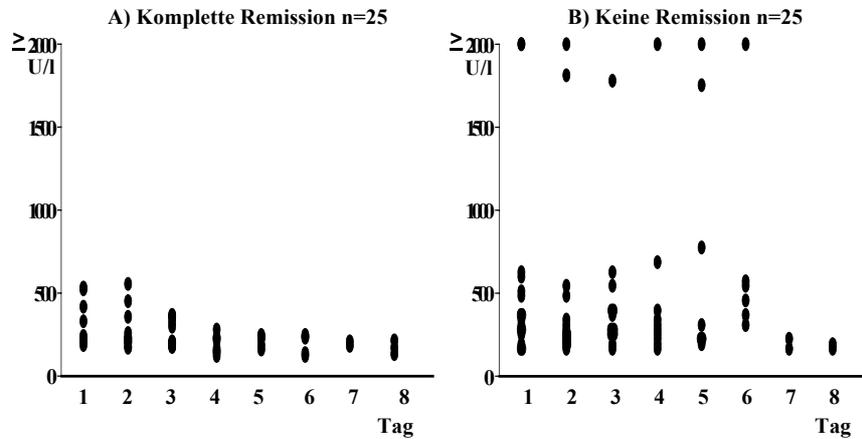


**Tabelle 28: Korrelation der LDH bezüglich des Therapieansprechens bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen.**

LDH (U/l)							P-Wert
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
1. Zyklus	8	282	187 - 529	16	333	149 - 2665	0,561
2. Zyklus	16	226	175 - 543	8	219	153 - 1620	0,603
3. Zyklus	12	249	145 - 396	9	218	166 - 371	0,972
4. Zyklus	9	215	149 - 382	5	252	157 - 428	0,894

Beide Patienten mit einer prätherapeutischen Laktatdehydrogenase von größer als 2000 U/l befanden sich in der Gruppe der Patienten ohne komplette Remission. Insgesamt wurden in dieser Gruppe höhere Werte bestimmt. Der Wochenverlauf zeigte bei kompletter Remission einen Abfall der LDH ab Tag 3 und anschließend konstant niedrige Normalwerte bis hin zum Ende der ersten Therapiewoche. Ein derartiger Abfall konnte bei den Patienten ohne Remission nicht beobachtet werden. Die LDH blieb bei vielen Patienten im pathologischen Bereich. Nur an Tag 7 und 8 gab es keine erhöhte Werte, was eventuell an der kleineren Patientenzahl an diesen Tagen lag. [Abb. 20]

Abbildung 20: Verteilung der LDH zwischen allen Lymphom-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission während des 1. Zyklus



Im Gesamtvarianztest fiel auf, dass die LDH signifikant bezüglich des Therapieansprechens unterscheidet. Von der Zeit war die LDH nicht abhängig und Interaktionen zwischen dem Therapieansprechen und der Zeit wurden nicht beobachtet. Wie bereits oben beschrieben ist in der folgenden Tabelle die unterschiedliche Bandbreite der beiden Gruppen zu sehen mit teilweise extrem hohen Werten von bis zu 3313 U/l bei den Lymphom-Patienten ohne komplette Remission. Prätherapeutisch waren die Mediane beider Gruppen im pathologischen Bereich, was sich im Laufe der Chemotherapie änderte. Bei kompletter Remission fielen die Medianwerte schnell in einen Bereich um 200 U/l ab und blieben innerhalb der Woche konstant. Auch bei den Patienten ohne Remission kam es zu einem anfänglichen Abfall des Medians bis zur Wochenmitte mit einem anschließenden Anstieg. Die univariate Analyse ergab somit an Tag 4 einen signifikanten Unterschied mit  $p = 0,023$ . [Tabelle 29]

**Tabelle 29: Korrelation der LDH bezüglich des Therapieansprechens bei allen Lymphom-Patienten während des 1. Zyklus.**

LDH (U/l)							P-Wert
Abhängigkeit der LDH vom Therapieansprechen							0,022
Abhängigkeit der LDH von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)							0,481
Interaktion zwischen Therapieansprechen und Zeit							0,129
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Tag 1	8	282	187 - 529	16	333	149 - 2665	0,561
Tag 2	12	224	168 - 555	14	247	137 - 3313	0,471
Tag 3	11	209	170 - 367	14	275	150 - 1755	0,139
Tag 4	8	187	119 - 279	11	289	138 - 3313	0,023
Tag 5	5	222	158 - 248	7	291	183 - 3036	0,194
Tag 6/7/8	7	207	118 - 249	11	300	143 - 2487	0,085

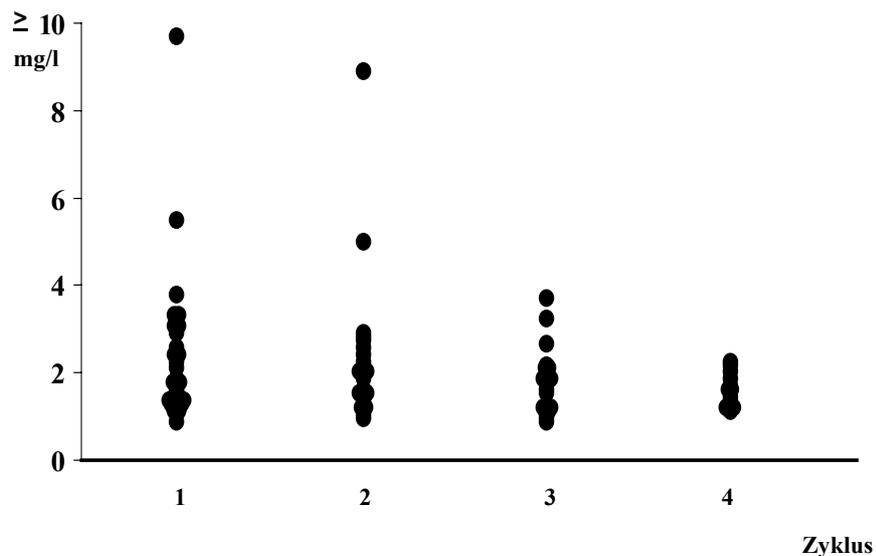
### 5.1.6 Weitere Parameter

Neben den täglich durchgeführten Bestimmungen der oben genannten Marker wurden weitere Routineparameter vor den einzelnen Therapiezyklen gemessen.

#### Beta-2-Mikroglobulin

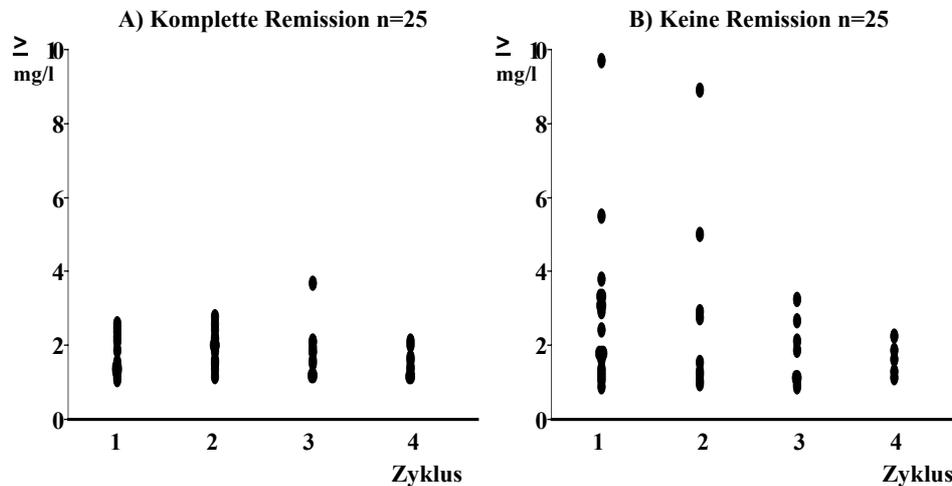
Im Serum beträgt die 95ste Perzentile von  $\beta$ 2-Mikroglobulin gesunder Personen 1,9 mg/l.  $\beta$ 2-Mikroglobulin wurde vor Therapie bestimmt sowie vor den drei folgenden Zyklen. Prätherapeutisch lagen die Werte bis auf zwei Ausnahmen in einem Bereich bis zu 4 mg/l. Vor dem zweiten Zyklus sanken die Werte auf ein Niveau von unter 3 mg/l. Der Abwärtstrend setzte sich fort und vor dem vierten Zyklus gab es nur wenige Patienten, die Werte über 2 mg/l aufwiesen und somit nicht im Referenzbereich gesunder Personen lagen. [Abb. 21]

Abbildung 21: Verteilung von  $\beta$ 2 Mikroglobulin bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen



Beim Vergleich nach dem Therapieansprechen war eindeutig zu sehen, dass bei kompletter Remission die Werte tendenziell niedriger waren, auch die beiden Ausnahmen mit stark erhöhten Werten waren in der Gruppe der Therapieversager. Vor Therapiebeginn gab es keinen Patienten mit vollständiger Remission, der  $\beta$ 2-Mikroglobulin von  $> 2,5$  mg/l aufwies. Gegen Ende der Therapie war kein Unterschied mehr zwischen den Gruppen festzustellen. [Abb. 22]

Abbildung 22: Verteilung von  $\beta$ 2-Mikroglobulin zwischen allen Lymphom-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission vor den Zyklen



Bei den statistischen Berechnungen war der prätherapeutische Median bei kompletter Remission lediglich um 0,4 mg/l niedriger als bei den Patienten ohne Remission. Die Bandbreite war bei kompletter Remission jedoch erheblich kleiner mit kaum pathologischen Werten. Prätherapeutisch ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $p=0,106$ ). Während den folgenden Zyklen glichen sich die  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Werte einander an. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. [Tabelle 30]

**Tabelle 30: Korrelation des  $\beta$ 2-Mikroglobulins bezüglich des Therapieansprechens bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen.**

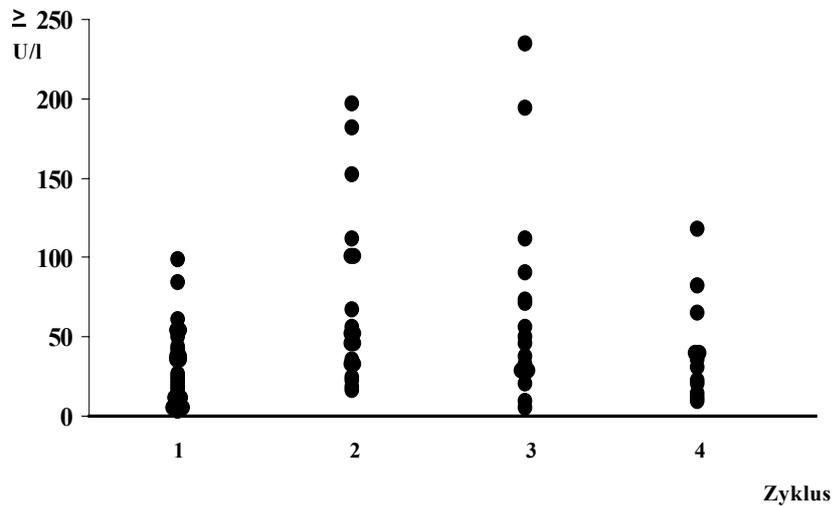
Beta2M (mg/l)							P-Wert
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
1. Zyklus	19	1,4	1,1 – 2,6	20	1,8	0,8 – 9,7	0,106
2. Zyklus	14	2,0	1,2 – 2,8	9	1,5	1,0 – 8,8	0,825
3. Zyklus	11	1,8	1,2 – 3,7	8	1,5	0,9 – 3,2	0,483
4. Zyklus	10	1,5	1,1 – 2,1	5	1,6	1,1 – 1,8	0,854

#### Thymidinkinase

Bei der Messung mit einem Radioimmunoassay (RIA) von Immunotech beträgt die 95ste Perzentile gesunder Personen 9 U/l. Zu Therapiebeginn wiesen die Patienten meist erhöhte Werte bis 100 U/l auf. Die Werte nahmen zunächst bei der Messung vor dem zweiten Zyklus zu. Erst ab dem dritten Zyklus war die Thymidinkinase bis auf zwei Ausnahmen wieder im gleichen Bereich wie prätherapeutisch. Vor dem vierten Zyklus lagen die Werte häufig

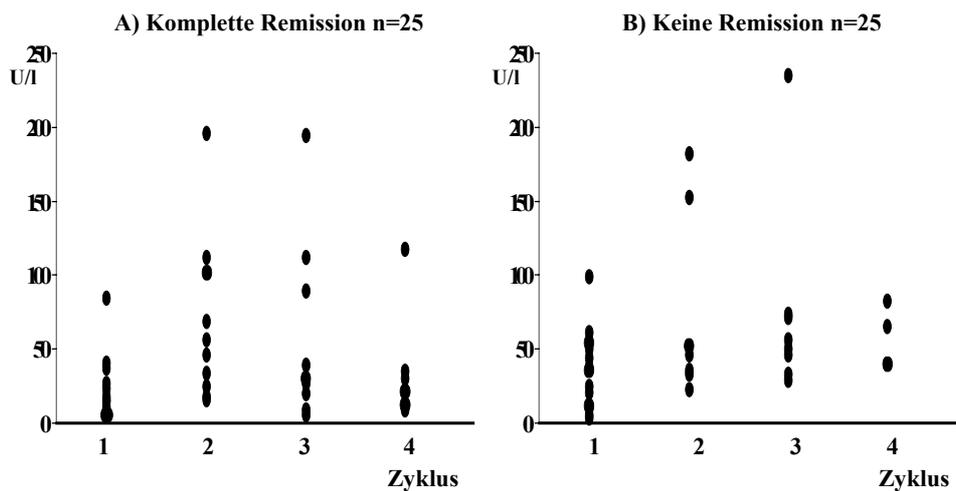
unterhalb von 50 U/l [Abb. 23]. Weiterhin wurde abermals nach dem Therapieansprechen unterschieden.

Abbildung 23: Verteilung der Thymidinkinase bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen



Bezüglich des Therapieansprechens war kein eindeutiger Unterschied in der Verteilung der Thymidinkinase während Chemotherapie zu sehen. [Abb. 24, Tabelle 31]

Abbildung 24: Verteilung der Thymidinkinase zwischen allen Lymphom-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission vor den Zyklen



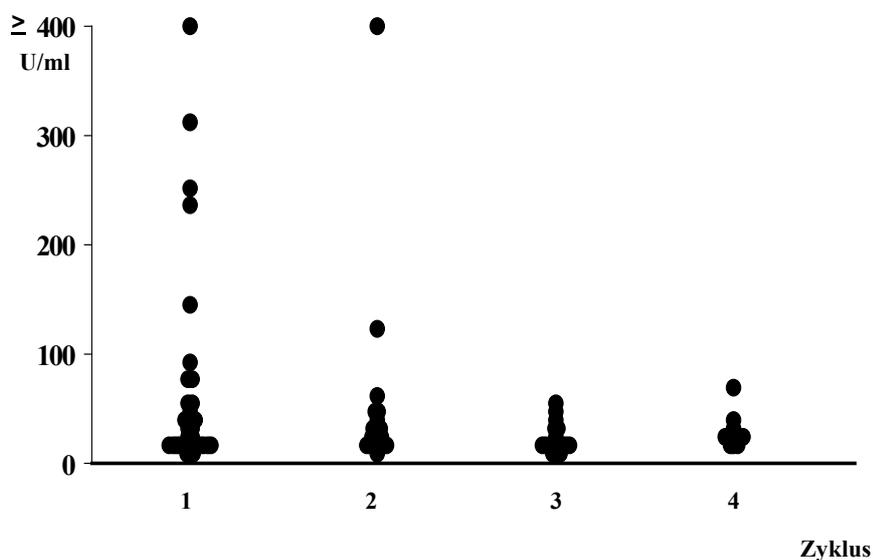
**Tabelle 31: Korrelation der Thymidinkinase bezüglich des Therapieansprechens bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen.**

Thymidinkinase (U/l)							P-Wert
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
1. Zyklus	14	<b>14,4</b>	4,4 – 83,5	16	<b>34,8</b>	4,3 – 98,3	0,088
2. Zyklus	11	<b>56,2</b>	15,8 - 196	8	<b>48,5</b>	21,9 - 180	1,000
3. Zyklus	10	<b>28,6</b>	3,9 - 193	8	<b>52,1</b>	28,7 - 235	0,155
4. Zyklus	9	<b>20,6</b>	9,1 - 166	4	<b>52,0</b>	38,3 – 80,9	0,143

### CA 125

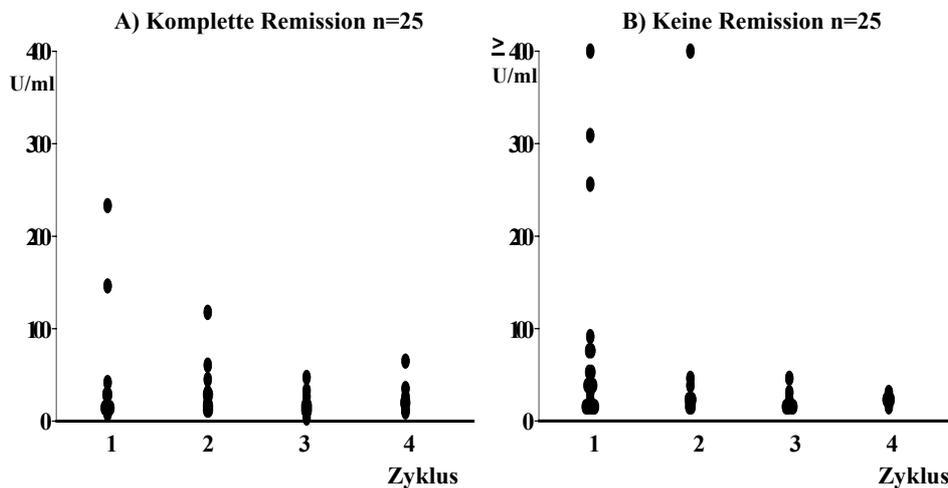
Ungefähr die Hälfte aller Lymphom-Patienten hatte prätherapeutisch Werte unterhalb der 95sten-Perzentile gesunder Frauen von 35 U/ml. In der anderen Hälfte gab es mehr Patienten mit CA 125-Werten bis zu 100 U/ml und noch einige wenige mit bis zu 400 U/ml. Im Verlauf zeigte sich eine abfallende Tendenz. [Abb. 25]

**Abbildung 25: Verteilung von CA 125 bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen**



Vor Applikation der Chemotherapie differierten die Gruppen mit kompletter Remission und ohne Remission in der Werteverteilung von CA125 gering. Wie zu erwarten, zeigten die Patienten mit kompletter Remission eher niedrigere Werte. Vor den weiteren Zyklen gab es kaum Unterschiede. [Abb. 26]

Abbildung 26: Verteilung von CA 125 zwischen allen Lymphom-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission vor den Zyklen



Wie die Beobachtungen oben bereits ergaben, unterschieden sich die Mediane lediglich prätherapeutisch. Eine Signifikanz zeigte sich weder vor Therapie noch im Verlauf. [Tabelle 32]

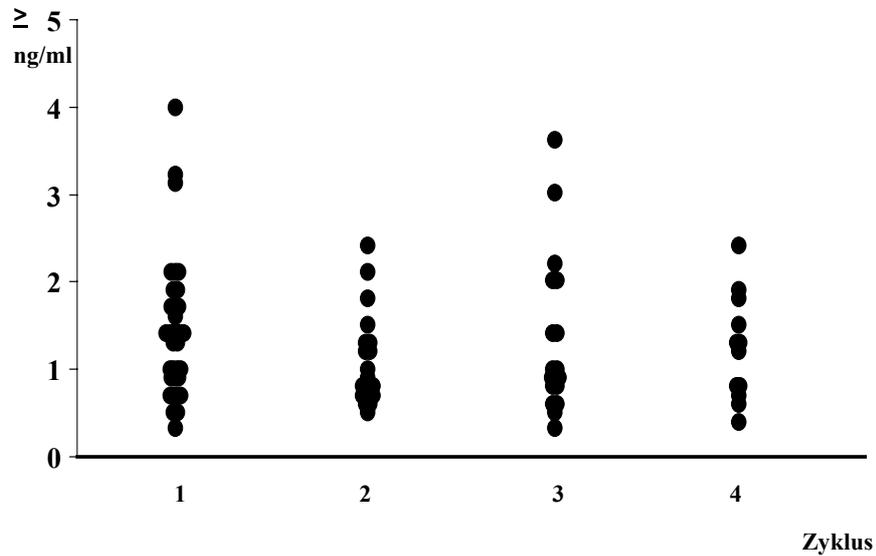
Tabelle 32: Korrelation des CA 125 bezüglich des Therapieansprechens bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen.

CA 125 (U/ml)							P-Wert
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
1. Zyklus	15	13,4	7,4 - 233	20	35,8	8,6 - 836	0,110
2. Zyklus	13	20,5	10,3 - 117	8	20,7	8,0 - 697	0,971
3. Zyklus	10	14,6	1,3 - 47,6	8	14,1	8,7 - 40,1	0,965
4. Zyklus	8	18,7	9,7 - 63,4	5	18,4	13,0 - 19,6	0,826

#### CYFRA 21-1

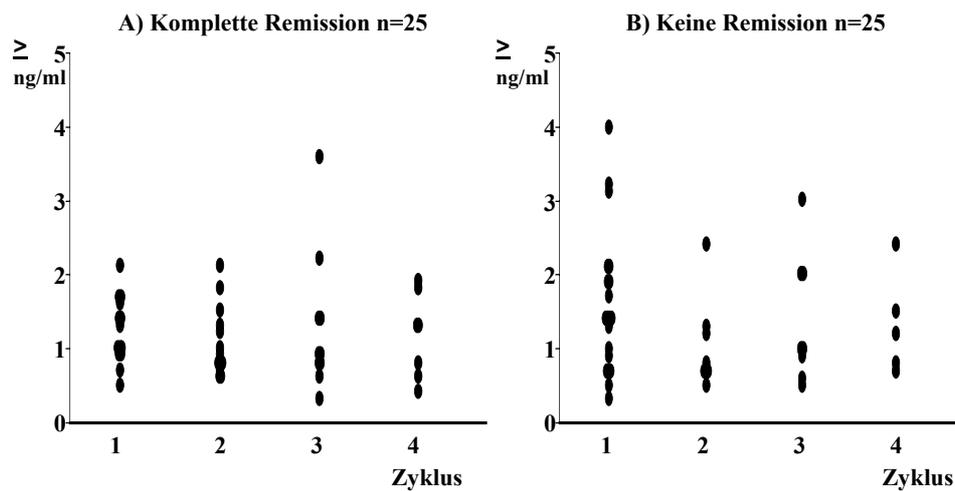
Die 95ste Perzentile gesunder Personen liegt bei 2,3 ng/ml. Die meisten Patienten hatten zu Anfang Werte bis zu 2 ng/ml, das Maximum war bei knapp über 4 ng/ml. Vor dem zweiten Zyklus verteilten sich die Werte bis ungefähr 2,5 ng/ml. Unter Therapie war kein eindeutiger Trend des Werteverlaufs zu sehen, auch vor den Zyklen drei und vier lagen die Werte im selben Bereich [Abb 27].

Abbildung 27: Verteilung von CYFRA 21-1 bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen



Bezüglich des Therapieansprechens unterschieden sich die Werteverteilungen kaum.

Abbildung 28: Verteilung von CYFRA 21-1 zwischen allen Lymphom-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission vor den Zyklen



Die univariaten Analysen vor den Zyklen ergaben kein signifikantes Ergebnis. Es zeigten sich keine eindeutigen Unterschiede [Tabelle 33].

**Tabelle 33: Korrelation des CYFRA 21-1 bezüglich des Therapieansprechens bei allen Lymphom-Patienten vor den Zyklen.**

CYFRA 21-1(ng/ml)							P-Wert
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
1. Zyklus	14	<b>1,2</b>	0,5 – 2,1	20	<b>1,4</b>	0,3 – 3,6	0,408
2. Zyklus	13	<b>0,9</b>	0,6 – 2,1	8	<b>0,8</b>	0,5 – 2,4	0,535
3. Zyklus	10	<b>0,9</b>	0,3 – 3,6	8	<b>1,0</b>	0,5 – 3,0	0,721
4. Zyklus	8	<b>1,1</b>	0,4 – 1,9	5	<b>1,2</b>	0,7 – 2,4	0,769

### Zusammenfassung

Bei allen Lymphomen zeigten die Nukleosomen keinen Effekt bezüglich des Therapieansprechens und der Zeit. Eine zeitliche Abhängigkeit wiesen die Leukozyten und Thrombozyten auf. Das Hämoglobin und die LDH unterschieden signifikant hinsichtlich des Therapieansprechens [Tabelle 34]. Die weiteren Tumormarker  $\beta$ 2-Mikroglobulin, Thymidinkinase, CA125 und CYFRA 21-1 unterschieden vor den einzelnen Zyklen nicht signifikant bezüglich des Therapieansprechens.

**Tabelle 34: Unterscheidung nach Therapieansprechen und Zeit**

	Effekt der Therapieantwort	Effekt der Zeit während Therapie	Interaktion zwischen Therapieansprechen und Zeit
<b>Nukleosomen</b>	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Leukozyten</b>	n.s.	<b>p = 0,003</b>	n.s.
<b>Thrombozyten</b>	n.s.	<b>p = 0,040</b>	n.s.
<b>Hämoglobin</b>	<b>p = 0,015</b>	n.s.	n.s.
<b>LDH</b>	<b>p = 0,022</b>	n.s.	n.s.

n.s. = nicht signifikant

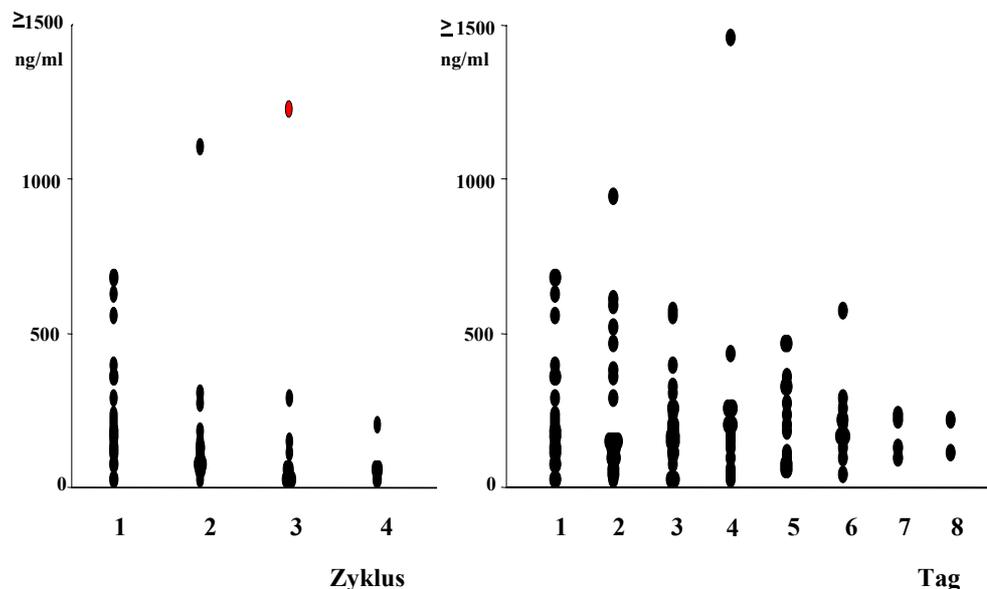
## 5.2 Wertigkeit von Serummarkern bei aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen

Aufgrund der großen Variabilität der Lymphome wurde zusätzlich die größte Untergruppe mit 28 Patienten mit aggressivem Non-Hodgkin-Lymphom bezüglich des Therapieansprechens getrennt betrachtet. Analysen wurden mit denselben Parametern wie bei allen Lymphomen durchgeführt: Während der ersten Woche und vor den weiteren Zyklen mit Nucleosomen, Leukozyten, Thrombozyten und Laktatdehydrogenase, und mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin, Thymidinkinase, CA 125 und CYFRA 21-1 nur vor den weiteren Zyklen.

### 5.2.1 Nucleosomen

Die Verteilung der Nucleosomen vor den einzelnen Zyklen sank bei den Patienten mit aggressivem NHL im Verlauf kontinuierlich ab. Bei allen Lymphomen war dieser Trend nicht so ausgeprägt vorhanden. Während der ersten Therapiewoche zeigten sich wie bei allen Lymphom-Patienten an Tag 2 gehäuft niedrige Nucleosomenwerte, sowie kontinuierlich abnehmende Werte im Wochenverlauf. Im Vergleich zu allen Lymphomen fiel auf, dass vor allem an den ersten vier Tagen weniger extrem hohe Ausnahmewerte zu beobachten waren. [Abb. 21]

Abbildung 29: Verteilung der Nucleosomen im Serum bei allen Patienten mit aggressivem NHL vor den Zyklen und während des 1. Zyklus



Auch bei den aggressiven Lymphomen sanken die Nukleosomenwerte unabhängig vom Therapieansprechen über die Zyklen hinweg [Abb. 30]. Insgesamt wiesen die Patienten mit aggressiven NHL niedrigere Werte auf als alle Lymphom-Patienten. [Tabelle 35]

Abbildung 30: Verteilung der Nukleosomen im Serum zwischen den aggressiven NHL-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission vor den Zyklen

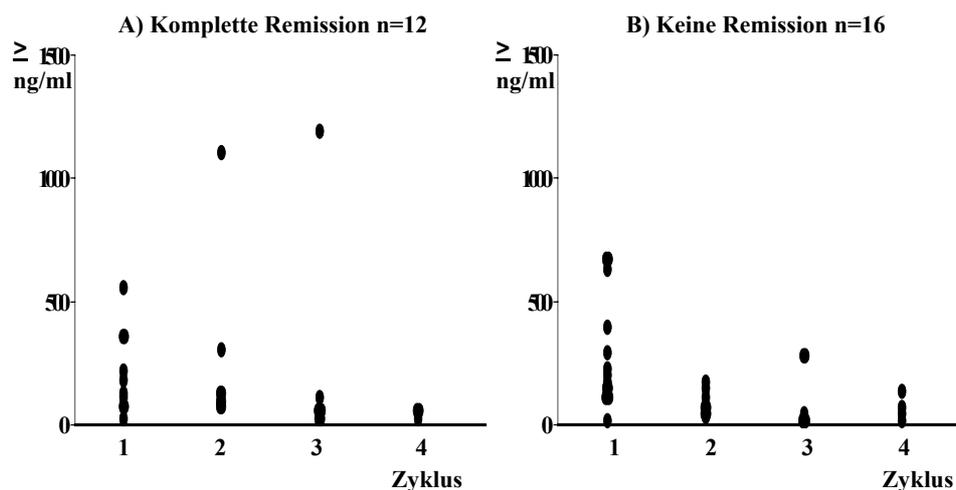
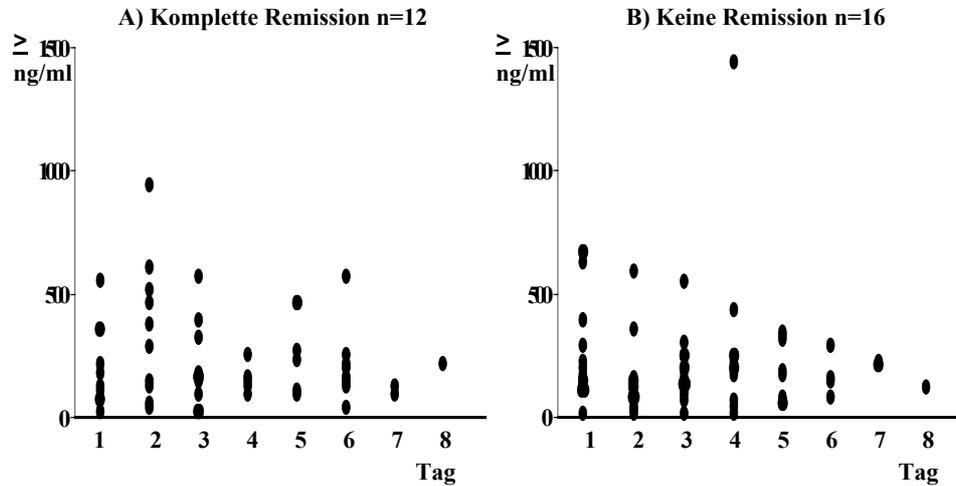


Tabelle 35: Korrelation der Nukleosomen bezüglich des Therapieansprechens bei den aggressiven NHL-Patienten vor den Zyklen.

Nukleosomen (ng/ml)							P-Wert
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
1. Zyklus	9	165	9 – 544	15	173	9 – 671	0,493
2. Zyklus	7	87	71 - 1096	6	57	41 – 167	<b>0,038</b>
3. Zyklus	8	51	18 - 1189	5	14	9 – 268	0,124
4. Zyklus	4	51	35 - 77	3	58	38 - 196	0,596

Im Vergleich zu den Patienten mit kompletter Remission fiel die Nukleosomenverteilung bei den Patienten ohne Remission im Verlauf der ersten Woche kontinuierlich ab. Bei der einzelnen Betrachtung des zweiten Tages fielen bei den Patienten mit kompletter Remission eher steigende Werte auf im Gegensatz zur anderen Gruppe mit überwiegend sinkenden Werten. Insgesamt war der Verlauf in beiden Gruppen ähnlich dem aller Lymphom-Patienten. [Abb. 31]

Abbildung 31: Verteilung der Nukleosomen im Serum zwischen den aggressiven NHL-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission während des 1. Zyklus



Die aggressiven Lymphome wiesen wie alle Lymphom-Patienten in der Gesamtvarianzanalyse kein signifikantes Ergebnis bezüglich des Therapieansprechens oder der Zeit auf. Die univariaten Analysen ergaben zwei signifikante p-Werte. Wie bei allen Lymphomen, aber hier bei den aggressiven Lymphomen deutlicher, bestand bereits 24 Stunden nach Therapiebeginn ein signifikanter Unterschied mit  $p = 0,004$  bezüglich des Therapieansprechens. Der Medianwert an Tag 2 bei kompletter Remission stieg um mehr als das Doppelte auf 371ng/ml an, während er bei den Patienten ohne Therapieansprechen auf 104 ng/ml bei ähnlichem Ausgangswert beider Gruppen abfiel. [Tabelle 36]

**Tabelle 36: Korrelation der Nukleosomen bezüglich des Therapieansprechens bei den aggressiven NHL-Patienten während des 1. Zyklus.**

Nukleosomen (ng/ml)							P-Wert
Abhängigkeit der Nukleosomen vom Therapieansprechen							0,280
Abhängigkeit der Nukleosomen von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)							0,861
Interaktion zwischen Therapieansprechen und der Zeit							0,063
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Vorphase Tag 0	0			4	<b>106</b>	98 – 141	
Tag 1	9	<b>165</b>	9 – 544	15	<b>173</b>	9 – 671	0,493
Tag 2	9	<b>371</b>	47 – 929	15	<b>104</b>	9 – 354	<b>0,004</b>
Tag 3	10	<b>161</b>	18 – 558	12	<b>175</b>	9 – 542	0,912
Tag 4	5	<b>142</b>	87 – 242	7	<b>191</b>	18 - 1443	0,562
Tag 5	6	<b>240</b>	93 – 461	6	<b>187</b>	49 – 602	0,520
Tag 6/7/8	8	<b>167</b>	29 – 557	8	<b>180</b>	13 – 285	1,000
Maximum 2-8	7	<b>461</b>	121 – 601	6	<b>286</b>	65 – 542	0,520
Fläche Tage 1-8	5	<b>990</b>	518 - 1728	5	<b>1301</b>	603 - 1631	1,000
Fläche 1-8/Tag	5	<b>165</b>	103 - 302	5	<b>186</b>	86 - 326	1,000

### 5.2.2 Weitere Parameter

Die Leukozytenwerte nahmen sowohl vor den einzelnen Zyklen als auch während der ersten Therapiewoche ab. Auch in der Untergruppe der aggressiven Lymphome gab es wie bei allen Lymphom-Patienten eine signifikante zeitliche Abhängigkeit der Leukozyten. [Tabelle 37]

Bezüglich der Thrombozyten zeigte die Gesamtvarianzanalyse bei den aggressiven Lymphomen keine zeitliche Abhängigkeit mehr. Signifikante Unterschiede hinsichtlich des Therapieansprechens bestanden zu keiner Zeit. [Tabelle 37]

Vor den Zyklen zeigten die Patienten mit aggressivem NHL weitgehend konstante Hämoglobin-Werte. Die Patienten ohne komplette Remission tendierten vor den einzelnen Zyklen deutlich zu niedrigeren Werten. Im Gegensatz zu allen Lymphom-Patienten war ein deutlicherer zeitlicher Verlauf während des ersten Zyklus zu sehen. Die Maximalwerte sanken bis zur Wochenmitte und nahmen anschließend wieder zu. Die Gesamtvarianzanalyse ergab sowohl eine Abhängigkeit des Hämoglobins vom Therapieansprechen als auch von der Zeit während der ersten Therapiewoche. [Tabelle 37]

Die LDH zeigte eine abfallende Tendenz über die Zyklen hinweg. Unterschiede zu dem Verlauf bei allen Lymphom-Patienten waren nicht festzustellen. Im Allgemeinen nahm, wie bei fast allen anderen Parametern auch zu sehen, die LDH-Werte während des ersten Zyklus ab. Auch bei der LDH war zu beobachten, dass die Werte bei den Patienten mit aggressiven NHL insgesamt etwas niedriger lagen als bei allen Lymphom-Patienten. [Tabelle 37]

Die Verteilung des Tumormarkers  $\beta$ 2-Mikroglobulin nahm vor den einzelnen Zyklen ab. Der Verlauf unterschied sich somit nicht von dem der aller Lymphom-Patienten. [Tabelle 37]

Die Verteilung der Thymidinkinase stieg zum zweiten Zyklus deutlich an und fielen bis zum vierten Zyklus wieder auf das Ausgangsniveau ab. Dieser Verlauf zeigte sich bei allen Lymphom-Patienten ähnlich. [Tabelle 37]

CA 125 nahm während des Therapieverlaufs deutlich ab. Die extrem hohen CA 125-Werte bei allen Lymphom-Patienten waren nicht in der Gruppe der aggressiven Lymphome. Insgesamt wiesen die Patienten mit kompletter Remission etwas niedrigere CA125-Werte auf als die Patienten ohne Remission. Dies kam bei den aggressiven NHL deutlicher zum Ausdruck. Signifikante Unterschiede bezüglich des Therapieansprechens bestanden nicht. [Tabelle 37]

In beiden Gruppen war der Abfall von CYFRA 21-1 im Therapieverlauf zu sehen. Eindeutige Unterschiede bezüglich des Therapieansprechens ergaben sich nicht. [Tabellen 37a und 37b]

**Tabelle 37a: Korrelation der weiteren Marker bezüglich des Therapieansprechens bei den aggressiven NHL-Patienten vor den Zyklen**

Leukozyten (G/l)							P-Wert
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
1. Zyklus	8	<b>10,2</b>	4,6 – 18,3	9	<b>6,7</b>	3,2 – 14,6	0,177
2. Zyklus	6	<b>4,2</b>	2,4 – 43,5	6	<b>6,6</b>	3,9 – 17,5	0,335
3. Zyklus	8	<b>4,4</b>	2,4 – 45,3	5	<b>4,5</b>	1,3 – 6,7	0,884
4. Zyklus	4	<b>6,1</b>	2,6 – 39,1	3	<b>6,1</b>	4,5 – 12,9	0,860
Thrombozyten (G/l)							P-Wert
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
1. Zyklus	8	<b>268</b>	40 – 523	9	<b>238</b>	31 – 495	0,500
2. Zyklus	6	<b>284</b>	182 – 528	6	<b>315</b>	161 – 664	0,689
3. Zyklus	8	<b>293</b>	211 - 484	5	<b>225</b>	182 - 466	0,421
4. Zyklus	4	<b>274</b>	107 - 372	3	<b>418</b>	203 - 491	0,377
Hämoglobin (g/dl)							P-Wert
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
1. Zyklus	8	<b>12,4</b>	10,5 – 14,1	9	<b>11,5</b>	8,4 – 14,7	0,229
2. Zyklus	6	<b>12,3</b>	11,0 – 13,7	6	<b>10,6</b>	8,3 – 12,7	0,093
3. Zyklus	8	<b>11,3</b>	8,3 – 14,0	5	<b>9,2</b>	8,4 – 12,4	0,271
4. Zyklus	4	<b>11,2</b>	8,8 – 12,9	3	<b>9,3</b>	8,6 – 12,6	0,596

<b>LDH (U/l)</b>							
	<b>Komplette Remission</b>			<b>Keine komplette Remission</b>			
	<b>N</b>	<b>Median</b>	<b>Bandbreite</b>	<b>N</b>	<b>Median</b>	<b>Bandbreite</b>	
1. Zyklus	7	<b>239</b>	187 – 516	10	<b>305</b>	171 – 2032	0,306
2. Zyklus	6	<b>228</b>	187 - 543	6	<b>196</b>	153 – 275	0,230
3. Zyklus	7	<b>247</b>	178 - 396	5	<b>218</b>	166 – 363	0,626
4. Zyklus	4	<b>258</b>	149 - 382	3	<b>246</b>	193 - 428	0,860
<b>B2M (mg/l)</b>							
	<b>Komplette Remission</b>			<b>Keine komplette Remission</b>			
	<b>N</b>	<b>Median</b>	<b>Bandbreite</b>	<b>N</b>	<b>Median</b>	<b>Bandbreite</b>	
1. Zyklus	9	<b>1,4</b>	1,1 – 2,6	12	<b>2,1</b>	1,0 – 9,7	0,051
2. Zyklus	5	<b>2,0</b>	1,3 – 2,8	6	<b>2,0</b>	1,0 – 8,8	0,927
3. Zyklus	5	<b>2,1</b>	1,2 – 3,7	4	<b>1,5</b>	0,9 – 2,7	0,539
4. Zyklus	3	<b>1,6</b>	1,3 – 2,0	3	<b>1,8</b>	1,1 – 2,2	1,000
<b>TK (U/l)</b>							
	<b>Komplette Remission</b>			<b>Keine komplette Remission</b>			
	<b>N</b>	<b>Median</b>	<b>Bandbreite</b>	<b>N</b>	<b>Median</b>	<b>Bandbreite</b>	
1. Zyklus	6	<b>31,5</b>	10,5 – 83,5	8	<b>35,8</b>	4,3 – 98,3	0,747
2. Zyklus	4	<b>106</b>	66,8 - 196	6	<b>51,5</b>	34,3 - 180	0,241
3. Zyklus	4	<b>63,1</b>	28,7 – 111	4	<b>63,2</b>	28,7 - 235	1,000
4. Zyklus	2	<b>14,9</b>	9,1 – 20,6	2	<b>60,1</b>	39,3 – 80,9	0,245
<b>CA125 (U/ml)</b>							
	<b>Komplette Remission</b>			<b>Keine komplette Remission</b>			
	<b>N</b>	<b>Median</b>	<b>Bandbreite</b>	<b>N</b>	<b>Median</b>	<b>Bandbreite</b>	
1. Zyklus	6	<b>28,6</b>	7,4 – 233	12	<b>37,0</b>	13,0 – 308	0,673
2. Zyklus	5	<b>18,4</b>	10,4 – 59,1	5	<b>21,2</b>	11,9 – 40,0	0,676
3. Zyklus	4	<b>13,2</b>	1,3 – 15,9	4	<b>21,2</b>	8,7 – 40,1	0,471
4. Zyklus	3	<b>18,8</b>	10,2 – 63,4	3	<b>19,6</b>	18,4 – 23,3	1,000
<b>CYFRA 21-1 (ng/ml)</b>							
	<b>Komplette Remission</b>			<b>Keine komplette Remission</b>			
	<b>N</b>	<b>Median</b>	<b>Bandbreite</b>	<b>N</b>	<b>Median</b>	<b>Bandbreite</b>	
1. Zyklus	5	<b>1,4</b>	1,0 – 2,1	12	<b>1,4</b>	0,7 – 3,2	1,000
2. Zyklus	5	<b>0,8</b>	0,7 – 1,8	5	<b>0,7</b>	0,5 – 2,4	0,392
3. Zyklus	4	<b>1,8</b>	0,8 – 3,6	4	<b>0,8</b>	0,5 – 3,0	0,312
4. Zyklus	3	<b>0,8</b>	0,6 – 1,3	3	<b>1,2</b>	0,7 – 1,5	0,663

**Tabelle 37b: Korrelation der weiteren Marker bezüglich des Therapieansprechens bei den aggressiven NHL-Patienten während des 1. Zyklus.**

Leukozyten (G/l)							P-Wert
Abhängigkeit der Leukozyten vom Therapieansprechen							0,695
Abhängigkeit der Leukozyten von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)							<b>0,004</b>
Interaktion zwischen Therapieansprechen und der Zeit							0,792
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Tag 1	8	<b>10,2</b>	4,6 – 18,3	9	<b>6,7</b>	3,2 – 14,6	
Tag 2	7	<b>8,1</b>	5,3 – 16,7	9	<b>9,3</b>	2,8 – 49,6	
Tag 3	9	<b>7,3</b>	4,7 – 15,7	9	<b>7,4</b>	2,4 – 9,8	
Tag 4	3	<b>6,3</b>	3,6 – 8,7	8	<b>7,3</b>	3,1 – 61,5	
Tag 5	4	<b>6,9</b>	4,6 – 8,2	5	<b>3,5</b>	1,6 – 8,7	
Tag 6/7/8	5	<b>5,5</b>	3,3 – 7,6	7	<b>5,7</b>	0,8 – 63,7	
Thrombozyten (G/l)							
Abhängigkeit der Thrombozyten vom Therapieansprechen							0,569
Abhängigkeit der Thrombozyten von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)							0,179
Interaktion zwischen Therapieansprechen und der Zeit							0,665
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Tag 1	8	<b>268</b>	40 – 523	9	<b>238</b>	31 – 495	
Tag 2	7	<b>193</b>	62 – 434	9	<b>246</b>	30 – 408	
Tag 3	9	<b>192</b>	63 – 395	9	<b>271</b>	32 – 346	
Tag 4	3	<b>363</b>	82 – 378	8	<b>221</b>	94 – 390	
Tag 5	4	<b>205</b>	133 – 349	5	<b>189</b>	30 – 281	
Tag 6/7/8	5	<b>170</b>	111 – 278	7	<b>156</b>	62 – 290	
Hämoglobin (g/dl)							
Abhängigkeit des Hämoglobins vom Therapieansprechen							<b>0,031</b>
Abhängigkeit des Hämoglobins von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)							<b>0,023</b>
Interaktion zwischen Therapieansprechen und der Zeit							0,247
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Tag 1	8	<b>12,4</b>	10,5 – 14,1	9	<b>11,5</b>	8,4 – 14,7	0,229
Tag 2	7	<b>12,6</b>	10,7 – 13,4	9	<b>9,8</b>	7,7 – 14,2	<b>0,020</b>
Tag 3	9	<b>12,2</b>	10,2 – 13,4	9	<b>10,3</b>	6,9 – 13,6	0,133
Tag 4	3	<b>11,4</b>	9,6 – 11,8	8	<b>10,8</b>	9,2 – 12,6	0,682
Tag 5	5	<b>12,1</b>	10,2 – 12,8	5	<b>10,6</b>	9,8 – 12,7	0,539
Tag 6/7/8	5	<b>12,6</b>	9,9 – 13,2	7	<b>9,9</b>	8,2 – 11,8	<b>0,049</b>

LDH (U/l)						
Abhängigkeit der LDH vom Therapieansprechen						0,068
Abhängigkeit der LDH von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)						0,368
Interaktion zwischen Therapieansprechen und der Zeit						0,151
	Komplette Remission			Keine komplette Remission		
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite
Tag 1	7	<b>239</b>	187 – 516	10	<b>305</b>	171 – 2032
Tag 2	6	<b>215</b>	168 – 449	10	<b>247</b>	170 – 1784
Tag 3	7	<b>295</b>	170 – 367	10	<b>266</b>	193 - 1755
Tag 4	2	<b>153</b>	141 – 164	9	<b>289</b>	186 – 675
Tag 5	4	<b>208</b>	158 – 248	5	<b>291</b>	198 – 1726
Tag 6/7/8	5	<b>229</b>	118 – 249	7	<b>209</b>	143 – 558

### Zusammenfassung

Wie bei allen Lymphomen ergab die Gesamtvarianzanalyse der Nukleosomen keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich des Therapieansprechens. Lediglich das Hämoglobin unterschied zwischen den Ansprechgruppen signifikant, und zeigte eine signifikante zeitliche Veränderung, wie auch die Leukozyten. [Tabelle 38]

**Tabelle 38: Unterscheidung nach Therapieansprechen und Zeit**

	Effekt der Therapieantwort	Effekt der Zeit während Therapie	Interaktion zwischen Therapieansprechen und Zeit
<b>Nukleosomen</b>	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Leukozyten</b>	n.s.	<b>p = 0,004</b>	n.s.
<b>Thrombozyten</b>	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Hämoglobin</b>	<b>p = 0,031</b>	<b>p = 0,023</b>	n.s.
<b>LDH</b>	n.s.	n.s.	n.s.

n.s. = nicht signifikant

### 5.3 Wertigkeit von Serummarkern bei akuter myeloischer Leukämie

An der Studie nahmen insgesamt 25 Patienten mit akuter myeloischer Leukämie teil. Die AML-Patienten wurden nach dem Therapieansprechen in zwei Gruppen aufgeteilt, in die mit kompletter Remission und die Patienten ohne komplette Remission. 18 von den insgesamt 25 Patienten wiesen nach Induktionstherapie eine komplette Remission auf. Bei diesen Patienten lag der Blastenanteil im Knochenmark nach Therapie bei < 5%, ebenso waren im peripheren Blut keine Blasten mehr nachweisbar. Die restlichen sieben Patienten erreichten keine komplette Remission und vier Patienten davon verstarben während der Phase der therapieinduzierten schweren Knochenmarkshypoplasie. [Tabelle 39]

**Tabelle 39: Staging bei AML-Patienten anhand des Prozentanteils der Knochenmark-Blasten im Verlauf.**

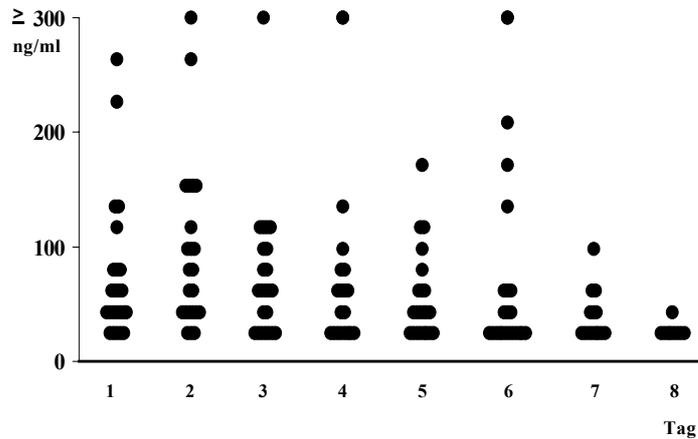
Patient	KM-Blasten - Prätherapeutisch	KM-Blasten an Tag 16	Staging
1	68%	0%	CR
2	90%	0%	CR
3	87%	0%	CR
4	75%	0%	CR
5	79%	60%	CR
6	7%	0%	CR
7	22%	12%	CR
8	75%		CR
9	39%	0%	CR
10	11%	0%	CR
11	48%	4%	CR
12	80%	10%	CR
13	80%	8%	CR
14	74%	0%	CR
15	75%	0%	CR
16	22%	19%	CR
17	60%	14%	CR
18	70%	0%	CR
19	74%	72%	PD
20	84%		PD
21	25%	2%	PD
22	93%	15%	PD (+)
23	46%	0%	PD (+)
24	30%	6%	PD (+)
25	74%	0%	PD (+)

#### 5.3.1 Nukleosomen

Zytostatika führen zu apoptotischem Zelltod und somit zur Freisetzung von Nukleosomen in die Zirkulation. Bei erfolgreicher Therapie ist somit mit einem Anstieg der Nukleosomen im Serum während der Chemotherapie zu rechnen, sowie einem Abfall der Konzentrationen nach Elimination der Tumorzellen.

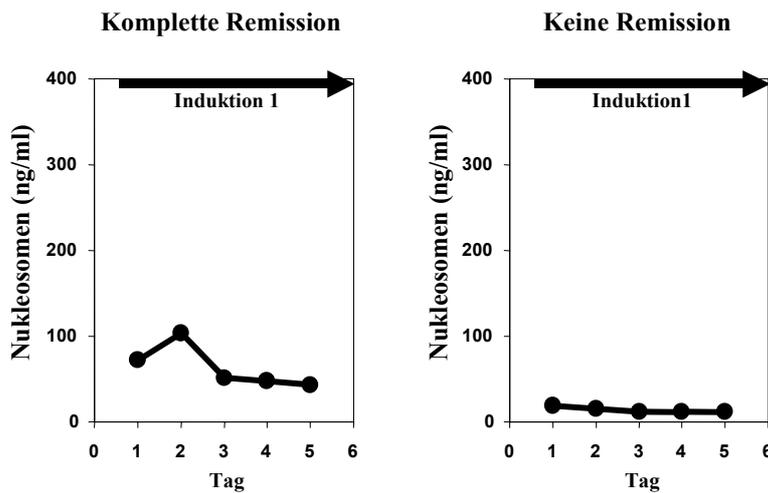
Die Betrachtung der Nukleosomenwerte während der ersten Chemotherapiewoche bei allen AML-Patienten zeigte ab Tag 2 eine abnehmende Tendenz bis zum Ende der ersten Woche.

Abbildung 32: Verteilung der Nucleosomen im Serum bei allen Patienten mit AML während des 1. Zyklus



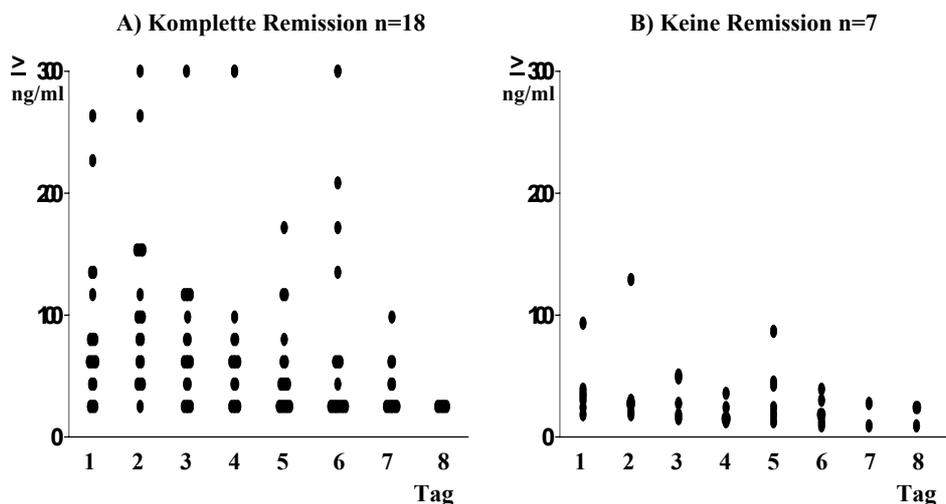
Die folgende Abbildung 33 zeigt zwei charakteristische Nucleosomenverläufe bei einem AML-Patienten mit kompletter Remission und einem Patienten ohne Remission. Bei dem Patienten mit kompletter Remission stieg die Nucleosomenkonzentration im Serum an Tag 2, das heißt innerhalb der ersten 24 Stunden nach Induktionstherapiebeginn, zunächst an und fiel im Anschluss daran bis zum Ende der Woche unterhalb des Ausgangswertes. Der Patient ohne Remission wies schon vor Therapiebeginn einen niedrigeren Ausgangswert auf und zeigte im Verlauf der Woche keine wesentliche Änderung mit einer leicht abfallenden Tendenz.

Abbildung 33: Zwei charakteristische Verläufe der Nucleosomen während des 1. Zyklus der Induktionstherapie



In der Gesamtanalyse ließen sich im Vergleich der Patienten mit unterschiedlichem Therapieansprechen folgende Differenzen feststellen. Patienten mit kompletter Remission wiesen bis zu Tag 7 deutlich höhere Nukleosomenwerte auf. Besonders markant war dieser Unterschied an Tag 2. Bei Patienten mit kompletter Remission zeigte sich an Tag 2 bei 50% der Patienten (9 von 18) ein frühzeitiger Anstieg, während bei den Patienten ohne Remission die Werte sofort abfielen (6 von 7). Beiden Gruppen gemeinsam waren die niedrigen Werte am Ende der ersten Chemotherapiewoche. Aufgrund der hohen Ausgangswerte bei kompletter Remission, war bei diese Patienten während des Wochenverlaufs ein deutlich größerer Abfall der Medianwerte zu sehen als bei Patienten ohne Remission. [Abb. 34] (Siehe Einzelverläufe im Anhang)

**Abbildung 34: Verteilung der Nukleosomen zwischen den AML-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission während des 1. Zyklus**



Auch bei der Varianzanalyse aller Patienten mit kompletter Remission und ohne Remission bestätigten sich die oben beschriebenen Trends. Es zeigte sich eine signifikante Abhängigkeit zwischen den Nukleosomen und dem Therapieansprechen ( $p=0,017$ ). Bereits prätherapeutisch unterschieden sich die AML-Patienten bezüglich des Therapieansprechens signifikant voneinander mit einem wesentlich höheren Medianwert von 65,2 ng/ml bei kompletter Remission im Gegensatz zu den Patienten ohne Remission mit einem Medianwert von 30,3 ng/ml. Im weiteren Verlauf waren die Medianwerte bei kompletter Remission stets höher. Der deutlichste Unterschied war sofort nach Therapiebeginn an Tag 2 mit einem p-Wert von 0,012 zu sehen. Die univariate Analyse zeigte signifikante Unterschiede von Tag 1 bis Tag 4.

Ebenfalls zeigte sich während der Induktionstherapie eine signifikante Abhängigkeit der Nucleosomen von der Zeit ( $p=0,023$ ). Da es das Ziel ist, das Therapieansprechen möglichst frühzeitig zu beurteilen, wurde dies deutlicher quantifiziert, wenn die Differenz von Tag 2 zu Tag 1 in Prozent berechnet wurde. Die Patienten mit kompletter Remission zeigten bezüglich des Medians von 2,5% einen leichten Anstieg, während bei den Patienten ohne Remission die Nucleosomenkonzentrationen eher abfielen (Median -16,5%). Eine Unterscheidung bezüglich des Abfalls war nicht signifikant ( $p=0,259$ ). Da am Ende der ersten Woche alle Patienten niedrige Nucleosomenwerte aufwiesen, war eine Korrelation mit dem Therapieansprechen nicht mehr möglich. [Tabelle 40]

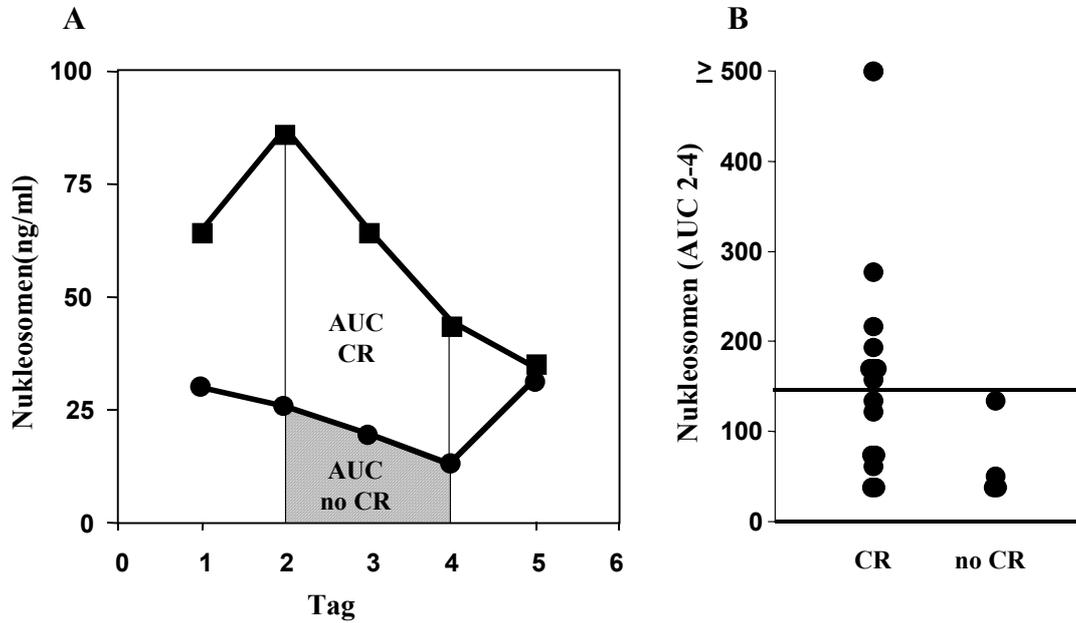
**Tabelle 40: Korrelation der Nucleosomen bezüglich des Therapieansprechens bei den AML-Patienten während des 1. Zyklus.**

Nucleosomen (ng/ml)							P-Wert
Abhängigkeit der Nucleosomen vom Therapieansprechen							<b>0,017</b>
Abhängigkeit der Nucleosomen von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)							<b>0,023</b>
Interaktion zwischen Therapieansprechen und Zeit							0,495
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Tag 1	15	<b>65,2</b>	22,3 – 267,1	7	<b>30,3</b>	16 – 90,9	<b>0,029</b>
Tag 2	18	<b>86,4</b>	21,7 – 807,7	6	<b>25,7</b>	17,7 - 128	<b>0,012</b>
Tag 3	18	<b>63,5</b>	11,4 – 657,8	6	<b>21,1</b>	12 – 50,3	<b>0,049</b>
Tag 4	16	<b>44,6</b>	9,7 – 613,8	5	<b>14,9</b>	12 - 36	<b>0,023</b>
Tag 5	16	<b>36,0</b>	12,6 – 154,4	6	<b>31,4</b>	12 – 86,3	0,484
Tag 6/7/8	18	<b>24,0</b>	9,2 – 2031,2	6	<b>16,6</b>	9,1 - 383	0,277
Fläche Tage 2-4	16	<b>154,9</b>	16,9 - 1339	4	<b>38,9</b>	30,3 - 132	<b>0,042</b>
Tag 2 – Tag 1 (%)	15	<b>2,5</b>	-76,5 – 304	6	<b>- 16,5</b>	- 35,3 – 40,9	0,259

Um die deutlichen Unterschiede der ersten Tage in ein integratives Maß zu fassen, wurde die Fläche unter der Kurve an den Tagen 2-4 (area under the curve, AUC 2-4) ohne den prätherapeutischen Wert von Tag 1 berechnet, um den unmittelbaren Therapieeffekt darzustellen.

Die folgende Abbildung 35 verdeutlicht anhand der Fläche unter der Kurve von Tag 2 bis 4 den Unterschied zwischen den beiden Ansprechgruppen. Die obere Kurve stellt die Medianwerte der Patienten mit kompletter Remission, die untere Kurve die Mediane der Patienten ohne Remission dar. Die Fläche bei Patienten mit kompletter Remission (AUC CR) war signifikant größer als bei Patienten ohne komplette Remission (AUC no CR) mit einem p-Wert von 0,042. In der DotPlot-Darstellung der einzelnen AUC-Werten ist ersichtlich, dass bei einer Spezifität von 100% für das Nicht-Erreichen einer Remission (bei einem Cutoff von 150 ng/ml) noch eine Sensitivität von 56% für das Ansprechen der Therapie zu finden war.

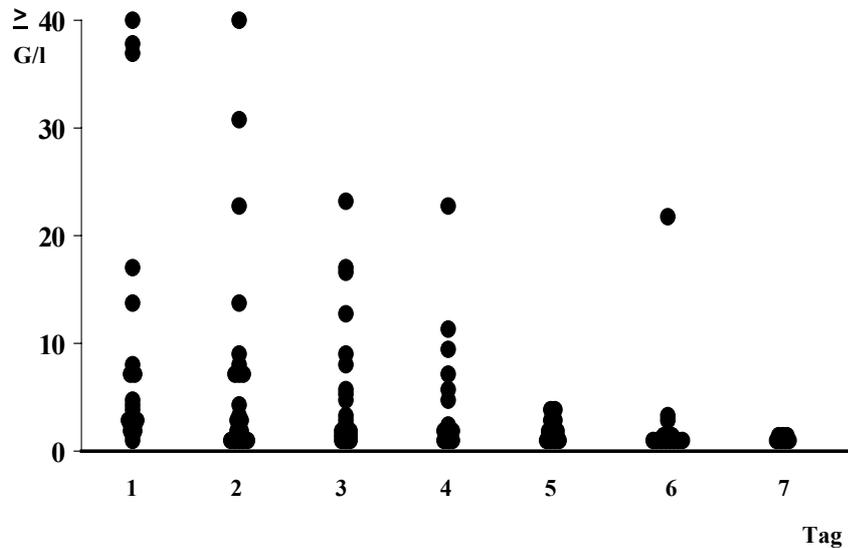
**Abbildung 35: Fläche unter der Kurve (AUC) der Nukleosomen während den Tagen 2-4 des 1. Zyklus der Induktionstherapie**



### 5.3.2 Leukozyten

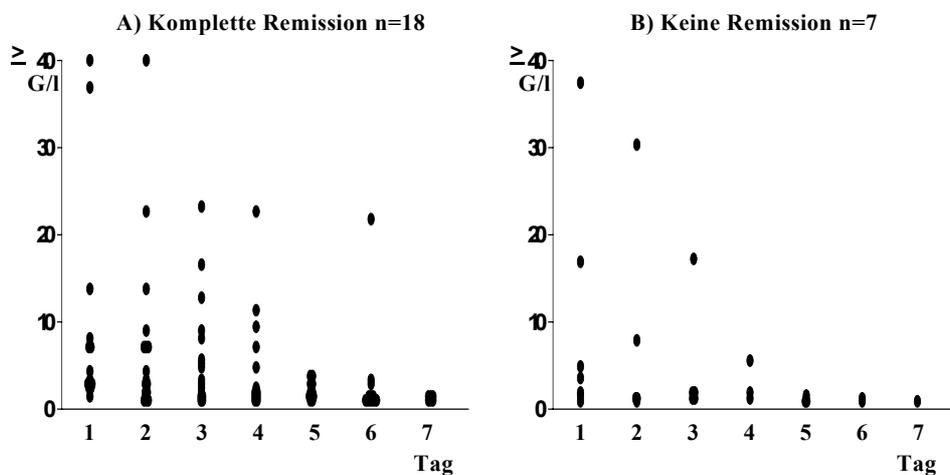
Aufgrund der myelotoxischen Wirkung der Zytostatika ist wiederum mit Leukopenie, Anämie und Thrombozytopenie als Folge zu rechnen. Bei der Leukozytenbestimmung der AML-Patienten während des ersten Chemotherapiezyklus fiel auf, dass die Leukozytenwerte innerhalb weniger Tage deutlich absanken. Am Ende der ersten Woche befanden sich fast alle Patienten in der Phase der Neutropenie, auch diejenigen, die prätherapeutisch eine Leukozytose aufwiesen. [Abb. 36]

Abbildung 36: Verteilung der Leukozyten bei allen AML-Patienten während des 1. Zyklus



Patienten mit vollständiger Remission hatten tendenziell höhere Leukozytenkonzentrationen im Vergleich zu den übrigen Patienten, vor allem während des Therapieverlaufs. Die Verteilung der Leukozyten war den Nukleosomen ähnlich. Außerdem wurde festgestellt, dass die Patienten mit kompletter Remission später in die Phase der Neutropenie fielen. Die Leukozyten blieben bis Tag 4 annähernd konstant und fielen dann rapide ab. Während die Patienten ohne Remission bereits an Tag 2 niedrigere Leukozytenwerte aufwiesen als vor Therapiebeginn. [Abb. 37]

Abbildung 37: Verteilung der Leukozyten zwischen den AML-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission während des 1. Zyklus



In der Gesamtvarianzanalyse zeigte sich, dass die Leukozyten sich nicht signifikant in Bezug auf das Therapieansprechen unterschieden ( $p = 0,193$ ), jedoch bestand eine hochsignifikante Abhängigkeit zwischen den Leukozyten und den einzelnen Tagen mit einem p-Wert von  $< 0,001$ . Eine Interaktion zwischen Therapieansprechen und Zeit bei den Leukozytenwerten an den einzelnen Tagen zeigte sich nicht ( $p = 0,914$ ). [Tabelle 41]

Die Medianwerte der Leukozyten hinsichtlich der beiden Patientengruppen belegten die oben gemachten Beobachtungen. Beide Gruppen starteten mit einem Leukozyten-Medianwert von 3,4 G/l. Während die Medianwerte an Tag 2 bei kompletter Remission zuerst leicht stiegen und ab Tag 4 bis zum Ende der Woche stark abfielen, sanken bei den Patienten ohne Remission die Medianwerte kontinuierlich auf den gemeinsamen Medianendwert von 0,9 G/l Leukozyten am Wochenende. Obwohl sich für die absoluten Werte keine Signifikanz zeigte, war der Abfall/Anstieg der Leukozyten von Tag 1 zu Tag 2 annähernd signifikant ( $p = 0,059$ ). Die Patienten ohne Remission zeigten einen wesentlich stärkeren Abfall der Leukozyten von Tag 1 zu Tag 2 mit einem Median von  $-35,4\%$  als die Patienten mit kompletter Remission mit einem Median von lediglich  $-1,4\%$ . [Tabelle 41]

**Tabelle 41: Korrelation der Leukozyten bezüglich des Therapieansprechens bei den AML-Patienten während des 1. Zyklus.**

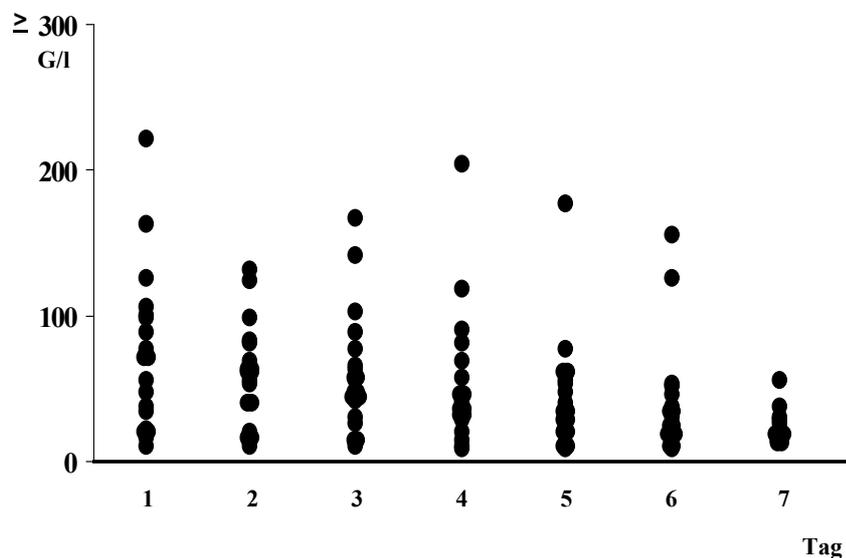
Leukozyten (G/l)							P-Wert
Abhängigkeit der Leukozyten vom Therapieansprechen							0,193
Abhängigkeit der Leukozyten von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)							<0,0001
Interaktion zwischen Therapieansprechen und Zeit							0,914
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Tag 1	14	<b>3,4</b>	1,2 – 52,5	7	<b>3,4</b>	0,7 – 37,4	
Tag 2	16	<b>3,7</b>	0,5 – 43,1	6	<b>2,2</b>	0,6 – 30,3	
Tag 3	16	<b>3,8</b>	0,5 – 23,0	5	<b>1,6</b>	0,9 – 17,0	
Tag 4	13	<b>2,1</b>	0,6 – 22,3	3	<b>1,7</b>	0,9 – 5,4	
Tag 5	11	<b>1,7</b>	0,7 – 3,4	3	<b>0,8</b>	0,7 – 1,5	
Tag 6/7/8	13	<b>0,9</b>	0,5 – 21,6	3	<b>0,9</b>	0,5 – 1,1	
Fläche Tage 2-4	11	<b>8,7</b>	1,3 – 48,1	2	<b>19,3</b>	3,7 – 34,9	
Tag 2 – Tag 1 (%)	13	<b>-1,4</b>	- 60,9 – 79,5	6	<b>-35,4</b>	-53,9 – -14,3	

### 5.3.3 Thrombozyten

Durch die Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark zeigte sich bereits vor Therapie bei den meisten Patienten Thrombozytenwerte unterhalb des Referenzbereichs von 150 – 450 G/l.

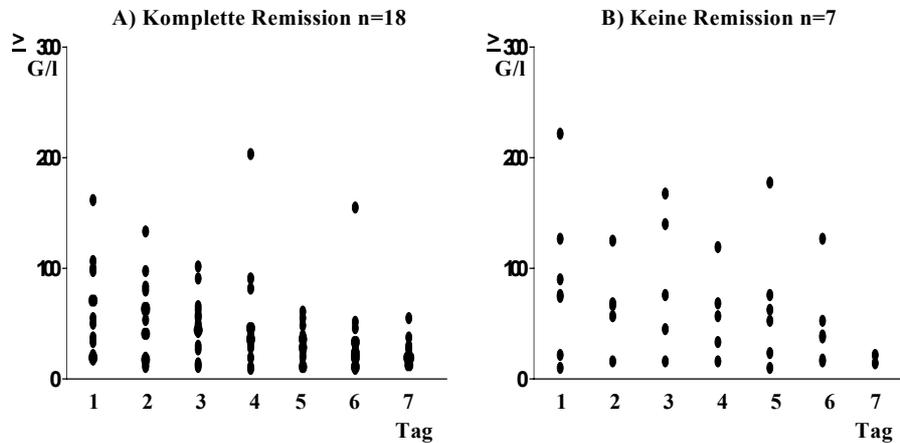
Während der Chemotherapie ist mit einem weiteren Abfall der Thrombozyten und der damit verbundenen Komplikationen, wie erhöhte Blutungsneigung, zu rechnen. Diese Vermutung bestätigte sich in der Auswertung. Die ersten drei Tage nach Therapiebeginn hielten sich die Thrombozyten noch annähernd konstant und fielen ab Tag 5 bis auf wenige Ausnahmen deutlich ab. [Abb. 38]

Abbildung 38: Verteilung der Thrombozyten bei allen AML-Patienten während des 1. Zyklus



Bei der getrennten Betrachtung nach dem Therapieansprechen sah man bei den Patienten mit kompletter Remission einen konstanten Abfall der Thrombozytenwerte von Therapiebeginn bis hin zum Ende des ersten Therapiezyklus. Im Gegensatz dazu gab es in der Gruppe der Patienten ohne Remission keine einheitliche Tendenz. [Abb. 39]

Abbildung 39: Verteilung der **Thrombozyten** zwischen den AML-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission während des 1. Zyklus



In der Gesamtvarianzanalyse ergab sich keine Abhängigkeit der Thrombozyten vom Therapieansprechen, aber von den einzelnen Tagen. Eine Interaktion zwischen Ansprechen und den einzelnen Tagen bestand nicht. [Tabelle 42]

Somit zeigten sich bei den univariaten Analysen der Thrombozyten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Therapieansprechens. Es fiel auf, dass die Patienten ohne vollständige Remission stets etwas höhere Medianwerte aufwiesen. Im Verlauf sanken in beiden Gruppen die Medianwerte bis zum Ende der ersten Therapiewoche ab. [Tabelle 42]

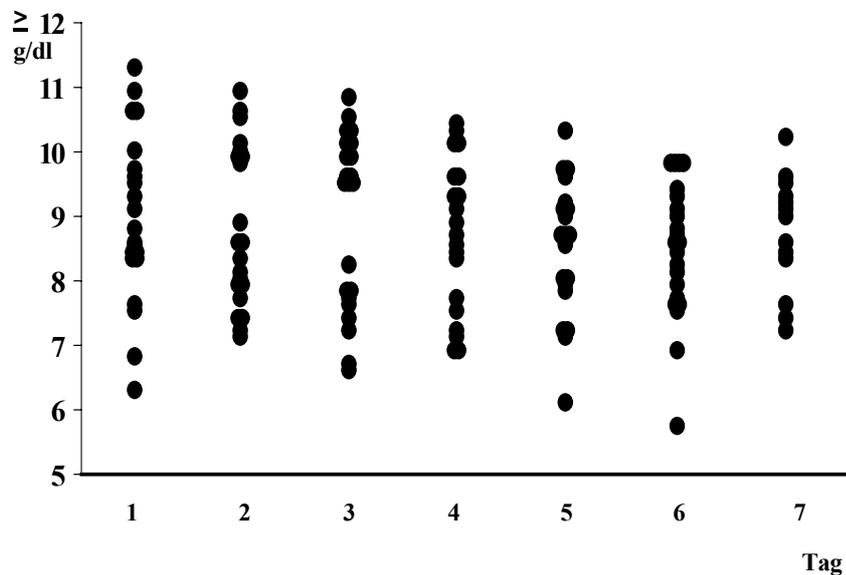
**Tabelle 42: Korrelation der Thrombozyten bezüglich des Therapieansprechens bei den AML-Patienten während des 1. Zyklus.**

Thrombozyten (G/l)							P-Wert
Abhängigkeit der Thrombozyten vom Therapieansprechen							0,496
Abhängigkeit der Thrombozyten von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)							<b>0,001</b>
Interaktion zwischen Therapieansprechen und Zeit							0,986
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Tag 1	14	<b>51</b>	16 – 162	7	<b>76</b>	9 – 222	
Tag 2	16	<b>57</b>	9- 132	6	<b>67</b>	15 – 182	
Tag 3	17	<b>47</b>	9 – 101	5	<b>76</b>	14 – 167	
Tag 4	16	<b>38</b>	8 – 203	5	<b>56</b>	14 – 117	
Tag 5	15	<b>28</b>	9 – 60	6	<b>57</b>	8 – 177	
Tag 6/7/8	18	<b>25</b>	7 – 154	7	<b>36</b>	14 – 125	
Fläche Tage 2-4	14	<b>95</b>	20 - 212	3	<b>137</b>	88 - 290	
Tag 2-Tag 1 (%)	13	<b>-17,5</b>	-43,8 - 122	6	<b>-22,1</b>	-28,6 - -0,8	

### 5.3.4 Hämoglobin

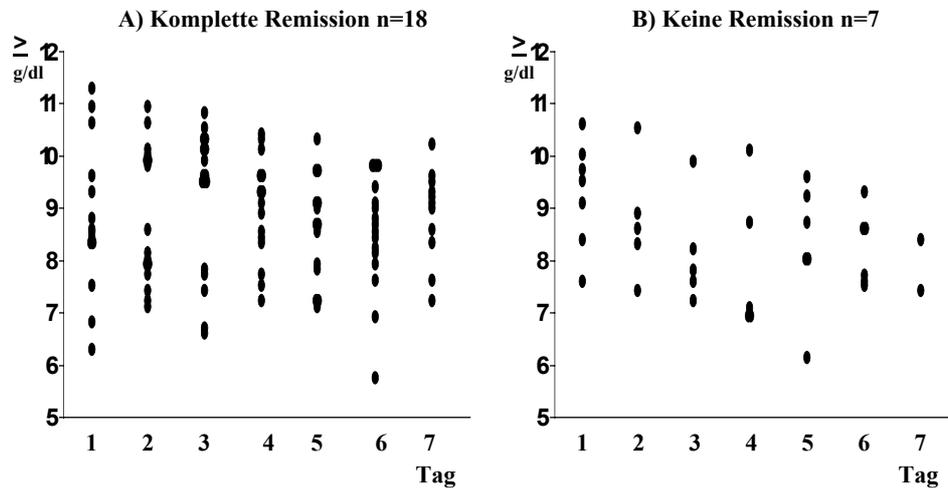
Durch die Verdrängung der roten Blutreihe im Knochenmark zeigte sich schon vor Therapie bei allen Patienten mit akuter myeloischer Leukämie eine Anämie mit Hämoglobinwerten von unter 12 g/dl. Die meisten Patienten hatten sogar einen Hämoglobinwert im Bereich von 8–10 g/dl. Im Therapieverlauf fiel das Hämoglobin, wie erwartet durch die myelotoxische Wirkung der Chemotherapeutika, weiter ab, so dass am Ende der ersten Woche bei fast allen Patienten Werte von unter 10 g/dl gemessen wurden. [Abb. 40]

Abbildung 40: Verteilung des Hämoglobin bei allen AML-Patienten während des 1. Zyklus



Im Wertevergleich sah man in Bezug auf das Therapieansprechen keine wesentlichen Unterschiede. In beiden Gruppen sanken die bereits anfänglich niedrigen Hämoglobinwerte weiterhin im Verlauf ab. [Abb. 41]

Abbildung 41: Verteilung des Hämoglobins zwischen den AML-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission während des 1. Zyklus



Ein Effekt des Therapieansprechens oder der Zeit auf den Hämoglobinwert gab es nicht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen konnte weder an den einzelnen Tagen noch bezüglich der Fläche unter der Kurve festgestellt werden. [Tabelle 43]

**Tabelle 43: Korrelation des Hämoglobins bezüglich des Therapieansprechens bei den AML-Patienten während des 1. Zyklus.**

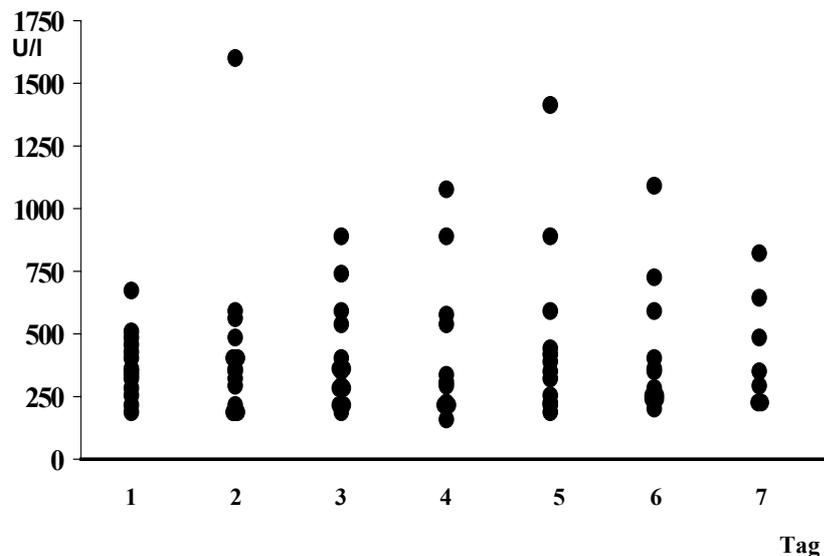
Hämoglobin (g/dl)							p-Wert
Abhängigkeit des Hämoglobins vom Therapieansprechen							0,356
Abhängigkeit des Hämoglobins von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)							0,337
Interaktion zwischen Therapieansprechen und Zeit							0,234
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Tag 1	14	<b>8,6</b>	6,3 – 11,3	7	<b>9,5</b>	7,6 – 10,6	
Tag 2	16	<b>8,4</b>	7,1 – 10,9	6	<b>8,5</b>	7,4 – 10,5	
Tag 3	17	<b>9,6</b>	6,6 – 10,8	5	<b>7,8</b>	7,2 – 9,9	
Tag 4	16	<b>9,2</b>	7,2 – 10,4	5	<b>7,1</b>	6,9 – 10,1	
Tag 5	15	<b>8,7</b>	7,1 – 10,3	6	<b>8,4</b>	6,1 – 9,6	
Tag 6/7/8	18	<b>8,8</b>	5,7 – 9,8	7	<b>8,6</b>	7,5 – 9,3	
Fläche Tage 2-4	14	<b>18,9</b>	14,3 – 20,7	3	<b>14,8</b>	14,5 – 15,9	
Tag 2-Tag 1 (%)	13	<b>-4,8</b>	-15,3 – 30,7	6	<b>-11,1</b>	-18,7 – -0,9	

### 5.3.5 LDH

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein Enzym, das eine wichtige Rolle im Stoffwechsel der Zellen einnimmt. Hohe Konzentrationen an LDH kommen vor allem in den Zellen der Leber, des Herzens und der Skelettmuskulatur sowie in den roten Blutkörperchen vor. Bei Schädigung der Zellen oder deren Absterben kommt es zur Freisetzung von LDH ins Blut. Aufgrund des höheren Zellumsatzes bei malignen Erkrankungen werden erhöhte LDH-Werte bei Krebspatienten bestimmt.

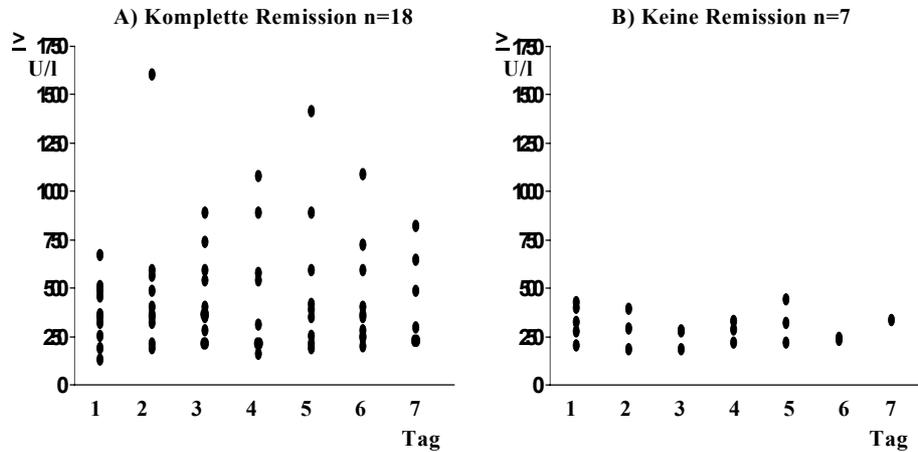
Die 95%-Perzentile der LDH bei gesunden Personen liegt bei 250 U/l. In den Untersuchungen wurde bei einem überwiegenden Teil der AML-Patienten höhere Werte gemessen. Im weiteren Verlauf wurde nur bei einigen Ausnahmen ein Anstieg zwischen den Tagen 3 und 6 festgestellt, sonst gab es kaum Veränderungen der Wertlagen. Die LDH bewegte sich überwiegend in einem Bereich von 200 – 500 U/l [Abb. 42]. Aufgrund der Zerstörung der Zellen durch die Chemotherapie hätte im Verlauf ein deutlicherer Anstieg erwartet werden können.

Abbildung 42: Verteilung der LDH bei allen AML-Patienten während des 1. Zyklus



Die Verläufe der LDH waren häufig nicht vollständig, da diese Werte aus den Routineblutabnahmen stammten. Dennoch bestand ein Unterschied zwischen Patienten mit kompletter Remission und den Patienten ohne Remission in den hohen Wertlagen. Die Patienten ohne Remission zeigten keine Werte von größer als 440 U/l, während bei kompletter Remission LDH-Konzentrationen von bis zu 1600 U/l gemessen wurden.

Abbildung 43: Verteilung der LDH zwischen den AML- Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission während des 1. Zyklus



In der Gesamtvarianzanalyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Therapieansprechens ( $p=0,251$ ). Auch eine Abhängigkeit der LDH von den einzelnen Tagen im Verlauf konnte nicht nachgewiesen werden ( $p=0,161$ ). Ebenso bestand kein Zusammenhang zwischen dem Therapieansprechen und der Zeit während Therapie ( $p=0,359$ ). Bei der Berechnung der univariaten Analysen gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Therapieansprechens. An Tag 4 zeigte sich bei den Patienten mit kompletter Remission der höchste Medianwert von 533 U/l im Verlauf. Die Patienten ohne Remission hingegen hatten keinen Anstieg der Medianwerte zu verzeichnen. [Tabelle 44]

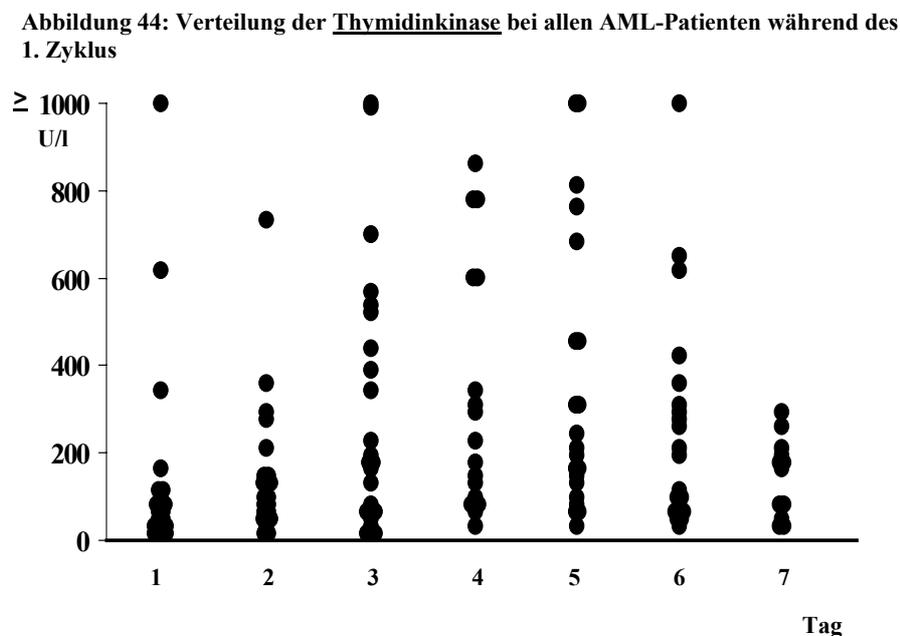
**Tabelle 44: Korrelation der LDH bezüglich des Therapieansprechens bei den AML-Patienten während des 1. Zyklus.**

Laktatdehydrogenase (U/l)							P-Wert
Abhängigkeit der LDH vom Therapieansprechen							0,251
Abhängigkeit der LDH von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)							0,161
Interaktion zwischen Therapieansprechen und Zeit							0,359
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Tag 1	10	<b>346</b>	120 – 672	5	<b>326</b>	202 – 427	
Tag 2	10	<b>373</b>	177 – 1603	4	<b>237</b>	147 – 391	
Tag 3	11	<b>361</b>	204 – 876	3	<b>278</b>	183 – 282	
Tag 4	9	<b>533</b>	153 – 1068	3	<b>285</b>	217 – 330	
Tag 5	9	<b>380</b>	182 – 1405	3	<b>318</b>	218 – 440	
Tag 6/7/8	12	<b>304</b>	174 – 1087	4	<b>261</b>	232 – 336	
Fläche Tage 2-4	6	<b>1159</b>	415 - 1966	1	<b>566</b>		
Tag 2 – Tag 1 (%)	7	<b>1,3</b>	-23,3 – 47,5	2	<b>-8,9</b>	-9,4 - -8,4	

### 5.3.6 Thymidinkinase

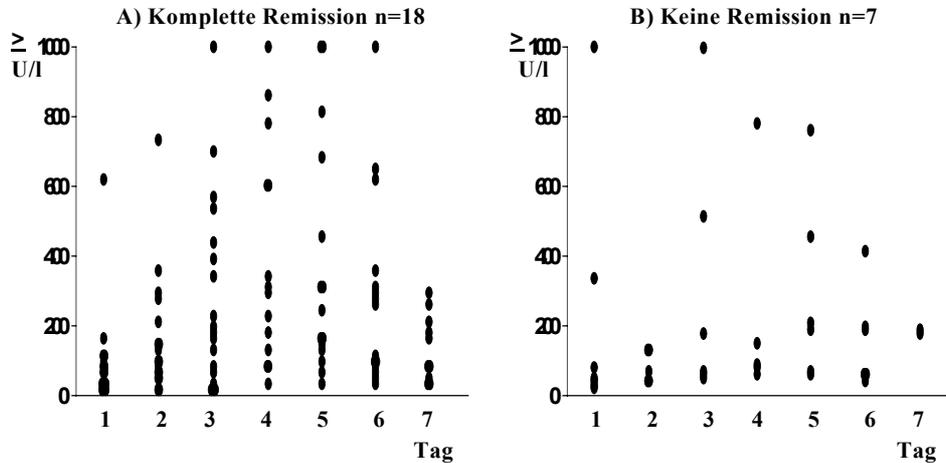
Die Thymidinkinase ist ein Tumormarker für maligne hämatologische Erkrankungen. Dieser Marker gibt die Teilungsaktivität von Zellen an, da die Thymidinkinase ein Zellenzym ist, das am Aufbau der DNA beteiligt ist. Aufgrund der hohen Zellteilungsrate bei Krebserkrankungen des blutbildenden Systems ist die Thymidinkinase ein geeigneter Marker.

Während des ersten Chemotherapiezyklus kam es bis zur Mitte der Woche an den Tagen 3 und 4 zu einem Anstieg der Thymidinkinase, die im weiteren Verlauf bis zum Ende der Woche wiederum deutlich abnahm und zu diesem Zeitpunkt nur gering über dem Ausgangsniveau lag. [Abb. 44]



Bis auf einzelne Ausnahmen zeigten die Patienten ohne Remission niedrigere Thymidinkinasewerte, sowohl prätherapeutisch als auch während der Therapiewoche. Der überwiegende Teil der Thymidinkinasewerte bei den Patienten ohne Remission blieb in einem konstanten Bereich. [Abb. 45]

Abbildung 45: Verteilung der Thymidinkinase zwischen den AML-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission während des 1. Zyklus



Die Gesamtvarianzanalyse ergab, dass die Thymidinkinase nicht abhängig vom Therapieansprechen war ( $p = 0,750$ ), aber deutlich abhängig vom zeitlichen Verlauf während Chemotherapie ( $p = 0,001$ ). Zwischen dem Therapieansprechen und den einzelnen Tagen bestand keine Verbindung ( $p = 0,360$ ). In den detaillierten Analysen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Trotz allem war bei Patienten mit kompletter Remission ein höherer Anstieg des maximalen Medianwertes von 302 U/l an Tag 4 zu beobachten im Gegensatz zu den Patienten ohne Remission mit dem höchsten Medianwert von 194 U/l. [Tabelle 45]

**Tabelle 45: Korrelation der Thymidinkinase bezüglich des Therapieansprechens bei den AML-Patienten während des 1. Zyklus.**

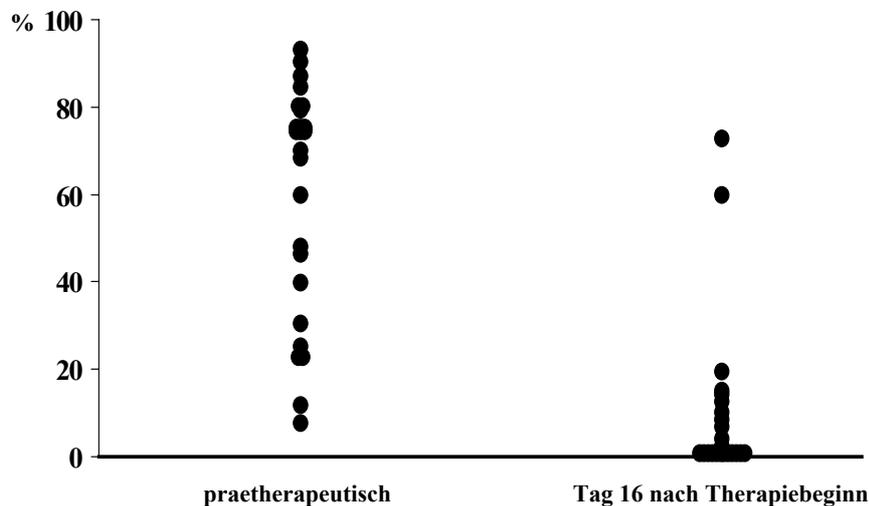
Thymidinkinase							P-Wert
Abhängigkeit der Thymidinkinase vom Therapieansprechen							0,750
Abhängigkeit der Thymidinkinase von der Zeit nach Therapiebeginn (Tage)							<b>0,001</b>
Interaktion zwischen Therapieansprechen und Zeit							0,360
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	N	Median	Bandbreite	N	Median	Bandbreite	
Tag 1	15	<b>51</b>	6 – 603	7	<b>41</b>	11 – 1095	
Tag 2	17	<b>89</b>	1 – 727	6	<b>54</b>	22 – 127	
Tag 3	18	<b>183</b>	5 – 1789	6	<b>121</b>	48 – 988	
Tag 4	15	<b>302</b>	25 – 1158	5	<b>86</b>	58 – 772	
Tag 5	14	<b>195</b>	22 – 1161	6	<b>194</b>	57 – 758	
Tag 6/7/8	18	<b>176</b>	29 – 1040	7	<b>146</b>	36 – 414	
Fläche Tage 2-4	14	<b>370</b>	20 - 1348	4	<b>192</b>	99 - 963	
Tag 2 – Tag 1 (%)	14	<b>21,9</b>	-89,8 - 626	6	<b>50,2</b>	-63,4 - 110	

### 5.3.7 Blasten

Die Blasten im Knochenmark betragen bei gesunden Personen  $< 5\%$ . Der prätherapeutische Blastenanteil ist ein Prognosefaktor für das spätere Outcome bei AML-Patienten. Je höher der Prozentsatz umso schlechter ist die Prognose. Die Patienten in dieser Untersuchung haben alle an Chemotherapiestudien teilgenommen. Bei ihnen wurde ungefähr ein bis zwei Wochen, das heißt um Tag 16, nach Therapiebeginn, eine weitere Knochenmarkbiopsie vorgenommen. Der Rückgang der Blasten von prätherapeutisch bis zu Tag 16 ist ein weiterer Prognosefaktor. In diesem Fall gilt, je größer der Abfall, umso besser die Prognose. Bei Patienten, die nur einen Induktionszyklus erhielten und danach bereits eine komplette Remission aufwiesen, wurde der Wert von Tag 16 als Staging verwendet. Sonst erfolgte das Staging nach dem zweiten Induktionszyklus.

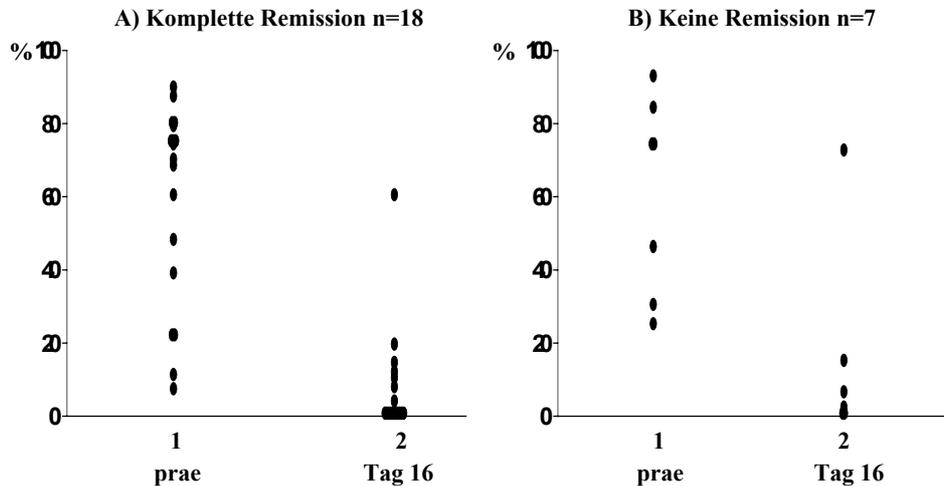
In der folgenden Abbildung ergab sich eine prätherapeutische Verteilung zwischen 7% und 93%. An Tag 16 zeigte sich bis auf wenige Ausnahmen kaum eine Blastenanteil von über 20%. Bei vielen der Patienten konnten keine Blasten im Knochenmark mehr nachgewiesen werden. [Abb. 46]

**Abbildung 46: Verteilung der Blasten bei allen AML-Patienten während der Chemotherapie**



Beim Vergleich der beiden Ansprechgruppen wurde kein Unterschied festgestellt, obwohl man erwarten würde, dass die Patienten ohne Remission nicht so deutlich abfallen. [Abb. 47]

Abbildung 47: Verteilung der **Blasten** zwischen den AML-Patienten mit A) kompletter Remission und B) keiner Remission



Hinsichtlich des Therapieansprechens konnten die Blasten weder prätherapeutisch, an Tag 16 noch der prozentuale Blastenrückgang von Tag 1 zu Tag 16 signifikant unterscheiden. [Tabelle 46]

**Tabelle 46: Blasten und Therapieansprechen**

Blastenanteil im Knochenmark (%)							P-Wert
	Komplette Remission			Keine komplette Remission			
	n	Median	Bandbreite	n	Median	Bandbreite	
Tag 1	18	<b>72</b>	7 – 90	7	<b>74</b>	25 – 93	0.880
Tag 16	17	<b>0</b>	0 – 60	6	<b>4</b>	0 – 72	0.385
Tag 16 – Tag 1 %	17	<b>100</b>	14 – 100	6	<b>88</b>	3 – 100	0.385

### Immunphänotyp

Wie die prätherapeutischen Blasten und der Blastenrückgang ist auch der Immunphänotyp bei akuten myeloischen Leukämien prognostisch von Bedeutung. Die folgende Tabelle führt die vorliegenden Immunphänotypen auf. Am häufigsten war die Konstellation MPO, CD13 und CD33 zu finden, die zugleich beim größten Anteil der Patienten ohne Remission vorkam.

**Tabelle 47: Immunphänotyp**

Immunphänotyp	Patienten- Anzahl	Kompletter Remission	Keine kompl. Remission
MPO, CD13, CD33	15	10	5
MPO, CD13, CD33, CD14	1	1	
MPO, CD13, CD33, cCD3, CD7, CD2, TdT	1	1	
CD33, CD117, cyCD3, teilw. CD19	1	1	
unbekannt	7	5	2

Zytogenetik

Vor allem in der neuen WHO-Klassifikation der AML spielt die Zytogenetik eine entscheidende Rolle. Dabei werden akute myeloische Leukämien unterschieden nach AML mit spezifischen chromosomalen Translokationen, AML mit multilinearer Dysplasie, therapiebedingte AML und nicht weiter klassifizierte AML. Auch hier gilt, dass die Prognose abhängig von der Zytogenetik ist.

Folgende Tabelle 48 gibt die Zytogenetik der untersuchten Patienten wieder. Während mehr als 60% der Patienten mit kompletter Remission einen normalen Karyotyp aufweisen, sind dies bei den Patienten ohne Remission lediglich 2 von 7 Patienten.

**Tabelle 48: Zytogenetik**

Zytogenetik	Anzahl	Komplette Remission	Keine kompl. Remission
Normal	13	11	2
Trisomie 8	1	1	
Trisomie 11	1		1
Trisomie 21, IsochromX	1	1	
Inv 3	1	1	
Inv 3, Monosomie 7	1	1	
Perizentrische Inv 4	1		1
Inv 16	2		2
T (2;5)	1		1
T (8;21), -Y	1	1	
T (15;17)	1	1	
Mosaik 46XX/45X0	1	1	

Wegen der großen Heterogenität bei der Zytogenetik und dem Immunphänotyp wurde keine Korrelation in Bezug auf das Therapieansprechen durchgeführt.

### Korrelation der Nukleosomen mit Leukozyten und Blasten

Bei weiteren Untersuchungen zur Erkennung eines frühzeitigen Therapieansprechens mittels Marker wurden die Nukleosomen mit den Leukozyten an Tag 1, Tag 2 und hinsichtlich des Abfalls von Tag 1 zu Tag 2 korreliert. Es wurde eine positive Korrelation gefunden für die Nukleosomen an Tag 2 mit den Leukozyten an Tag 1 ( $p = 0,026$ ) und an Tag 2 ( $p = 0,009$ ) sowie mit der Differenz von Tag 2 zu Tag 1 ( $p = 0,010$ ). Außerdem korrelierten am deutlichsten die Differenz der Nukleosomen von Tag 2 zu Tag 1 mit der Differenz der Leukozyten ( $p = 0,001$ ). Diese Korrelation traf hauptsächlich für die Untergruppe der kompletten Remission zu, aber nicht für die Gruppe der Patienten ohne Remission. [Tabelle 49]

**Tabelle 49: Korrelation der Nukleosomen mit den Leukozyten**

	Alle			Komplette Remission			Keine Remission		
	Leuk1	Leuk2	Leuk2-1	Leuk1	Leuk2	Leuk2-1	Leuk1	Leuk2	Leuk2-1
Nuk1	0,080	0,156	0,571	0,303	0,522	0,621	0,148	0,208	0,872
Nuk2	<b>0,026</b>	<b>0,009</b>	<b>0,010</b>	<b>0,007</b>	<b>0,001</b>	<b>0,049</b>	0,704	0,704	0,544
Nuk2-1	0,307	0,250	<b>0,001</b>	0,175	0,138	<b>0,007</b>	0,704	0,704	0,704

Leuk = Leukozyten, Nuk = Nukleosomen, 1 = Tag 1, 2 = Tag 2, 2-1= Differenz von Tag 2 zu Tag 1

Prätherapeutisch korrelierten die Nukleosomenwerte nicht mit den Blasten im Knochenmark ( $r = 0,08$ ;  $p = 0,722$ ). Allerdings zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen den prätherapeutischen Nukleosomen und dem Blastenanteil im Knochenmark an Tag 16 ( $r = -0,55$ ;  $p = 0,012$ ), sowie eine proportionale Korrelation mit dem Blastenrückgang von Tag 1 zu Tag 16 ( $r = 0,58$ ;  $p = 0,007$ ). Ebenso korrelierte die Fläche unter der Kurve von Tag 2-4 der Nukleosomen mit dem Blastenrückgang von Tag 1 zu Tag 16 ( $r = 0,49$ ;  $p = 0,041$ ). Es zeigte sich somit eine Korrelation der Nukleosomenfreisetzung mit der Reduktion der Blastenzahl.

## Zusammenfassung

Bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie nahmen die Nukleosomenwerte im Verlauf der Induktionstherapie deutlich ab, bei einigen Patienten nach einem initialen Anstieg. Die Gesamtvarianzanalyse zeigte, dass die Nukleosomen bei den Patienten mit akuter myeloischer Leukämie signifikant bezüglich des Therapieansprechens unterscheiden konnten. Die weiteren untersuchten Marker, wie Leukozyten, Thrombozyten, Hämoglobin, Laktatdehydrogenase und Thymidinkinase, waren hierzu nicht in der Lage. Ebenso bestand eine zeitliche Abhängigkeit der Nukleosomen während der ersten Therapiewoche; wie auch bei den Leukozyten, den Thrombozyten und der Thymidinkinase. Die Patienten mit kompletter Remission wiesen an den ersten vier Tagen während der Induktionstherapie signifikant höhere Werte auf als die Patienten ohne Remission. Diese Werte wurden zusammengefasst in der Fläche unter der Kurve von Tag 2-4 ohne den prätherapeutischen Wert, um den direkten Effekt der Induktionstherapie auf die Nukleosomen darzustellen. Auch anhand dieser Fläche unter der Kurve konnten die Patienten nach dem Therapieansprechen signifikant unterschieden werden. Bei einem Cutoff von 150 ng/ml zeigte sich eine Spezifität von 100% für das Nicht-Erreichen der kompletten Remission bei einer Sensitivität von 56% für das Erreichen der kompletten Remission. Die positive Korrelation der Nukleosomen mit den Leukozyten und der Blastenreduktion im Knochenmark ergaben einen Hinweis auf den Ursprung der Nukleosomen.

**Tabelle 50: Unterscheidung nach Therapieansprechen und Zeit**

	<b>Effekt der Therapieantwort</b>	<b>Effekt der Zeit während Therapie</b>	<b>Interaktion zwischen Therapieansprechen und Zeit</b>
<b>Nukleosomen</b>	<b>p = 0,017</b>	<b>p = 0,023</b>	n.s.
<b>Leukozyten</b>	n.s.	<b>p = 0,001</b>	n.s.
<b>Thrombozyten</b>	n.s.	<b>p = 0,001</b>	n.s.
<b>Hämoglobin</b>	n.s.	n.s.	n.s.
<b>LDH</b>	n.s.	n.s.	n.s.
<b>Thymidinkinase</b>	n.s.	<b>p = 0,001</b>	n.s.

n.s. = nicht signifikant

## 6. Diskussion

### 6.1 Aussagekraft der Marker bei Lymphomen

Das Krankheitsbild der Lymphome ist sehr variabel. Die Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome werden in viele Untergruppen unterteilt, wie sie der neuen WHO-Klassifikation zu entnehmen sind. Die Histologie ist ein entscheidender Prognosefaktor hinsichtlich des Therapieansprechens. Aber innerhalb dieser Gruppen und auch in Abhängigkeit der Stadien gibt es große Varianzen in Bezug auf das Therapieansprechen. Neben der Histologie gibt es einige weitere wichtige Prognosefaktoren, die teilweise in Prognosemodelle zusammengefasst werden.

#### Prognosefaktoren bei Lymphomerkrankungen

Bei den Non-Hodgkin-Lymphomen hat sich der Internationale Prognose Index (IPI) durchgesetzt. Dieser umfasst fünf voneinander unabhängige Prognosefaktoren. Dazu zählen die Laktatdehydrogenase (LDH), das Alter, das Stadium nach Ann Arbor, der Performancestatus nach WHO und die Anzahl extranodaler Manifestationen. Anhand dieser Faktoren wird ein Index erstellt, aus dem sich vier genau definierte Risikogruppen ergeben, die sich bezüglich des Überlebens signifikant unterscheiden. Dieser Index gilt überwiegend für Patienten mit aggressiven NHL (Shipp 1993). Ein weiteres Modell schließt in diesen Internationalen Prognoseindex zusätzlich das  $\beta$ 2-Mikroglobulin mit ein, und erreicht somit eine noch bessere Sensitivität bei gleicher Spezifität (Conconi 2000).

Für die Patienten mit indolenten Lymphomen gibt es auch prognostische Parameter, allerdings keine Modelle. Hierzu gehören die Laktatdehydrogenase und die Thymidinkinase, die eine Aussage bezüglich der Proliferationsaktivität treffen. Ebenso können Prognosefaktoren im Serum herangezogen werden, die allgemein bei Lymphomen eine Rolle spielen, wie das  $\beta$ 2-Mikroglobulin, das die Tumorlast angibt, und das CA125, das vor allem bei progredienten Erkrankungen erhöht ist. (Martinsson 1988, Morra 1999).

Wie für die Patienten mit aggressiven Lymphomen, so wurde auch für die Patienten mit Hodgkin-Lymphomen ein sogenannter International Prognostic Score (IPS) entwickelt, der das progressionsfreie Intervall voraussagt. Dieser beinhaltet sieben voneinander unabhängige Prognosefaktoren: Serum-Albumin  $< 4\text{g/dl}$ , Hämoglobin  $< 10,5\text{ g/dl}$ , Geschlecht männlich, Alter  $> 45$  Jahre, Stadium 4, Leukozytose  $> 15\text{ G/L}$ , Lymphozytopenie  $< 0,6\text{ G/L}$  sind ungünstig. Der Score ergibt sich aus der Anzahl der vorliegenden Prognosefaktoren. Je höher der Score umso kürzer ist das progressionsfreie Intervall (Hasenclever 1998). In einer

weiteren Studie wurde empfohlen diesen Score um die Marker Interleukin 10 und CD30 zu erweitern (Axdorph 2000).

### Nukleosomen zur Beurteilung des Therapieansprechens

Die aufgeführten Prognosefaktoren werden in der Regel prätherapeutisch herangezogen und geben keinerlei Auskunft über das Therapieansprechen bei den einzelnen Patienten. In der vorliegenden Studie untersuchten wir die Nukleosomen als Marker für den Zelltod sowohl prätherapeutisch als auch während des Chemotherapieverlaufs. Besonders engmaschig mit täglichen Serumproben bestimmten wir die Nukleosomen in der ersten Therapiewoche. Im weiteren Therapieverlauf wurde vor jedem weiteren Chemotherapiezyklus eine Blutprobe entnommen.

In unserer Studie wurde in einem ersten Teil untersucht, inwieweit eine frühzeitige Beurteilung des Therapieansprechens durch die Nukleosomen bei Patienten mit Lymphomen während Chemotherapie möglich ist. Im zweiten Teil galt diese Fragestellung den akuten myeloischen Leukämien. Nukleosomen entstehen bei Apoptose, indem Chromatin charakteristischerweise in mono- und oligonukleosomale Fragmente gespalten wird. Durch Auflösung der Zellmembran werden diese DNA-Fragmente in die Blutbahn freigesetzt und können im Serum mittels ELISA gemessen werden (Holdenrieder 2004b). Zytostatika führen über den stressinduzierten oder Todesrezeptor-abhängigen Weg zur Apoptose (Debatin 1999, Ehlert 2001, Herr 2001, Petak 2001), so dass während einer Chemotherapie Veränderungen der Nukleosomenkonzentration zu erwarten sind.

Bereits in zahlreichen früheren Studien wurde beschrieben, dass bei Patienten mit malignen Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen einschließlich Lymphome und Leukämien höhere Spiegel zellfreier DNA im Plasma und Serum gemessen wurden (Leon 1977, Shapiro 1983, Fournie 1995, Holdenrieder 1999, 2001a, Kuroi 2001, Sozzi 2001, 2003, Wu 2002, Herrera 2005). Bei verschiedenen Karzinomen ergab sich in einer Studie mit 173 Krebspatienten ein Mittelwert von 180 ng/ml. Außerdem zeigten metastasierte Patienten im Mittel höhere Werte als Patienten ohne Metastasen (Leon 1977). Ein deutlich höherer Mittelwert von 318 ng/ml ließ sich bei 84 Patienten mit Lungenkrebs ermitteln (Sozzi 2001). Im Vergleich zu den Tumorpatienten wiesen die gesunden Kontrollpersonen in den Studien von Leon und Sozzi erheblich niedrigere Mittelwerte von zellfreier DNA auf. Beide Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen mit Mittelwerten von 13 ng/ml und 18 ng/ml bei Gesunden. In einer weiteren Studie fielen die Werte von gesunden Medizinstudenten etwas höher aus mit einem Mittelwert von 57 ng/ml (Wu 2002). Auch im Vergleich der Patienten mit malignen Erkrankungen zu denen mit benignen Erkrankungen hatten Krebspatienten höhere Konzentrationen an frei zirkulierender DNA (Holdenrieder 2001a, Herrera 2005). In der

vorliegenden Studie lag der prätherapeutische Nukleosomen-Mittelwert bei allen Lymphom-Patienten bei 191 ng/ml und bei den AML-Patienten bei 74 ng/ml.

Der Hauptteil frei zirkulierender DNA liegt im Serum oder Plasma in Form von Nukleosomen vor bestehend aus ungefähr 200 Basenpaaren DNA, die an einen Histonkomplex gebunden sind (Rumore 1992, Kornberg 1999, Jahr 2001, Chan 2003). Physiologisch waren im Plasma eher Mono- oder Oligonukleosomen zu messen als sogenannte nackte DNA (Rumore 1992). Mittels Gelelektrophorese war die Größenbestimmung von Plasma-DNA möglich mit dem Ergebnis, dass DNA-Fragmente gemessen wurden, die eine Größe von ca. 180 Basenpaaren aufwiesen oder das Vielfache davon. Das Vorkommen von Nukleosomen war charakteristisch für einen Zelltod durch Apoptose. Denn bei diesem Vorgang bildeten sich durch die Spaltung des Chromatins durch Endonukleasen charakteristischerweise nukleosomale DNA-Fragmente (Jahr 2001). Ein Grund für das Vorkommen von Protein gebundener DNA scheint ein besserer Schutz vor rascher Verdauung der DNA durch Endonukleasen im Serum und Plasma zu sein (Ng 2002). Methoden zur Messung von zellfreier DNA und nukleosomaler DNA zeigten eine gute Korrelation sowohl bezüglich Einzelwerten als auch in Reihenuntersuchungen (Holdenrieder 2005).

#### Nukleosomale Fragmente bei soliden Tumoren

Bei Patienten mit soliden Tumoren zeigte sich in Verlaufsuntersuchungen von zirkulierender DNA während einer Antitumorthherapie, dass bei Patienten mit Ansprechen auf die Therapie der Level zellfreier DNA sank, wohingegen die Werte bei Patienten mit Progression oder unverändertem Krankheitsbild oder Rezidiv nach Therapie stiegen oder konstant blieben (Leon 1977, Anker 1999, Kuroi 2001, Johnson 2002). Die Messung von zirkulierender DNA vor und nach Radiotherapie bei Patienten mit verschiedenen Karzinomen ergab häufig abfallende Werte. Dieser Abfall korrelierte mit der Abnahme der Tumormasse und der klinischen Besserung. Ebenfalls war bei Patienten mit Nasopharyngealem Karzinom nach Radiotherapie EBV-DNA nicht mehr zu messen, wenn die Patienten im Verlauf kein Rezidiv entwickelten (Johnson 2002). Eine weitere Tumorthherapie ist die Operation. Es wurde TumordNA vor und nach der Operation von Kolon- und Mammakarzinomen gemessen mit dem Ergebnis, dass postoperativ diese deutlich abnahm oder nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Anker 1999, Kuroi 2001).

In einigen Studien wurde nun der Verlauf von Nukleosomen während Chemo- und Radiotherapie bei Patienten mit soliden Tumoren verfolgt (Holdenrieder 2001a, 2001b, 2001c, 2004, Kuroi 2001, Kremer 2005). Dabei wurde unter Chemotherapie folgende typische Kinetik ermittelt. Nach Beginn der Applikation von Zytostatika war ein schneller Anstieg mit einem Gipfel nach 24 – 72 Stunden zu sehen (Kuroi 2001, Holdenrieder 2001a). Im

Anschluss fielen die Werte ab. Während des zweiten Zyklus war charakteristischerweise ein niedrigerer Gipfel zu beobachten (Holdenrieder 2001a, 2001c). Es stellte sich die Frage, inwieweit der Verlauf der Nukleosomen während Antitumorthherapie bei Patienten mit soliden Tumoren frühzeitig das Therapieansprechen beurteilen kann. Das Ergebnis zeigte, dass Nukleosomenwerte, die vor den einzelnen Zyklen bestimmt wurden, mit dem Therapieansprechen korrelierten. Wenn es im Verlauf zu einem Abfall von mehr als 50 % kam, sprach dies häufig für ein Therapieansprechen, während ein Anstieg von mehr als 50 % hinweisend auf eine Progression war (Holdenrieder 2001a, 2001c). In einer Studie mit 212 Lungenkarzinom-Patienten konnte dies weiterhin belegt werden. Die Differenz prätherapeutischer Werte zu Werten vor dem 2. oder 3. Zyklus unterschied signifikant hinsichtlich des Therapieansprechens. So wiesen Patienten mit Remission einen größeren Abfall im Therapieverlauf auf. Ebenso konnte bereits während der ersten acht Tage der Chemotherapie ein signifikanter Unterschied bezüglich des Therapieansprechens festgestellt werden anhand der Fläche unter der Kurve von Tag 1 bis Tag 8. Patienten mit Remission verzeichneten nach einem anfänglichen leichten Anstieg einen deutlichen Abfall bis Tag 8, während die Patienten mit Progredienz einen größeren Anstieg hatten und der Abfall weniger deutlich ausfiel (Holdenrieder 2004a).

Unter Radiotherapie bei soliden Tumoren zeigte sich ebenfalls ein typisches Verlaufsmuster. Hierbei kam es initial zu einem Abfall bereits 3 – 6 Stunden nach Bestrahlung. Daran schloss sich ein steiler Anstieg an, dem wiederum ein konstanter Abfall folgte (Holdenrieder 2001a, Kremer 2005). Bei Pankreaskarzinomen war es schon innerhalb der ersten Tage möglich hinsichtlich des Therapieansprechens zu unterscheiden. Wie bei Chemotherapie von soliden Tumoren hatten die Pankreaskarzinom-Patienten mit Remission eine kleinere Fläche unter Kurve, in diesem Fall von Tag 1 bis Tag 3, als bei Progression (Kremer 2005).

#### Nukleosomale Fragmente bei systemischen Krebserkrankungen

Bereits früher wurde in Studien im Serum oder Plasma zellfreie DNA bei Lymphom-Patienten untersucht. Hierbei wurde vor allem Ausschau gehalten nach tumorspezifischer DNA. Es stellte sich heraus, dass es bei EBV-assoziierten malignen Erkrankungen möglich ist, EBV-DNA mittels PCR im Serum und Plasma zu messen. Zuerst wurde dieser Sachverhalt bei Nasopharyngealen Karzinomen (NPC) untersucht. Das Ergebnis ergab einen Nachweis von EBV-DNA bei bis zu 96% der NPC-Patienten (Mutirangura 1998, Lo 1999a). Neben den Nasopharyngealen Karzinomen sind auch verschiedene Lymphomerkkrankungen EBV-assoziiert. Auch bei diesen Patienten gelang mittels PCR der Nachweis von EBV-DNA im Plasma in mehr als 90%, während bei gesunden Kontrollpersonen keine EBV-DNA nachgewiesen werden konnte (Lei 2000, Lei 2002, Au 2004).

In fortgeschrittenen Stadien wurden höhere Konzentrationen an EBV-DNA gemessen, was somit die Tumormast widerspiegelt (Lo 1999a, Au 2004). Aufgrund dieser Tatsache wurde die EBV-DNA im Therapieverlauf bestimmt zur Kontrolle des Therapieansprechens. Bei Erreichen einer kompletten Remission konnten im Blut meist nur noch eine geringe Konzentrationen oder keine EBV-DNA mehr nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Patienten mit Krankheitspersistenz überwiegend gleichbleibend hohe oder ansteigende Werte (Lo 1999a, Lei 2000, Lei 2002, Au 2004). Auch bei Kontrolle nach erfolgreich abgeschlossener Therapie hatten die Patienten, die ein Rezidiv entwickelten, ansteigende Werte, während bei Rezidivfreiheit keine EBV-DNA nachgewiesen werden konnte (Lo 1999b).

Bei soliden Tumoren wurden zahlreiche Studien über zellfreie und nukleosomale DNA durchgeführt mit der Frage nach der diagnostischen Wertigkeit, ihrer prognostischen Aussagekraft und zur frühzeitigen Beurteilung des Therapieansprechens. Auch bei Lymphomen ist beschrieben, dass mittels Gelelektrophorese fragmentierte nukleosomale DNA im Plasma analysiert werden kann. In der Studie von Deligezer wurde bei Lymphom-Patienten dabei ein Median von 256 ng/ml nukleosomaler DNA gemessen, während bei gesunden Kontrollpersonen keine DNA nachgewiesen werden konnte (Deligezer 2003, Deligezer 2006). In unserer Studie lag der Median der Nukleosomen vor Therapiebeginn, gemessen mittels ELISA, mit 191 ng/ml in einem vergleichbaren Bereich.

Bei allen Lymphom-Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden, zeigte sich nach Chemotherapiebeginn im Verlauf der ersten Woche ein Abfall der Nukleosomenkonzentrationen. Ein wesentlicher Mechanismus der Zytostatika ist die Induktion der Apoptose der sich teilenden Tumorzellen. Somit sieht man vor allem zu Beginn der Therapie anhand der höheren Nukleosomenwerte eine erhöhte Zelltoderate, die gegen Ende der Woche abnimmt. Auch der Vergleich zwischen den Untergruppen der Lymphome ergab, dass Patienten mit indolenten Lymphomen im Schnitt niedrigere Werte aufwiesen. Aggressive Lymphome proliferieren in der Regel schneller, sind rasch progredient und zeigen dadurch einen höheren Zellumsatz, was die höheren Nukleosomenwerte in dieser Untergruppe erklärt.

Trennt man die Patienten nach dem Therapieansprechen in die beiden Gruppen mit kompletter Remission und keiner Remission, ergab sich zunächst prätherapeutisch bezüglich der Nukleosomen kein Unterschied. Auffallend war der Tag 2, das heißt 24 Stunden nach der ersten Zytostatikaapplikation. Sowohl bei allen Lymphom-Patienten als auch in der Untergruppe der aggressiven NHL zeigte sich an Tag 2 bei den Patienten ohne Remission ein tendenzieller Abfall des Medians, während bei den Patienten mit kompletter Remission dieser sich kaum veränderte. Bezüglich des Therapieansprechens unterschieden sich die Nukleosomen nur an Tag 2 signifikant. Im weiteren Verlauf der Woche zeigten beide Ansprechgruppen ähnliche Verläufe. Somit zeigte sich allerdings insgesamt kein Unterschied.

Auch in einer Studie über EBV-DNA während Radiatio bei NPC-Patienten zeigte sich bei täglichen Messungen nach Therapiebeginn ein initialer Anstieg der EBV-DNA durch Freisetzung bei therapieinduziertem Zelltod. Im Anschluss kam es zu einem Abfall der Werte unter das Ausgangsniveau (Lo 2000). Andererseits kann bei Patienten, die nicht auf Zytostatika ansprechen, eine Resistenz gegen diese Substanzen vorliegen. Dabei wird unter anderem die Apoptose blockiert, so dass es zu keiner gesteigerten Freisetzung von Nukleosomen in die Blutbahn kommt. Eine häufige Ursache für Zytostatika-Resistenz ist eine Überexpression des Proteins BCL-2 in Tumorzellen (Gascoyne 1997, Wilson 1997, O'Neill 2004). Ebenso gehen p53-Gen-Abnormalitäten mit einer vermehrten Chemoresistenz einher (O'Neill 1997, Chow 2006).

Vor den weiteren Zyklen sank das Niveau der Nukleosomenverteilung von Zyklus zu Zyklus weiter ab. Beim Vergleich aller Lymphom-Patienten hinsichtlich des Therapieansprechens lagen die Nukleosomen bei kompletter Remission bis auf eine Ausnahme in den Zyklen 3 und 4 in einem niedrigeren Bereich. Auch bei den aggressiven Lymphomen traf diese Tendenz zu. Ein signifikanter Unterschied ergab sich jedoch nicht. Patienten mit kompletter Remission zeigten einen vollständigen Rückgang der Lymphome und wiesen somit im späten Therapieverlauf keine spontane erhöhte Zelltodrate mehr auf. Auch bei den Patienten ohne Remission kam es oft zu einem Rückgang der Lymphommassen, was in einem Zusammenhang mit den geringeren Nukleosomenwerten vor den weiteren Zyklen stehen könnte, die im Schnitt dennoch über den Werten der Patienten mit kompletter Remission lagen.

Die EBV-DNA bei NPC und EBV-assoziierten Lymphomen zeigte meist ein typisches Verhalten während des Therapieverlaufes. In diesen Studien wurden allerdings keine täglichen Messungen nach Therapiebeginn durchgeführt, sondern lediglich davor und häufig erst im Abstand von einigen Wochen. In diesem langfristigen Verlauf zeigten sich im Gegensatz zu unseren Ergebnissen oft ein deutlicher Unterschied hinsichtlich des Therapieansprechens mit einem Abfall der EBV-DNA bei Therapieansprechen und einem Anstieg bei Progression. (Lei 2000, Lei 2002, Lo 1999).

Zusammenfassend ergab sich in der Gesamtvarianzanalyse der Nukleosomen kein signifikanter Unterschied bezüglich des Therapieansprechens. Es zeigte sich auch keine unterschiedliche Tendenz bezüglich des Therapieansprechens, auch wenn isoliert an Tag 2 ein signifikanter Unterschied bestand.

## Weitere Parameter bei Lymphom-Patienten

Neben den Nukleosomen wurden ebenfalls täglich während des ersten Zyklus und vor den folgenden Zyklen die Leukozyten, die Thrombozyten, das Hämoglobin und die Laktatdehydrogenase bestimmt. Auch weitere Tumormarker, die bei Lymphomen angewandt werden und teilweise prognostisch sind, wurden vor den einzelnen Zyklen gemessen. Dazu zählen das  $\beta$ 2-Mikroglobulin, die Thymidinkinase, CA 125 und CYFRA, als weiterer Zelltodmarker.

Sehr häufige Komplikationen aufgrund der Myelosuppression der Zytostatika ist die Neutropenie, die Thrombozytopenie und die Anämie, die im Verlauf der Chemotherapie auftreten. Durch die Neutropenie steigt das Risiko, an einer Infektion zu erkranken und/oder daran zu versterben. Die Neutropenie ist assoziiert mit einer erhöhten Mortalität. (Balducci 2003, Crawford 2004). Wie erwartet nahmen die Leukozyten in unserer Studien während der ersten Therapiewoche ab. Vor den weiteren Zyklen sanken die Werte in beiden Patientengruppen. Diese Beobachtung galt sowohl für alle Lymphom-Patienten, als auch für diejenigen mit aggressiven NHL. Die Thrombozytenverteilung bei allen Lymphom-Patienten und in der Untergruppe der aggressiven Lymphome nahm während des ersten Zyklus ebenfalls ab. Sowohl bei den Leukozyten und Thrombozyten ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Therapieansprechens. Im Gegensatz dazu unterschieden die Hämoglobinwerte signifikant an den Tagen 2 und 3 bei stets niedriger Tendenz bei den Patienten ohne komplette Remission.

Die Laktatdehydrogenase ist in den internationalen Prognoseindex bei aggressiven NHL integriert. Werte oberhalb des Normbereichs gelten als prognostisch ungünstig. In einigen weiteren Studien wird über die LDH als Prognosefaktor bei Lymphomkrankungen berichtet. Dabei ist die LDH in der Lage sowohl das Therapieansprechen als auch das Gesamtüberleben vorauszusagen (Aviles 1992, Garcia 1993, Suki 1995, Bouafia 2004).

Die Gesamtvarianzanalyse in unserer Studie ergab eine signifikante Abhängigkeit der LDH vom Therapieansprechen. Während der ersten Therapiewoche nahmen die LDH-Werte bei kompletter Remission kontinuierlich ab und zeigten Maximalwerte von bis zu 550 U/l. Bei den Patienten ohne Remission zeigten sich LDH-Werte von weit über 2000 U/l. Die aggressiven Lymphome wiesen ähnliche Verläufe auf, aber ohne ein signifikantes Ergebnis in der Gesamtvarianzanalyse bezüglich des Therapieansprechens. Ein in der Klinik eingesetzter Tumormarker bei Lymphom-Patienten ist das  $\beta$ 2-Mikroglobulin. Dieser Marker liegt bei Lymphomen in höheren Konzentrationen vor als bei Gesunden (Musolino 1990, Pavlidis 1993). Außerdem dient das  $\beta$ 2-Mikroglobulin als Prognosefaktor für das Therapieansprechen und das Gesamtüberleben. Erhöhte Werte gehen mit einer schlechteren Prognose einher (Johnson 1993, Pavlidis 1993, Suki 1995, Vassilakopoulos 2002). Es gab bereits die

Überlegung,  $\beta$ 2-Mikroglobulin in den Internationalen Prognoseindex aufzunehmen (Conconi 2000).

Im Verlauf vor den einzelnen Zyklen nahmen die maximalen Werte von  $\beta$ 2-Mikroglobulin in unserer Studie bis hin zum vierten Zyklus deutlich ab. Bei der Betrachtung nach dem Therapieansprechen zeigte sich bei Patienten mit kompletter Remission Werte in einem Bereich unterhalb von 3 mg/l. Im Gegensatz dazu reichte die Bandbreite bei den Patienten ohne Remission, wie zu erwarten höher, bis nahezu 10 mg/l. Der Unterschied war bei allen Lymphomen nicht signifikant, während bei den aggressiven NHL sich ein ähnliches Bild darstellte mit einem beinahe signifikanten Ergebnis von  $p=0,051$ .

Die Thymidinkinase ist ein Tumormarker für die Proliferationsaktivität. Auch sie ist bei Lymphom-Patienten höher als bei Gesunden, vor allem in fortgeschrittenen Stadien (Gronowitz 1983, Musolino 1990). Außerdem zeigen die aggressiveren Tumore ebenfalls ein höheres Niveau als die indolenten Lymphomerkrankungen (Doi 1990). Auch diesem Marker wurde bei Lymphom-Patienten eine prognostische Bedeutung zugeschrieben, mit hohen Werten bei Nichtansprechen und verkürztem Überleben (Rehn 1995, Suki 1995). Ebenso wurde die Thymidinkinase eingesetzt zum Therapiemonitoring. Dabei sprach ein Anstieg der Thymidinkinase im Verlauf für eine Progression, während bei Remission die Werte abnahmen (Gronowitz 1983, Poley 1997). Auch in der Studie von Hallek wird dieses Verhalten beschrieben, wobei diese Tendenzen erst nach mehreren Monaten abzulesen waren (Hallek 1988).

In unserer Studie beobachteten wir zuerst einen Anstieg der Thymidinkinasewerte vor dem zweiten Zyklus, der in der Regel in einem Abstand von 2-4 Wochen auf den ersten Zyklus folgte. Dieses Verhalten betraf überwiegend die Patienten mit kompletter Remission. Vor den Zyklen 3 und 4 nahmen die Werte wiederum ab und bewegten sich auf demselben Niveau wie vor Therapie. Bei den Patienten ohne Remission hingegen stiegen die Werte vor den weiteren Zyklen an bei bereits prätherapeutisch höherem Medianwert. Ein signifikanter Unterschied war weder bei allen Lymphom-Patienten noch bei den aggressiven NHL zu beobachten.

Ein weiterer Tumormarker, der bei Lymphom-Patienten erhöhte Werte im Gegensatz zu gesunden Personen zeigte, ist das CA125. Ungefähr 40% der Patienten mit Lymphomerkrankung weisen Werte über der Norm auf, wobei dies vor allem Patienten in fortgeschrittenen Stadien sind, die meist einen mediastinalen, abdominellen oder extranodalen Befall aufweisen. Bei Verlaufsbeobachtungen hatten Patienten mit kompletter Remission einen signifikanten Abfall, während bei Progression oder Rezidiv das CA125 anstieg (Lazzarino 1998, Bairey 2003). Auch in unserer Studie tendierten die Patienten ohne Remission zu höheren CA125-Werten. Der Unterschied bezüglich des Therapieansprechens

war nicht signifikant. Während der weiteren Zyklen zeigten beide Gruppen eine deutliche Abnahme.

Zuletzt bestimmten wir vor den weiteren Zyklen den Tumormarker CYFRA 21-1 (Zytokeratin 19), der vermehrt bei Zelltod freigesetzt wird. In der Literatur ist dieser Marker überwiegend bei Lungenkarzinomen, aber nicht bei Lymphomen, beschrieben. Die Werte zeigten kaum Unterschiede weder während des zeitlichen Verlaufs noch hinsichtlich des Therapieansprechens.

Die Gruppe der Lymphome ist sehr heterogen. Die Patienten werden dabei histologisch in zahlreiche Untergruppen eingeteilt, die teils verschiedene Therapien erhielten und unterschiedliche Prognosen aufwiesen. Außerdem waren im vorliegenden Kollektiv Lymphom-Patienten unabhängig vom Stadium eingeschlossen. Fortgeschrittene Stadien weisen eine schlechtere Prognose auf. Ebenso befanden sich in diesem Kollektiv alle Altersklassen. Für weitere Studien wäre es sinnvoll, die Nukleosomen getrennt nach Untergruppen und bei wesentlich größeren Fallzahlen zu untersuchen.

## 6.2 Aussagekraft der Marker bei akuter myeloischer Leukämie

Als zweite Gruppe untersuchten wir Patienten mit akuter myeloischer Leukämie. Neben den malignen Lymphomkrankungen sind die Leukämien eine weitere Gruppe der systemischen Krebserkrankungen. Die AML ist die am häufigsten vorkommende Leukämie im Erwachsenenalter. Im Gegensatz zu den Lymphomen, die abhängig von der Klassifizierung, die jeweils geeignete Chemotherapie erhielten, lag bei den AML-Patienten eine einheitliche Therapiestrategie vor mit initialer Induktionstherapie und anschließender Postremissionstherapie. Die AML-Patienten erhielten deshalb bis auf die Rezidiv-Patienten nur zwei verschiedene Therapieschemata als Induktionstherapie.

Die Chemotherapie bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie erfolgt nach kurativem Ansatz. Ziel der Induktionstherapie ist das Erreichen der kompletten Remission, wobei sämtliche Tumorzellen zerstört werden und eine Normalisierung der Hämatopoese einsetzt (Winton 2004). Die anschließende Postremissionstherapie soll ein Rezidiv verhindern und das Gesamtüberleben steigern. Junge AML-Patienten unter 60 Jahren sprechen meist gut auf die Induktionstherapie an und erreichen eine Rate von 70-80% mit kompletter Remission. Bei der Doppel-Induktionstherapie mit TAD/TAD oder TAD/HAM zeigte sich eine komplette Remission in bis zu 71% (Büchner 1999). Ältere Patienten sprechen unglücklicherweise weniger gut auf die Induktionstherapie an und zeigen ein Ansprechen von lediglich 38% – 62% nach Induktion. (Smith 2004, Stone 2004, NCCN 2005)

In den letzten Jahren hat sich hinsichtlich der Einteilung der Patienten mit AML viel verändert. Die FAB-Klassifikation wird heute von der neuen WHO-Klassifikation abgelöst. Bei der FAB-Klassifikation spielen morphologische, zytochemische und immunologische Befunde eine Rolle. Die WHO-Einteilung legt den Schwerpunkt auf eine zytogenetische Klassifizierung, einschließlich morphologischer und anamnestischer Befunde. Die AML-Patienten werden nach der Zytogenetik in drei Risikogruppen eingeteilt: günstig, intermediär und ungünstig. Ziel ist es, die Patienten der geeignetsten Therapie zu zuführen und für die Patienten der Gruppe mit ungünstigem Risiko neue Therapien zu entwickeln. (Grimwade 2001, Byrd 2002, Schoch 2002, Winton 2003, Smith 2004). Zum Beispiel erhalten die Patienten der zytogenetischen Untergruppe  $t(15;17)(q22;q21)$  mit akuter Promyelozytenleukämie als Therapie „all-trans retinoic acid“ (ATRA) (Tallman 1997, Asou 2001), die nicht zu einem Absterben der Tumorzellen sondern zu einer weiteren Ausreifung führt.

#### Prognosefaktoren bei AML

Die Risikoabschätzung erfolgt neben der Zytogenetik durch zahlreiche weitere Prognosefaktoren. Dazu zählen unter anderem das Alter, verschiedene Laborparameter, der prätherapeutische Blastenanteil im Knochenmark, molekulargenetische Daten und der Immunphänotyp. Neben all diesen prätherapeutischen Prognosefaktoren, wobei zur Zeit fast ausschließlich die Zytogenetik relevant ist, zeigte sich, dass ein frühes Therapieansprechen ebenfalls prognostisch von Bedeutung ist (Smith 2004). In einer Studie wurden hierzu Knochenmarkuntersuchungen an Tag 16 ab Therapiebeginn, das heißt eine Woche nach Ende der Induktion, durchgeführt. Dabei korrelierten der Blastenanteil im Knochenmark mit dem Therapieansprechen. Das Erreichen eines frühen Blastenrückgangs sprach für eine günstige Prognose bezüglich kompletter Remission (Kern 2003).

#### Nukleosomen bei AML

In der vorliegenden Studie wurden die Nukleosomenkonzentrationen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie täglich während der ersten Woche der Induktionstherapie bestimmt. Die Nukleosomen-Medianwerte nahmen nach einem anfänglichen leichten Anstieg an Tag 2 bis zum Ende der Woche deutlich ab. Der Median prätherapeutisch betrug 52 ng/ml stieg innerhalb von 24 Stunden nach Applikation der Chemotherapie auf 71 ng/ml und sank bis Tag 6 auf Werte von 25 ng/ml. Die Gesamtvarianzanalyse zeigte, dass die Nukleosomen eine Abhängigkeit von der Zeit aufwiesen.

Dieser zeitliche Verlauf ist folgendermaßen zu erklären. Antileukämische Chemotherapeutika, wie Cytarabin in Kombination mit Daunorubicin und 6-Thioguanin (TAD) oder mit Mitoxantron (HAM), verursachen DNA-Schädigungen oder verhindern die DNA-Synthese, was letztendlich zum Zelltod der Tumorzellen durch Apoptose führt (Müller 1998). Die Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 8 wurde bereits 12-24 Stunden nach Verabreichung der Zytostatika gemessen (Stahnke 2001, Braess 2004). Ebenso wurde nach Gabe von Chemotherapeutika ein Anstieg apoptotischer Zellen beobachtet. Mitoxantron zum Beispiel induziert sehr früh Apoptose und zeigte innerhalb der ersten 24 Stunden eine hohe Rate an Zelltod der Blasten (Halicka 1997). Eine weitere Studie berichtete, dass Cytarabin zytotoxisch wirkt und die Blasten im Knochenmark in einem Zeitraum von 24 Stunden nach Therapiebeginn zu zwei Drittel und nach 96 Stunden komplett reduziert (Braess 2004). Ebenso wurde nachgewiesen, dass Daunorubicin Apoptose induziert mit dem Nachweis charakteristischer morphologischer Zellveränderungen und zur Bildung von nukleosomaler DNA-Fragmenten in akuten myeloischen Zelllinien führt (Quillet-Mary 1996).

Es zeigte sich nicht nur ein signifikanter zeitlicher Unterschied, sondern auch, dass die Nukleosomen bezüglich des Therapieansprechens frühzeitig signifikant unterscheiden. Die Nukleosomenkonzentrationen der Patienten mit kompletter Remission lagen meistens höher als bei den Patienten ohne Remission. Signifikant war diese Differenz bereits prätherapeutisch sowie an den drei darauffolgenden Tagen nach Therapiebeginn. Bei den Patienten mit kompletter Remission waren die Nukleosomenkonzentration während der Tage 1-4 konstant hoch im Gegensatz zu dem frühen Abfall der Werte bei den Patienten ohne Remission.

Nun bot es sich an, diese Ergebnisse in einem integrativem Maß zusammenzufassen. Hierzu wurde die Fläche unter der Kurve (AUC) unter der Kurve von Tag 2-4 ohne den prätherapeutischen Wert von Tag 1 berechnet, um den frühzeitigen direkten Therapieeffekt aufzuzeigen. Anhand dieser Fläche konnte signifikant ( $p = 0,042$ ) zwischen den Patienten mit kompletter Remission und den Patienten ohne Remission unterschieden werden. Darüberhinaus konnte das Therapieansprechen mittels AUC 2-4 sogar mit einer Spezifität von 100% und einer Sensitivität von 56% bei einem Cutoff von 150 ng/ml angezeigt werden. Somit konnte mehr als die Hälfte der Patienten mit kompletter Remission innerhalb der ersten Tage mit hoher Sicherheit identifiziert werden.

Vergleich der Ergebnisse der Nukleosomenwerte bei systemischen Krebserkrankungen und soliden Tumoren

Diese Änderungen der Nukleosomen im Serum bei AML- und Lymphom-Patienten unterschied sich deutlich von den früheren Ergebnissen bei Patienten mit soliden Tumoren. Bei den AML- und Lymphom-Patienten wurden bei kompletter Remission höhere

Nukleosomen-Werte gemessen, während bei den Patienten mit soliden Tumoren die höheren Werte bei den Patienten ohne Therapieerfolg lagen. Diese kontroverse Beobachtung kann möglicherweise durch verschiedene pathophysiologische Hintergründe der Tumorarten erklärt werden.

Bei Patienten mit soliden Tumoren wurden erhöhte Nukleosomen-Werte hauptsächlich bei aggressiven Tumorarten und in bereits fortgeschrittenen Stadien beobachtet. Dies lässt sich durch die bessere Blutversorgung dieser Tumorgewebe erklären. Dadurch kommt es zu einer besseren Anflutung der Zytostatika im Tumorgewebe. Nach spontaner oder therapieinduzierter Apoptose werden die Nukleosomen meist kurz nach der Freisetzung in den Extrazellularraum durch Makrophagen und benachbarte Zellen eliminiert. Sie gelangen also vermutlich nur in die Blutzirkulation bei stark erhöhter Zelltoderate. Deshalb sind die Werte bei progredienten soliden Tumoren wahrscheinlich höher wegen ihrer höheren Aggressivität mit einem höheren Umsatz maligner Zellen durch vermehrte Proliferation und Zelltod.

Bei akuter myeloischer Leukämie befinden sich die malignen Blasten in der Blutzirkulation und im Knochenmark und sind dort für die Zytostatika direkt angreifbar. Dieser Effekt wurde durch die Methode der Flowimmunozytometrie gezeigt, durch die eine erhöhte Zahl apoptotischer peripherer Blutlymphozyten und Blasten in der Zirkulation kurz nach der Applikation von chemotherapeutischen Substanzen gemessen wurde in Abhängigkeit von der Art und der Dosis der Medikamente (Carbonari, 1994; Halicka, 1997). Hohe Raten apoptotischer Zellen und somit hohe Nukleosomenkonzentrationen korrelieren mit erfolgreichem Therapieansprechen, während niedrige Werte eher mit einer Resistenz der Zellen gegen apoptotischen Abbau korrelieren. Aufgrund dessen, dass die Nukleosomen bereits 12–24 Stunden nach einem apoptotischen Ereignis freigesetzt werden (van Nijwenheuze, 2003) und schnell unter physiologischen Bedingungen aus der Zirkulation eliminiert werden, ist der frühe Anstieg mit dem folgenden schnellen Abfall während der Induktionstherapie zu erklären (Gauthier, 1996; Atamaniuk, 2004). Dieser Sachverhalt spricht für eine effektive Elimination der leukämischen Zellen.

#### Weitere Parameter bei AML-Patienten

Um die Information, die wir durch die Nukleosomen erhalten haben, weiter zu konkretisieren, verglichen wir diese mit den Leukozyten, die bei Patienten mit Leukämien und Lymphomen ein wichtiger Verlaufparameter in der Klinik sind. Je höher die Leukozytenwerte umso schlechter ist das Therapieansprechen und umso kürzer das erkrankungsfreie Intervall (disease free survival = DFS) und das Gesamtüberleben (Martin 2000, Nguyen 2002, Revesz 2003, Tavernier 2003, Chang 2004). In unserer Studie gab es lediglich 5 Patienten mit einer

Leukozytose von  $> 10$  G/L. Davon wiederum waren nur zwei in der Gruppe der Patienten ohne Remission.

Der Verlauf der Leukozyten unter Chemotherapie ist bei allen Patienten einheitlich. Die Zytostatika der Induktionstherapie wirken myelotoxisch und führen zu einer vorübergehenden Knochenmarksaplasie. Wie zu erwarten fallen die Leukozytenwerte während dieser ersten Therapiewoche deutlich ab. Am Ende der Woche befanden sich alle Patienten in der Neutropenie. Die Veränderung der Leukozyten über die Zeit während Therapie war signifikant. Wie bei den Nukleosomen zeigte sich, dass die Leukozyten bei den Patienten mit kompletter Remission allerdings erst später, meist ab Tag 4, abfielen im Gegensatz zu den Patienten ohne Remission mit einem sofortigen Leukozytenabfall. Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Therapieansprechens wurde jedoch nicht beobachtet. Nur die Differenz zwischen Tag 1 und 2 ergab eine grenzwertige Signifikanz von  $p = 0,059$ .

Im Gegensatz zu den Leukozyten sind die Thrombozyten und das Hämoglobin prätherapeutisch meist unterhalb des Normbereichs aufgrund der Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark. Der Median der Thrombozyten und des Hämoglobins lagen deutlich unter dem Referenzbereich. In der Literatur ist eine prognostische Bedeutung der Thrombozyten für das Therapieansprechen, das erkrankungsfreie Intervall und das Gesamtüberleben beschrieben. Niedrige Thrombozytenzahlen sprechen dabei für eine schlechte Prognose (Colita 2001, Tavernier 2003). Auch Hämoglobin-Werte von  $< 9$  g/dl gehen mit einem kürzeren Gesamtüberleben einher (Colita 2001).

Durch die Myelosuppression der Zytostatika ist mit einem weiteren Abfall der Thrombozyten zu rechnen. In unserer Studie erfolgte dieser kontinuierlich von Tag 1 bis hin zum Ende der Woche. Dieser zeitliche Verlauf der Thrombozyten ist signifikant. Während die Hämoglobinwerte bezüglich des Medians nahezu unverändert blieben. Beim Vergleich nach dem Therapieansprechen fiel auf, dass die Thrombozyten im Gegensatz zu den anderen Parametern in der Gruppe der Patienten mit kompletter Remission schneller abfielen. Beim Hämoglobin hingegen war ein deutlicherer Abfall in der Gruppe der Patienten ohne Remission zu sehen. Keiner der beiden Parameter konnte signifikant bezüglich des Therapieansprechens unterscheiden.

Die Laktatdehydrogenase (LDH) weist erhöhte Serumspiegel auf bei Patienten mit erhöhtem Zellumsatz, wie er bei malignen Erkrankungen vorkommt. Da die LDH unter anderem in Erythrozyten in größerer Konzentration vorliegt, spielt diese bei hämatologischen Krebserkrankungen eine Rolle. Bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie sind erhöhte Serumkonzentrationen prätherapeutisch meist über der 95% Perzentile Gesunder von 250 U/l zu beobachten (Sadamori 1995, Kern 2003). Unsere Studie bestätigt diese Ergebnisse mit einem Median prätherapeutisch von 338 U/l.

Prätherapeutische LDH-Werte eignen sich zusätzlich als Prognosefaktor für das Therapieansprechen und das Gesamtüberleben. Je höher die LDH vor Therapie umso geringer ist das positive Therapieansprechen und umso kürzer das Überleben. (Nannya 2002, Kern 2003). In unserer Studie gab es bezüglich des prätherapeutischen Wertes kaum Unterschiede in den beiden Patientengruppen.

Im engmaschigen Verlauf während der Induktionstherapie ist folgende Verteilung der LDH in der Literatur beschrieben. Patienten mit kompletter Remission zeigen 72 Stunden nach Therapiebeginn einen Anstieg der LDH, während diejenigen ohne Remission gleichbleibende bis abfallende Werte aufweisen. Bei Bestimmung der LDH nach einem Monat allerdings ergibt sich, dass die LDH bei Patienten mit kompletter Remission absinkt während sie bei Nichtansprechen ansteigt (Pandit 1990, Patel 1994). Auch in unseren Daten sieht man diesen Anstieg der LDH bei Betrachtung der Medianwerte in der Gruppe mit kompletter Remission an Tag 4, was 72 Stunden nach Therapiebeginn entspricht. Die Patienten ohne Remission hingegen zeigen einen geringen Abfall. Eine signifikante Abhängigkeit der LDH vom Therapieansprechen besteht trotz der Unterschiede nicht. Ebenso ist keine signifikante zeitliche Veränderung der LDH zu sehen.

Beim Vergleich der beiden Ansprechgruppen kann bezüglich der LDH kaum ein Unterschied festgestellt werden, obwohl man erwarten würde, dass die Patienten ohne Remission nicht so deutlich abfallen. Unter den sieben Patienten ohne Remission befanden sich vier, die an den Folgen der Knochenmarkhypoplasie verstarben und somit zunächst nicht progredient waren. Außerdem ist die Patientenzahl mit sieben sehr klein.

Die Thymidinkinase ist ein Marker, der bei akuten Leukämien meist erhöht ist. In gegenwärtigen Studien zeigte sich, dass AML-Patienten mit hoher prätherapeutischer Thymidinkinase-Aktivität häufig einen adäquaten Blastenrückgang nach dem ersten Induktionszyklus aufweisen (Jahns-Streubel 1997). In Übereinstimmung mit diesen Daten ergab sich in unserer Studie eine Tendenz zu höheren TK-Werten bei Patienten mit kompletter Remission sowohl prätherapeutisch als auch während des ersten Zyklus. Außerdem ist vorbeschrieben eine Korrelation der Thymidinkinase mit den Blasten im Blut, sowie eine wahrscheinliche Freisetzung der TK aus malignen Blasten bei akuter Leukämie (Hagberg 1984, Sadamori 1995). Damit lässt sich der höhere Anstieg der Thymidinkinase während der ersten Therapiewoche erklären, wenn es zu einer Freisetzung der TK aus den durch die Zytostatika zerstörten Blasten kommt.

Wie oben beschrieben spielt die Zytogenetik bezüglich der Prognose eine wichtige Rolle. Aufgrund der geringen Patientenzahl und der großen Heterogenität der Zytogenetik wurde keine Korrelation bezüglich des Therapieansprechens berechnet. Es zeigte sich, dass bei den

ohne Remission 5 von 7 Patienten keinen normalen Karyotyp aufwiesen im Gegensatz zu den Patienten mit kompletter Remission, bei denen es lediglich 7 von 18 Patienten waren.

Prätherapeutisch haben die Blasten im Knochenmark eine prognostische Aussagekraft. Je höher der Blastenanteil ist, umso schlechter ist das Therapieansprechen. Für den prozentualen Rückgang des Blastenanteils im Knochenmark an Tag 16 nach Induktionsbeginn gilt ebenfalls je höher der Abfall umso besser die Prognose. In unserer Studie zeigte sich jedoch kein prätherapeutischer Unterschied hinsichtlich des Therapieansprechens. Außerdem kam es in beiden Gruppen zu einem starken Abfall der Blasten.

#### Korrelation der Nukleosomen mit den Leukozyten und Blasten

Desweiteren führten wir Korrelationen der Nukleosomen mit den Leukozyten und Blasten durch, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen dem Ursprung der Nukleosomen und den Leukozyten und Blasten herzustellen. Die Korrelationsanalyse zeigte einen besonderen Zusammenhang zwischen den Leukozyten an Tag 2 mit der Nukleosomenkonzentration im Serum an Tag 2 ( $p=0,009$ ), sowie bezüglich der Differenz von Tag 2 zu Tag 1 zwischen diesen beiden Parametern ( $p=0,001$ ). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Leukozyten eine wichtige Quelle oder nicht zuletzt ein Stimulator sind für die Freisetzung der Nukleosomen in die Blutzirkulation oder ihre Elimination aus der Zirkulation verhindern können. Diese Korrelation war besonders relevant für die Patienten mit kompletter Remission, aber nicht für die Patienten ohne Remission. Die höheren Nukleosomenkonzentrationen scheinen hauptsächlich das Ergebnis einer effektiven Blastenreduktion zu sein.

Dies bestätigte sich bei den Korrelationsberechnungen zwischen den Nukleosomen und Blasten. Es bestand eine signifikante Korrelation zwischen der Fläche unter der Kurve von Tag 2-4 der Nukleosomen und dem Blastenrückgang von Tag 1 zu Tag 16. Je größer die Fläche unter der Kurve umso größer war der Blastenrückgang. Bezüglich des Therapieansprechens konnten weder die prätherapeutischen Blastenwerte noch der Blastenabfall signifikant unterscheiden.

Aufgrund der hohen Aggressivität und der Nebenwirkungen der Chemotherapie ist es wichtig, das Therapieansprechen frühzeitig und möglichst durch nicht invasive Methoden vorauszusagen. Neben den malignen Zellen werden durch die Zytostatika auch andere schnell proliferierende Zellen geschädigt, was zu den bereits oben genannten Nebenwirkungen der Myelotoxizität einschließlich Anämie, Leukozytopenie und Thrombozytopenie führt. Ebenso gehören hierzu Schleimhautentzündungen und gastrointestinale Symptome. Zusätzlich sind spezifische Nebenwirkungen einiger Chemotherapeutika bekannt, wie Lungentoxizität bei Cytarabin und Kardiotoxizität bei Daunorubicin und Mitoxantron.

## 7. Zusammenfassung

Entgegen unseren Erwartungen wiesen die Nukleosomen-Verläufe bei den Lymphom-Patienten keine einheitliche Tendenz auf. Die Gesamtvarianzanalyse der Nukleosomen ergab weder eine zeitliche Abhängigkeit noch einen signifikanten Unterschied bezüglich des Therapieansprechens. Die Gruppe der Lymphom-Patienten war hinsichtlich der Histologie, der Stadien und des Alters sehr heterogen, was auf ein unterschiedliches Verhalten der Nukleosomfreisetzung unter verschiedenen Therapien schließen lässt. Bei den Lymphomen wäre eine getrennte Untersuchung homogener Untergruppen notwendig.

Bei den Patienten mit akuter myeloischer Leukämie zeigte sich während des ersten Zyklus der Induktionstherapie bei fast allen Patienten eine tendenzielle Abnahme der Nukleosomen-Werte, in manchen Fällen nach einem initialen Anstieg. Höhere Nukleosomenkonzentrationen korrelierten dabei signifikant mit einem günstigen Therapieansprechen. Signifikant war dieser Unterschied prätherapeutisch und an den Tagen 2–4 nach Therapiebeginn.

Die Fläche unter der Kurve von Tag 2-4 der Nukleosomen zeigte als integratives Maß den frühzeitigen Effekt der Induktionstherapie. Patienten mit kompletter Remission wiesen größere Flächen unter der Kurve auf. Bei einer Spezifität von 100% für das Nicht-Erreichen einer Remission ergab sich bei einem Cutoff von 150 ng/ml die Sensitivität von 56% für das Ansprechen auf Therapie.

Es zeigte sich, dass nur die Nukleosomen bei den Patienten mit akuter myeloischer Leukämie das Therapieansprechen frühzeitig beurteilen können. Alle anderen Marker wie die Leukozyten, die Thrombozyten, das Hämoglobin, die Laktatdehydrogenase und die Thymidinkinase konnten bezüglich des Therapieansprechens nicht signifikant unterscheiden. Eine signifikante zeitliche Veränderungen während der Induktionstherapie ergab sich neben den Nukleosomen bei den Leukozyten, Thrombozyten und der Thymidinkinase.

Der Verlauf der Nukleosomen während der Induktionstherapie bei AML-Patienten zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die Leukozyten. Die Nukleosomenwerte an Tag 2 korrelierten signifikant mit den Leukozyten an Tag 2 sowie mit der Differenz von Tag 2 zu Tag 1. Die Differenz der Nukleosomen korrelierte ebenfalls mit der Differenz der Leukozyten an den ersten beiden Tagen. Desweiteren wurden die Nukleosomen mit den Blasten im Knochenmark korreliert. Die prätherapeutischen Nukleosomen korrelierten invers mit Tag 16 der Blasten, sowie proportional mit dem Blastenrückgang von Tag 1 zu Tag 16. Dasselbe galt für die Fläche unter der Kurve von Tag 2-4. Je größer der Abfall der Blasten war, umso größer war auch die Fläche unter der Kurve von Tag 2-4 der Nukleosomen. Vor allem die

Korrelation mit den Blasten lässt darauf schließen, dass die Blasten ein wahrscheinlicher Ursprung der Nukleosomenfreisetzung sind.

Um diese Ergebnisse vor allem bei den Patienten mit AML zu validieren, sind weitere prospektive Studien mit größeren Fallzahlen notwendig. Außerdem wäre es dann möglich, die Nukleosomen mit weiteren Prognosefaktoren zu korrelieren, wie zum Beispiel mit der Zytogenetik oder dem Immunphänotyp. Besonders sinnvoll wäre dies für AML-Patienten, die keiner Prognosegruppe zugeordnet werden können. Ca. 50% der Patienten haben keine zytogenetischen Auffälligkeiten und weisen einen normalen Karyotyp auf und nicht bei all diesen Patienten können Molekularmarker nachgewiesen werden. Somit wäre es gerade in diesen Patientengruppen notwendig einen Marker zu haben, der das Therapieansprechen frühzeitig beurteilen kann.

## 8. Literaturverzeichnis

- Adida C, Recher C, Raffoux W, Daniel MT, Taksin AL, Rousselot P, Sigaux F, Degos L, Altieri DC, Dombret H. Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukemia. *Br J Haematol.* 2000; 111: 196-203.
- Anker P, Mulcahy H, Chen XO, Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients. *Cancer Metastasis Rev.* 1999; 18: 65-73.
- Anker P, Mulcahy H, Stroun M. Circulating nucleic acids in plasma and serum as a noninvasive investigation for cancer: Time for Large-Scale Clinical Studies? *Int J Cancer.* 2003; 103: 149-152.
- Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol.* 1990; 136: 593-608.
- Asou N, Adachi K, Tamura U, Kanamura A, Kageyama S, Hiraoka A, Omoto E, Akiyama H, Tsubaki K, Saito K, Kuriyama K, Oh H, Kitano K, Miyawaki S, Takeyama U, Yamada O, Nishikawa K, Takahashi M, Matsuda S, Ohtake H, Ohno R. Analysis of prognostic factors in newly diagnosed patients with acute promyelocytic leukemia: The APL92 study of the Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG). *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001; 48 (Suppl 1): S65-S71.
- Atamaniuk J, Vidotto C, Tschan H, Bachl N, Stuhlmeier KM, Muller MM. Increased concentrations of cell-free plasma DNA after exhaustive exercise. *Clin Chem.* 2004; 50: 1668-1670.
- Au WY, Pang A, Choy C, Chim CS, Kwong YL. Quantification of circulating Epstein-Barr virus (EBV) DNA in the diagnosis and monitoring of natural killer cell and EBV-positive lymphomas in immunocompetent patients. *Blood.* 2004; 104: 243-249.
- Aviles A, Zepeda G, Diaz-Maqueo JC, Rodriguez L, Guzman R, Garcia EL, Talavera A. Beta 2 microglobulin level as an indicator of prognosis in diffuse large cell lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 1992; 7: 135-138.
- Axdorph U, Sjoberg J, Grimfors G, Landgren O, Porwit-MacDonald A, Bjorkholm M. Biological markers may add to prediction of outcome achieved by the International Prognostic Score in Hodgkin's disease. *Ann Oncol.* 2000; 11: 1405-1411.
- Bairey O, Blickstein D, Stark P, Prokocimer M, Nativ HM, Kirgner I, Shaklai M. Serum CA 125 as a prognostic factor in non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2003; 44: 1733-1738.
- Bairey O, Benjamini O, Blickstein D, Elis A, Ruchlemer R. Non-Hodgkin's lymphoma in patients 80 years of age or older. *Ann Oncol.* 2006; 17: 928-934.
- Balducci L. Myelosuppression and its consequences in elderly patients with cancer. *Oncology (Williston Park).* 2003; 17 (11 Suppl 1): 27-32.
- Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Erpelinck C, van Putten WLJ, Valk PJM, van der Poel-van de Luytgaarde S, Hack R, Slater R, Smit EME, Beverloo HB, Verhoef G, Verdonck LF, Ossenkoppele GJ, Sonneveld P, de Greef G, Löwenberg B, Delwel R. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: A study of 319 de novo AML patients. *Blood.* 2003; 101: 837-845.
- Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia. *Biochem Pharmacol.* 1990; 40: 2353-2362.
- Berger DP, Engelhardt R. Grundlagen der Chemotherapie in: *Das Rote Buch: Hämatologie und internistische Onkologie / Berger, Engelhardt, Mertelsmann, 2. überarb. und erw. Aufl. – Landsberg/Lech: ecomed-Verl.-Ges., 2002. Seiten 45-49.*
- Bienz M, Ludwig M, Mueller BU, Oppliger Leibundgut E, Ratschiller D, Solenthaler M, Fey MF, Pabst T. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotyp. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 1416-1424.
- Bouafia F, Drai J, Bienvenu J, Thieblemont C, Espinouse D, Salles G, Coiffier B. Profiles and prognostic value of serum LDH isoenzymes in patients with haematopoietic malignancies. *Bulletin du Cancer.* 2004; 91: 10229-40.
- Brandt L, Kimby E, Nygren P, Glimelius B. A systemic overview of chemotherapy effects in Hodgkin's disease. *Acta Oncologica.* 2001(a); 2/3: 185-197.
- Brandt L, Kimby E, Nygren P, Glimelius B. A systemic overview of chemotherapy effects in indolent lymphoma. *Acta Oncologica.* 2001(b); 2/3: 213-223.

- Braess J, Schneiderat P, Schoch C, Fiegl M, Lorenz I, Hiddemann W. Functional analysis of apoptosis induction in acute myeloid leukaemia-relevance of karyotype and clinical treatment. *Br J Haematol.* 2004; 126: 338-347.
- Brunner B, Gansilius E, Schumacher P, Zwiersina H, Gastl G, Stauder R. Blood levels of angiogenin and vascular endothelial growth factor are elevated in myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002; 11: 119-125.
- Büchner T, Hiddemann W, Wörmann B, Löffler H, Gassmann W, Haferlach T, Fonatsch C, Haase D, Schoch C, Hossfeld D, Lengfelder E, Aul C, Heyll A, Maschmeyer G, Ludwig WD, Sauerland MC, Heinecke A. Double inductin strategy for acute myeloid leukemia: The effect of high-dose cytarabine With mitoxantrone instead of standard-dose cytarabine with daunorubicin and 6-thioguanine: A Randomized Trial by the German AML Cooperative Group. *Blood.* 1999; 93: 4116-4124.
- Büchner T, Hiddemann W, Berdel WE, Wörmann B, Schoch C, Fonatsch C, Löffler H, Haferlach T, Ludwig WD, Maschmeyer G, Staib P, Aul C, Grüneisen A, Lengfelder E, Frickhofen N, Kern W, Serve HL, Mesters RM, Sauerland MC, Heinecke A. 6-thioguanine, cytarabine, and daunorubicine (TAD) and high-dose cytarabine and mitoxantrone (HAM) for induction , TAD for consolidation, and either prolonged maintenance by intensive consolidation by sequential HAM in adult patients at all ages with de novo acute myeloid leukemia (AML): A randomized trial of the German AML Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 2003; 21: 4496-4504.
- Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PRK, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD. Pretreatment cytogenetics abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood.* 2002; 100: 4325-4335.
- Carbonari M, Cibati M, Cherchi M, Sbarigia D, Pesce AM, Dell'Anna L, Modica A, Fiorilli M. Detection and characterization of apoptotic peripheral blood lymphocytes in human immunodeficiency virus infection and cancer chemotherapy by a novel flow immunocytometric method. *Blood.* 1994; 83: 1268-1277.
- Cartwright RA, Watkins G. Epidemiology of Hodgkin's disease: A review. *Hematol Oncol.* 2004; 22: 11-16.
- Chan KC, Zhang J, Chan AT, Lei KI, Leung SF, Chan LY, Chow KC, Lo YMD. Molecular characterization of circulating EBV-DNA in the plasma of nasopharyngeal carcinoma and lymphoma patients. *Cancer Res.* 2003; 63: 2028-2032.
- Chang H, Salma F, Yi QL, Patterson B, Brien B, Minden MD. Prognostic relevance of immunophenotyping in 379 patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* 2004; 28: 43-48.
- Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. National Cancer Institute-sponsored working group guidelines for chronic lymphatic leukemia: Revised guideline for diagnosis and treatment. *Blood.* 1996; 87: 4990-4997.
- Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fisher RI, Connors JM, Lister AT, Vose J, Grillo-Lope A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippenstein D, Hiddemann W, Castel. Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 1244-1253.
- Chow KU, Nowak D, Kim SZ, Schneider B, Komor M, Boehrer S, Mitrou PS, Hoelzer D, Weidmann E, Hofmann WK. In vivo drug-response in patients with leukemic non-Hodgkin's lymphomas is associated with in vitro chemosensitivity and gene expression profiling. *Pharmacol Res.* 2006; 53: 49-61.
- Coiffier B. Immunochemotherapy: The new standard in aggressive non-Hodgkin's lymphoma in the elderly. *Semin Oncol.* 2003; 1Suppl2: 21-27.
- Colita A, Belhabri A, Chelghoum Y, Charrin C, Fiere D, Thomas X. Prognostic factors and treatment effects on survival in acute myeloid leukemia of M6 subtype: a retrospectiv study of 54 cases. *Ann Oncol.* 2001; 12: 451-455.
- Conconi A, Zucca E, Roggero E, Bertoni F, Bernasconi A, Mingrone W, Pedrinis E, Cavalli F. Prognostic models for diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol Oncol.* 2000; 18: 61-73.

- Crawford J, Dale DC, Lyman GH. Chemotherapy-induced neutropenia. *Cancer*. 2004; 100: 228-237.
- Debatin KM. The role of CD95 system in chemotherapy. *Drug Resist Updat*. 1999; 2: 85-90.
- Debatin KM, Stahnke K, Fulda S. Apoptosis in hematological disorders. *Semin Cancer Biol*. 2003; 13: 149-158.
- Deligezer U, Yaman F, Erten N, Dalay N. Frequent copresence of methylated DNA and fragmented nucleosomal DNA in plasma of lymphoma patients. *Clin Chim Acta*. 2003; 335: 89-94.
- Deligezer U, Erten N, Akisik EE, Dalay N. Circulating fragmented nucleosomal DNA and caspase-3 mRNA in patients with lymphoma and myeloma. *Exp Mol Pathol*. 2006; 80: 72-76.
- Dilek I, Ayakta H, Demir C, Meral C, Ozturk M. CA 125 levels in patients with non-Hodgkin lymphoma and other hematologic malignancies. *Clin Lab Haematol*. 2005; 27: 51-55.
- Doi S, Naito K, Yamada K. Serum deoxythymidine kinase as a progressive marker of hematological malignancy. *Nagoya J Med Sci*. 1990; 52: 19-26.
- Dreyling MH, Forstpointner R, Repp R. et al. Combined immuno-chemotherapy (R-FCM) results in superior remission and survival rates in recurrent follicular and mantle cell lymphoma – final results of a prospective trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Blood*. 2003; 102: 103a, abstract 351.
- Dührens U. Lymphome. In Ehninger G, Petrasch S. *Aktuelle Onkologie. Hämatologie/Onkologie Update 2001*. 1. Aufl. München, Bern, Wien, NY. W. Zuckschwerdt Verlag, 2001; 115: 60-139.
- Ehlert JE, Kubbutat MHG. Apoptosis and its relevance in cancer therapy. *Onkologie*. 2001; 24: 433-440.
- Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*. 1998; 391: 43-50.
- European Society for Medical Oncology. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up newly diagnosed follicular lymphoma. *Ann Oncol*. 2003; 14: 1163-1164.
- Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med*. 2005; 266: 699-717.
- Ferrara F. Unanswered questions in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 2004; 5: 443-450.
- Fisher RI. Overview of non-Hodgkin's lymphoma: biology, staging, and treatment. *Semin Oncol*. 2003; 30 (2Suppl4): 3-9.
- Ford HL, Pardee AB. Cancer and cell cycle. *J Cell Biochem*. 1999; 32/33: 166-172.
- Fournie GJ, Courtin JP, Laval F, Chale JJ, Pourrat JP, Pujazen MC, Lauque D, Carles P. Plasma DNA as a marker of cancerous cell death. Investigations in patients suffering from lung cancer and in nude mice bearing human tumours. *Cancer Lett*. 1995; 91: 221-227.
- Garcia R, Hernandez JM, Caballero MS, Gonzalez M, Galende J, del Canizo MC, Vazquez L, San Miguel JF. Serum lactate dehydrogenase level as a prognostic factor in Hodgkin's disease. *Br J Cancer*. 1993; 68: 1227-1231.
- Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewski M, Horsman DE, Tolcher AW, O'Reilly SE, Hoskins P, Coldman AJ, Reed JC, Connors JM. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997; 90: 244-251.
- Gauthier VJ, Tyler LN, Mannik M. Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice. *J Immunol*. 1996; 156: 1151-1156.
- Gilliland DG, Griffin JD. Role of FLT3 in leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2002; 9: 274-281.
- Greenstein S, Ghias K, Krett NL, Rosen ST. Mechanism of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. *Clin Cancer Res*. 2002; 8: 1681-1694.
- Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH, on behalf of the Medical Research Council Adult Leukemia Working Party. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older patients with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML 11 trial. *Blood*. 2001; 98: 1312-1320.
- Gronowitz JS, Hagberg H, Kallander CF, Simonsson B. The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Cancer*. 1983; 47: 487-495.

- Hagberg H, Gronowitz S, Killander A, Källander C, Simonsson B, Sundström C, Öberg G. Serum thymidine kinase in acute leukaemia. *Br J Cancer*. 1984; 49: 537-540.
- Hagemeister F, Cabanillas F, Coleman M, Greogory SA, Zinzani PL. The role of mitoxantrone in the treatment of indolent lymphomas. *Oncologist*. 2005; 10: 150-159.
- Halicka HD, Seiter K, Feldman EJ, Traganos F, Mittelman A, Ahmed T, Darzynkiewicz Z. Cell cycle specificity of apoptosis during treatment of leukaemias. *Apoptosis*. 1997; 2: 25-39.
- Hallek M, Emmerich B, Strohmeyer S, Busch R, Reichle A, Senekowitsch R. Activity of serum thymidine kinase in non-Hodgkin lymphoma: relationship to other prognostic factors. *Klin Wochenschr*. 1988; 66: 718-723.
- Hallek M, Wanders L, Strohmeyer S, Emmerich B. Thymidine kinase: a tumor marker with prognostic value for non-Hodgkin's lymphoma and a broad range of potential clinical applications. *Ann Hematol*. 1992; 65: 1-5.
- Hannun YA. Apoptosis and the dilemma of cancer therapy. *Blood*. 1997; 89: 1845-1853.
- Hasenclever D, Diehl V. A prognostic score for advanced Hodgkin's disease. International prognostic factors project on advanced Hodgkin's disease. *N Engl J Med*. 1998; 339: 1506-1514.
- Hengartner MO. Apoptosis: Corraling the corpses. *Cell*. 2001; 104: 325-328.
- Hennessy BT, Hanrahan EO, Daly PA. Non-Hodgkin lymphoma: an update. *Lancet Oncol*. 2004; 5: 341-353.
- Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood*. 2001; 98: 2603-2614.
- Herrera LJ, Raja S, Gooding WE, El-Hefnawy T, Kelly L, Luketich JD, Godfrey TE. Quantitative analysis of circulating plasma DNA as a tumor marker in thoracic malignancies. *Clin Chem*. 2005; 51: 113-118.
- Hiddemann W, Longo DL, Coiffier B, Fisher RI, Cabanillas F, Cavalli F, Nadler LM, De Vita VT, Lister TA, Armitage JO. Lymphoma classification – the gap between biology and clinical management is closing. *Blood*. 1996; 88: 4085-4089.
- Hiddemann W, Dreyling M, Unterhalt M. Rituximab plus chemotherapy in follicular and mantle cell lymphomas. *Semin Oncol*. 2003; 30 (1Suppl2): 16-20.
- Hiller E, Busch M, Waterhouse C, Sandherr M, Feldmann HJ. Morbus Hodgkin (Lymphgranulomatose). Tumorzentrum München. *MANUAL Maligne Lymphome*. 2000: 40-56.
- Holdenrieder S, Stieber P, Foerg T, Kuehl M, Schulz L, Busch M, Schalhorn A, Seidel D. Apoptosis in serum of patients with solid tumours. *Anticancer Res*. 1999; 19: 2721-2724.
- Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmueller H, Busch M, Fertig G, Fuerst H, Schalhorn A, Schmeller N, Untch M, Seidel D. Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases. *Int J Cancer*. 2001(a); 95: 114-120.
- Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmueller H, Fertig G, Fuerst H, Schmeller N, Untch M, Seidel D. Nucleosomes in serum as a marker for cell death. *Clin Chem Lab Med*. 2001(b); 39: 596-605.
- Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmueller H, Busch M, von Pawel J, Schalhorn A, Nagel D, Seidel D. Circulating nucleosomes in serum. *Ann N Y Acad Sci*. 2001(c); 945: 93-102.
- Holdenrieder S, Stieber P, von Pawel J, Raith H, Nagel D, Feldmann K, Seidel D. Circulating nucleosomes predict the response to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2004(a); 10: 5981-5987.
- Holdenrieder S, Stieber P. Apoptotic markers in cancer. *Clin Biochem*. 2004(b); 37: 605-617.
- Holdenrieder S, Stieber P, Chan LYS, Geiger S, Kremer A, Nagel D, Lo YMD. Circulating nucleic acids in plasma and serum – comparison of ELISA and quantitative PCR. *Clin Chem*. 2005; 49: 35.
- Jahns-Streubel G, Reuter C, auf der Landwehr U, Unterhalt M, Schleyer E, Wörmann B, Büchner T, Hiddemann W. Activity of thymidine kinase and of polymerase  $\alpha$  as well as activity and gene expression of deoxycytidine deaminase in leukemic blasts are correlated with clinical response in setting of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-based priming before and during TAD-9 induction therapy in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1997; 90: 1968-1976.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. DNA fragments in blood plasma of cancer patients: Quantitation and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001; 61: 1659-1665.

- Johnson PW, Whelan J, Longhurst S, Stepaniewska K, Matthews J, Amess J, Norton A, Rohatiner AZ, Lister TA. Beta-2 microglobulin: a prognostic factor in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer*. 1993; 67: 792-797.
- Johnson PJ, Lo YMD. Plasma nucleic acids in the diagnosis and management of malignant disease. *Clin Chem*. 2002; 48: 1186-1193.
- Johnson PWM, Glennie MJ. Rituximab: mechanism and applications. *Br J Cancer*. 2001; 85: 1619-1623.
- Johnson P, Glennie M. The mechanism of action of rituximab in the elimination of tumor cells. *Semin Oncol*. 2003; 30 (1 Suppl 2): 3-8.
- Kern W, Haferlach T, Schoch C, Loeffler H, Gassmann W, Heinecke A, Sauerland MC, Berdel W, Buechner T, Hiddemann W. Early blast clearance by remission induction therapy is major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML-Cooperative Group (AMLCG) 1992. *Blood*. 2003; 101: 64-70.
- Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *cancer*. 1994; 73: 2013-2026.
- Kimby E, Brandt L, Nygren P, Glimelius B. A systemic overview of chemotherapy effects in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Acta Oncologica*. 2001; 2/3: 198-212.
- Kluwer Academic Publisher. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of Hodgkin's disease. *Ann Oncol*. 2001; 12: 1213-1214.
- Kornberg RD. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. Chromatin structure is based on a repeating unit of eight histone molecule and about 200 DNA base pairs. *Science*. 1974; 184: 868-871.
- Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *cell*. 1999; 98: 285-294.
- Krammer PH. Apoptose. *Deutsches Ärzteblatt*. 2000; 97: 1752-1759.
- Kremer A., Wilkowski R, Holdenrieder S, Nagel D, Stieber P, Seidel D. Nucleosomes in pancreatic cancer patients during radiochemotherapy. *Tumour Biol*. 2005; 26: 44-49.
- Kuroi K, Tanaka C, Toi M. Clinical significance of plasma nucleosome levels in cancer patients. *Int J Oncol*. 2001; 19: 143-148.
- Lazzarino M, Orlandi E, Klersy C, Astori C, Brusamolino E, Corso A, Bellio L, Gargantini L, Morra E, Bernasconi C. Serum CA 125 is of clinical value in the staging and follow-up of patients with non-Hodgkin's lymphoma. Correlation with tumor parameters and disease activity. *Cancer*. 1998; 82: 576-582.
- Lei KIK, Chan LYS, Chan WY, Johnson PJ, Lo YMD. Quantitative analysis of circulating cell-free Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels in patients with EBV-associated lymphoid malignancies. *Br J Haematol*. 2000; 111: 239-246.
- Lei KIK, Chan LYS, Chan WY, Johnson PJ, Lo YMD. Diagnostic and prognostic implications of circulating cell-free Epstein-Barr Virus DNA in Natural Killer/T-Cell lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2002; 8: 29-34.
- Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977; 37: 646-650.
- Lichtenstein AV, Melkonyan HS, Tomei LD, Umansky SR. Circulating nucleic acids and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 945: 239-249.
- Litam P, Swan F, Cabanillas F, Tucker SL, McLaughlin P, Hagemester FB, Rodriguez MA, Velasquez WS. Prognostic value of serum beta-2 microglobulin in low-grade lymphoma. *Ann Intern Med*. 1991; 114: 855-860.
- Lo YMD, Tein MSC, Pang CCP, Yeung CK, Tong KL, Hjelm NM. Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver transplant recipients. *Lancet*. 1998; 351: 1329-1330.
- Lo YMD, Chan LYS, Lo K, Leung S, Zhang J, Chan ATC, Lee JCK, Hjelm NM, Johnson PJ, Huang DP. Quantitative analysis of cell-free Epstein-Barr Virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 1999(a); 59: 1188-1191.

- Lo YMD, Chan LYS, Chan ATC, Leung SF, Lo KW, Zhang J, Lee JCK, Hjelm NM, Johnson PJ, Huang DP. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr Virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 1999(b); 59: 5452-5455.
- Lo YMD, Leung SF, Chan LYS, Chan ATC, Lo KW, Johnson PJ, Huang DP. Kinetics of plasma Epstein-Barr Virus DNA during radiation therapy for nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 2000; 60: 2351-2355.
- Löwenberg B, Griffin JD, Tallman MS. Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003;: 82-101.
- Luger K. Structure and dynamic behavior of nucleosomes. *Curr Opin Genet Dev.* 2003; 13: 127-135.
- Luger K. Dynamic nucleosomes. *Chromosome Res.* 2006; 14: 5-16.
- Maloney DG, Smith B, Rose A. Rituximab: mechanism of action and resistance. *Semin Oncol.* 2002; 29 (1 Suppl 2): 2-9.
- Marcucci G, Mrozek K, Bloomfield CD. Molecular heterogeneity and prognostic biomarkers in adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics. *Curr Opin Hematol.* 2005; 12: 68-75.
- Martin G, Barragan E, Bolufer P, Chillon C, Garcia-Sanz R, Gomez T, Brunet S, Gonzalez M, Sanz MA. Relevance of presenting white blood cell count and kinetics of molecular remission in the prognosis of acute myeloid leukemia with CBFbeta/MYH11 rearrangement. *Haematologica.* 2000; 85: 699-703.
- Martinsson U, Glimelius B, Hagberg H, Sundstrom C. Prognostic relevance of serum-markers in relation to histopathology, stage and initial symptoms in advanced low-grade non-Hodgkin lymphomas. *Eur J Haematol.* 1988; 40: 289-298.
- Morra E. The biological markers of non-Hodgkin's lymphomas: their role in diagnosis, prognostic assessment and therapeutic strategy. *Int J Biological Markers.* 1999; 14: 149-153.
- Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. P53 activates the CD 95 (Apo-1/Fas) gene in response to DNA-damage by anticancer therapy. *J Exp Med.* 1998; 188: 2033-2045.
- Musulino C, Allegra A, Orlando A, Grosso P, Alonci A, Cincotta M, Squadrito G. Prognostic value of serum thymidine kinase and beta 2 microglobulin in subjects affected by multiple myeloma. *Riv Eur Sci Med Farmacol.* 1990; 12: 233-238.
- Mutirangura A, Pronthanakasem W, Theamboonlers A, Sriuranpong V, Lertsanguansinchi P, Yenrudi S, Voravud N, Supiyaphun P, Poovorawan Y. Epstein-Barr viral DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1998; 6: 665-669.
- Nannya Y, Kanda Y, Oshima K, Kaneko M, Yamamoto R, Chizuka A, Hamaki T, Suguro M, Matsuyama T, Takezako N, Miwa A, Togawa A. Prognostic factors in elderly patients with acute myelogenous leukemia : a single center study in Japan. *Leuk Lymphoma.* 2002; 43: 83-87.
- Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, Lo ES, Rainer TH, Johnson PJ, Lo YMD. Presence of filterable and nonfilterable mRNA in the plasma of cancer patients and healthy individuals. *Clin Chem.* 2002; 48: 1212-1217.
- Nguyen S, Leblanc T, Fenaux P, Witz F, Blaise D, Pigneux A, Thomas X, Rigal-Huguet F, Lioure B, Auvrignon A, Fiere D, Reiffers J, Castaigne S, Leverger G, Harousseau JL, Socie G, Dombret H. A white blood cell index as the main prognostic factor in t(8;21) acute myeloid leukemia (AML): a survey of 161 cases from the French AML Intergroup. *Blood.* 2002; 99: 3517-3523.
- Nieuwenhuijze van AE, van Lopik T, Smeenk RJ, Aarden LA. Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62: 10-14.
- Niitsu N, Okabe-Kado J, Nakayama M, Wakimoto N, Sakashita A, Maseki N, Matoyoshi K, Umeda M, Honma Y. Plasma levels of the differentiation inhibitory factor nm21-H1 protein and their clinical implications in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2000; 96: 1080-1086.
- O'Donnel MR. et al. Acute myeloid leukemia. Clinical practice guidelines in oncology – Version 2.2005. National Comprehensive Cancer Network.
- O'Neill J, Manion M, Schwartz P, Hockenbery DM. Promises and challenges of targeting Bcl-2 anti-apoptotic proteins for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1705: 43-51.

- Pandit MK, Joshi BH, Patel PS, Chitnis KE, Balar DB. Efficacy of serum lactate dehydrogenase and its isozymes in monitoring the therapy in patients with acute leukemia. *Indian J Pathol Microbiol.* 1990; 33: 41-47.
- Patel PS, Adhvaryu SG, Balar DB. Serum lactate dehydrogenase and its isoenzymes in leukemia patients: possible role in diagnosis and treatment monitoring. *Neoplasma.* 1994; 41: 55-59.
- Patel PS, Adhvaryu SG, Baxi BR. Tumor markers in leukemia: evaluation of serum levels of different forms of sialic acid, Regan isoenzyme and lactate dehydrogenase. *Int J Biol Markers.* 1991; 6: 177-182.
- Pavlidis AN, Kalef-Ezra J, Bourantas LC, Lambrou A, Mavridis A. Serum tumor markers in non-Hodgkin's lymphomas and chronic lymphocytic leukemia. *Int J Biol Markers.* 1993; 8: 14-20.
- Petak I, Houghton JA. Shared pathways: death receptors and cytotoxic drugs in cancer therapy. *Pathol Oncol Res.* 2001; 7: 95-106.
- Poley S, Stieber P, Nussler V, Pahl H, Fateh-Moghadam A. Serum thymidine kinase in non-Hodgkin lymphomas with special regard to multiple myeloma. *Anticancer Res.* 1997; 17: 3025-3029.
- Poppe B, Vandesompele J, Schoch C, Lindvall C, Mrozek K, Bloomfield CD, Beverloo HB, Michaux L, Dastugue N, Herens C, Yigit N, De Paepe A, Hagemeijer A, Speleman F. Expression analyses identify MLL as a prominent target of 11q23 amplification an support on etiologic role for MLL gain of function in myeloid malignancies. *Blood.* 2004; 103: 229-235.
- Quillet-Mary A, Mansat V, Duchayne E, Come MG, Allouche M, Bailly JD, Bordier C, Laurent G. Daunorubicin-induced internucleosomal DNA fragmentation in acute myeloid cell lines. *Leukemia.* 1996; 10: 417-425.
- Rehn S, Gronowitz JS, Källander C, Sundström C, Glimelius B. Deoxythymidine kinase in the tumour cells and serum of patients with non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Cancer.* 1995; 71: 1099-1105.
- Reinhold U, Schröder CH. Diagnostische Bedeutung frei zirkulierender Nukleinsäuren. *Deutsches Ärzteblatt.* 2002; 99, Heft 18: A1224-A1228.
- Repp R, Schaekel U, Helm G, Thiede C, Soucek S, Pascheberg U, Wandt H, Aulitzky W, Bodenstern H, Sonnen R, Link H, Ehninger G, Gramatzki M, AML-SHG Study Group. Immunophenotyping is an independent factor for risk stratification in AML. *Cytometry B Clin Cytom.* 2003; 53: 11-19.
- Revesz D, Chelghoum Y, Le QH, Elhamri M, Michallet M, Thomas X. Salvage by timed sequential chemotherapy in primary resistant acute myeloid leukemia: analysis of prognostic factors. *Ann Hematol.* 2003; 82: 684-690.
- Ries L, Eisner M, Kosary C, et al. (2004) SEER Cancer Statistics Review, 1975-2001, national Cancer Institute. [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2002/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/). National Cancer Institute.
- Rumore P, Mavalidhar B, Lin B, Lai C, Steinman CR. Haemodialysis as a model for studying endogenous plasma DNA: oligonucleosome-like structure and clearance. *Clin Exp Immunol.* 1992; 90: 56-62.
- Sadamori N, Ichiba M, Mine M, Hakariya S, Hayashibara T, Itoyama T, Nakamura H, Tomonaga M, Hayashi K. Clinical significance of serum thymidine kinase in adult T-cell leukaemia and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 1995; 90: 100-105.
- Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, Denton M, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Apoptosis: definition, mechanism, and relevance to disease. *Am J Med.* 1999; 107: 489-506.
- Schmits R, Hartmann F, Pfreundschuh M. Neue Standards in der Therapie aggressiver Lymphome. *Onkologie.* 2001; 7: 998-1013.
- Schoch C, Haferlach T. Cytogenetics in acute myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep.* 2002; 4: 390-397.
- Schultz DR, Harrington J. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum.* 2003; 32: 345-369.
- Shan D, Ledbetter JA, Press OW. Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2000; 48: 673-683.
- Shapiro B, Chakrabarty M, Cohn EM, Leon SA. Determination of circulating DNA levels in patients with benign and malignant gastrointestinal disease. *Cancer.* 1983; 51: 2116-2120.
- Shipp et al. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The international non-Hodgkin's lymphoma prognostic factors project. *N Engl J Med.* 1993; 329: 987-994.
- Smith M, Barnett M, Bassan R, Gatta G, Tondini C, Kern W. Adult acute myeloid leukemia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 2004; 50: 197-222.

- Sozzi G, Conte D, Mariani L, Lo Vullo S, Roz L, Lombardo C, Pierotti MA, Tavecchio L. Analysis of circulating tumor DNA in plasma at diagnosis and during follow-up of lung cancer patients. *Cancer Research*. 2001; 61: 4675-4678.
- Sozzi G, Conte D, Leon M, Ciricione R, Roz L, Ratcliffe C, Roz E, Cirenei N, Bellomi M, Pelozzi G, Pierotti MA, Pastorino U. Quantification of free circulating DNA as a diagnostic marker in lung cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 3902-3908.
- Sperr WR, Jordan JH, Baghestanian M, Kiener HP, Samorapoompichit P, Semper H, Hauswirth A, Schemthaler GH, Chott A, Natter S, Kraft D, Valenta R, Schwartz LB, Geissler K, Lechner K, Valent P. Expression of mast cell tryptase by myeloblasts in a group of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2001; 98: 2200-2209.
- Stein H. Die neue WHO Klassifikation der malignen Lymphome. Nach „REAL“ ein weiterer Schritt auf dem Weg zu einem weltweiten Konsens. *Pathologe*. 2000; 21: 101-105.
- Stone RM, O'Donnell MR, Sekeres MA. Acute myeloid leukemia. *American Society of Hematology*. 2004; 98: 117.
- Suki S, Swan F Jr, Tucker S, Fritsche HA, Redman JR, Rodriguez, MA, McLaughlin P, Romaguera J, Hagemester FB, Velasquez WS. Risk classification for large cell lymphoma using lactate dehydrogenase, beta-2 microglobulin, and thymidine kinase. *Leuk Lymphoma*. 1995; 18: 87-92.
- Tallman MS, Andersen JW, Schiffer CA, et al. All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med*: 1997; 337: 1021-1028.
- Tavernier E, Le QH, Elhamri M, Thomas X. Salvage therapy in refractory acute myeloid leukemia: prediction of outcome based on analysis of prognostic factors. *Leuk Res*. 2003; 27: 205-214.
- Uppenkamp M, Feller AC. Classification of malignant lymphoma. *Onkologie*. 2002; 25: 563-570.
- Vassilakopoulos TP, Nadali G, Angelopoulou MK, Siakantaris MP, Dimopoulou MN, Kontopidou FN, Karkantaris C, Kokoris S, Kyrtsolis MC, Tsaftaris P, Pizzolo G, Pangalis GA. The prognostic significance of  $\beta$ 2-microglobulin in patients with Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*. 2002; 87: 701-708.
- Verstovsek S, Kantarjian H, Aguayo A, Manshour T, Freilich G, Keating M, Estey E, Albitar M. Significance of angiogenin plasma concentrations in patients with acute myeloid leukemia and advanced myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. 2001; 114: 290-295.
- Webb SJ, Harrison DJ, Wyllie AH. Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease. *Adv Pharmacol*. 1997; 41: 1-34.
- Weisenburger DD. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma recent findings regarding an emerging epidemic. *Ann Oncol*. 1994; 5Suppl1: 19-24.
- Weissinger F, Kreipe HH, Wilhelm M. Non-Hodgkin-Lymphome. *Internist*. 1997; 38: 1131-1142.
- Wilson WH, Teruya-Felstein J, Fest T, Harris C, Steinberg SM, Jaffe ES, Raffeld M. Relationship of p53, bcl-2, and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood*. 1997; 89: 601-609.
- Winton EF, Langston AA. Update in acute leukemia 2003: A risk adapted approach to acute myeloblastic leukemia in adults. *Semin Oncol*. 2004; 2 Suppl. 4: 80-86.
- Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao KC, Sun CF, Wu JT. Cell-free DNA: measurement in various carcinomas and establishment of normal reference range. *Clinica Chimica Acta*. 2002; 321: 77-87.
- Wyllie AH, Arends MJ, Morris RG, Walker SW, Evan G. The apoptosis endonuclease and its regulation. *Semin Immunol*. 1992; 4: 389-397.
- Zinzani PL, Pulsoni A, Perrotti A. et al. Fludarabine plus mitoxantrone with and without rituximab versus CHOP with and without rituximab as front-line treatment for patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2004; 22: 2654-2661.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
<b>AIDS</b>	<b>Autoimmun-Defizienz-Syndrom</b>
<b>AML</b>	<b>Akute myeloische Leukämie</b>
<b>ATRA</b>	<b>All-trans retionic acid</b>
<b>AU</b>	<b>Arbitrary Unit</b>
<b>AUC</b>	<b>Area under the curve</b>
<b>Bcl</b>	<b>B-cell lymphoma gene</b>
<b>β2M</b>	<b>β2-Mikroglobulin, Beta2-Mikroglobulin</b>
<b>BSG</b>	<b>Blutsenkungsgeschwindigkeit</b>
<b>CA 125</b>	<b>Cancer Antigen 125</b>
<b>CAD</b>	<b>Caspase-activated deoxyribonuclease</b>
<b>CD</b>	<b>Cluster of differentiation</b>
<b>CEBPA</b>	<b>CCAAT/enhancer binding protein alpha</b>
<b>CLL</b>	<b>Chronisch lymphatische Leukämie</b>
<b>CR</b>	<b>Complete remission, komplette Remision</b>
<b>CT</b>	<b>Computertomografie</b>
<b>CYFRA 21-1</b>	<b>Cytokeratin 19 Fragmente</b>
<b>DISC</b>	<b>Death receptor-induced signalling complex</b>
<b>DHGS</b>	<b>Deutsche Hodgkin-Studiengruppe</b>
<b>DNS</b>	<b>Desoxyribonukleinsäure</b>
<b>EBV</b>	<b>Epstein-Barr-Virus</b>
<b>EDTA</b>	<b>Ethylendiamin-Tetraacetat</b>
<b>EFS</b>	<b>Event free survival</b>
<b>ELISA</b>	<b>Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay</b>
<b>ESMO</b>	<b>European Society for Medical Oncology</b>
<b>FAB</b>	<b>Französisch-amerikanischen-britischen (Klassifikation)</b>
<b>Fas-R</b>	<b>Name eines Zelltodrezeptors</b>
<b>FLT3</b>	<b>Fms-like tyrosin kinase 3</b>

<b>G-CSF</b>	<b>Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor</b>
<b>GM-CSF</b>	<b>Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor</b>
<b>Hb</b>	<b>Hämoglobin</b>
<b>HIV</b>	<b>Human immunodeficiency virus</b>
<b>HLA</b>	<b>Human leucocyte antigen</b>
<b>HTLV</b>	<b>Human T-cell-leucaemia-virus</b>
<b>ILSG</b>	<b>Internationale Lymphomstudiengruppe</b>
<b>IPI</b>	<b>Internationale Prognose-Index</b>
<b>IPS</b>	<b>International prognostic score</b>
<b>LDH</b>	<b>Laktatdehydrogenase</b>
<b>MALT</b>	<b>Mucosa associated lymphoid tissue</b>
<b>MDS</b>	<b>Myelodysplastisches Syndrom</b>
<b>MEIA</b>	<b>Mirkopartikel-Enzymimmunoassay</b>
<b>MH</b>	<b>Morbus Hodgkin</b>
<b>MLL</b>	<b>Mixed lineage leukemic</b>
<b>MPO</b>	<b>Myeloperoxidase</b>
<b>NHL</b>	<b>Non-Hodgkin-Lymphom</b>
<b>NK-Zellen</b>	<b>Natürliche Killer-Zellen</b>
<b>NPC</b>	<b>Nasopharyngeales Karzinom</b>
<b>OS</b>	<b>Overall survival</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerasenkettenreaktion</b>
<b>PD</b>	<b>Progressive disease, Progression</b>
<b>PR</b>	<b>Partial remission</b>
<b>PET</b>	<b>Positronenemissionstomografie</b>
<b>R.E.A.L.</b>	<b>Revised-European-American-Lymphoma (Klassifikation)</b>
<b>RFS</b>	<b>Relapse free survival</b>
<b>RIA</b>	<b>Radioimmunoassay</b>
<b>RNA</b>	<b>Ribonukleinsäure</b>
<b>SD</b>	<b>Stable disease</b>
<b>TK</b>	<b>Thymidinkinase</b>

<b>TRAIL-R</b>	<b>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</b>
<b>VEGF</b>	<b>Vascular endothelial growth factor</b>
<b>WHO</b>	<b>Welthandelsorganisation</b>
<b>ZNS</b>	<b>Zentrales Nervensystem</b>

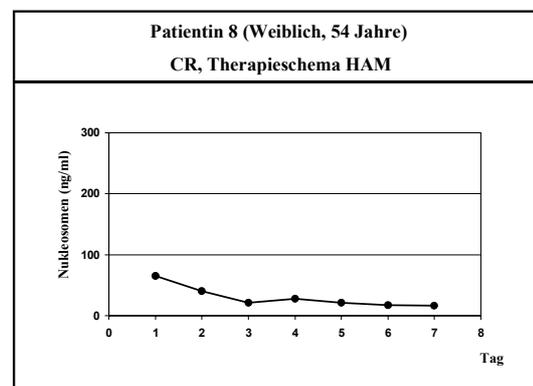
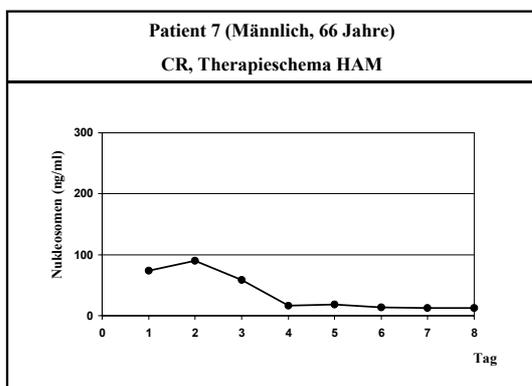
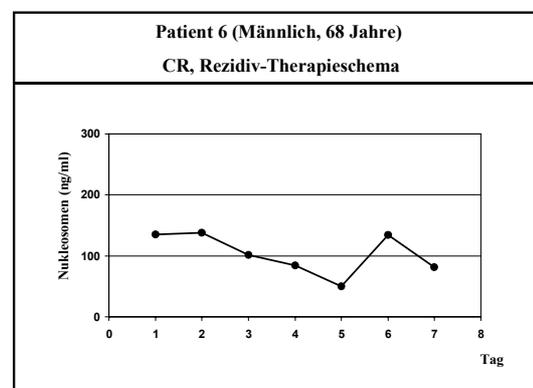
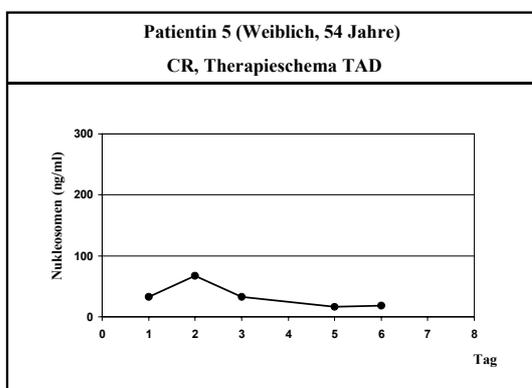
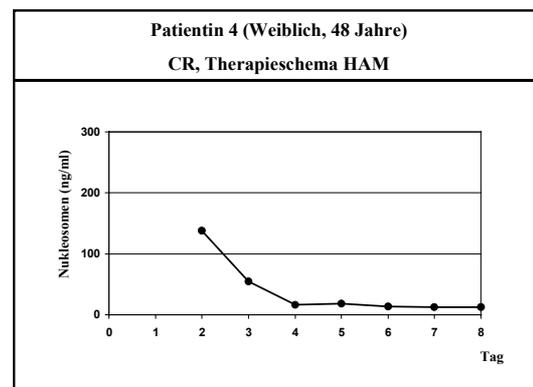
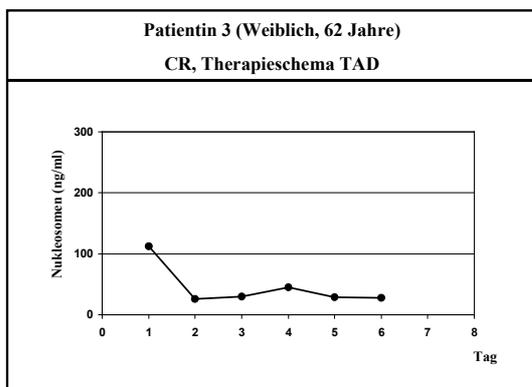
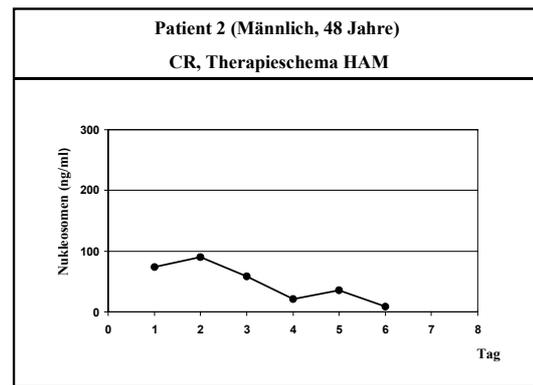
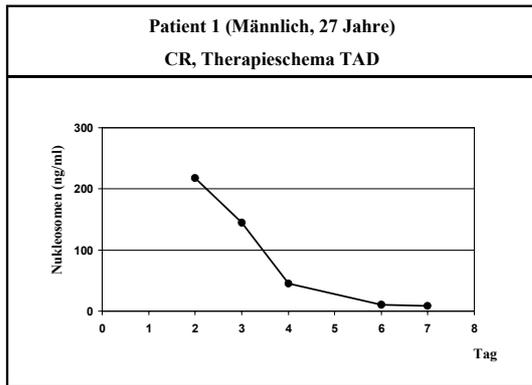
## 10. Anhang:

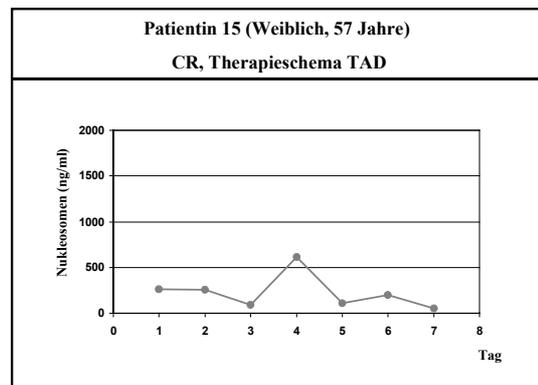
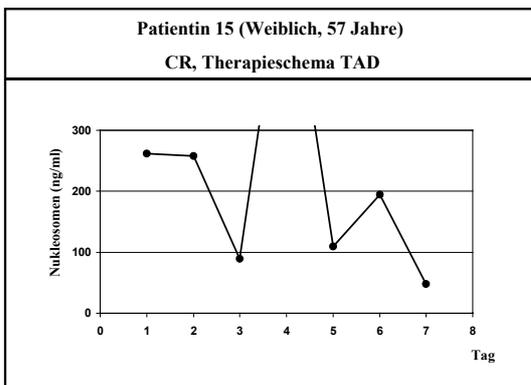
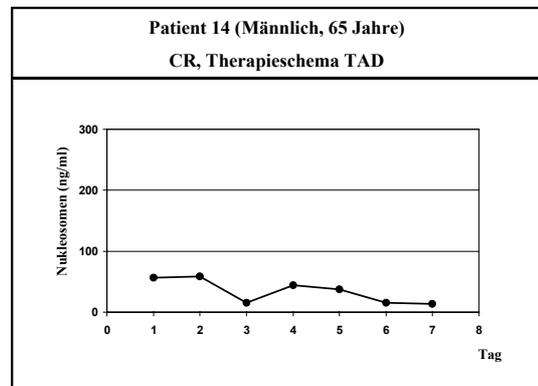
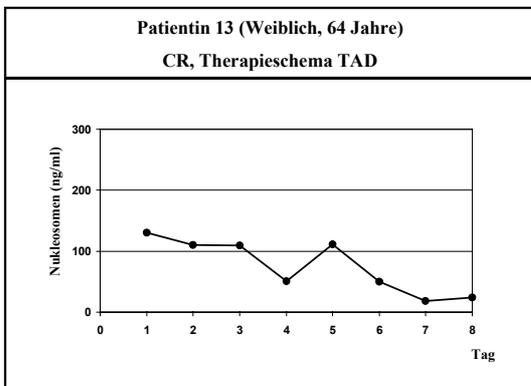
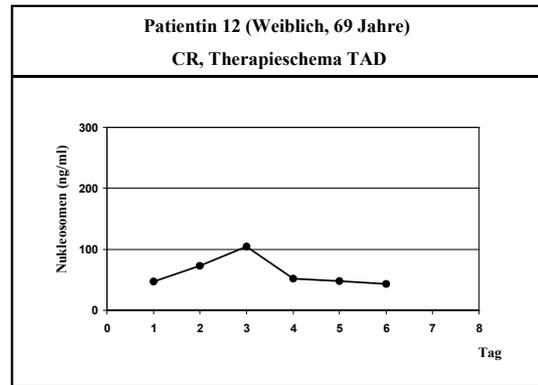
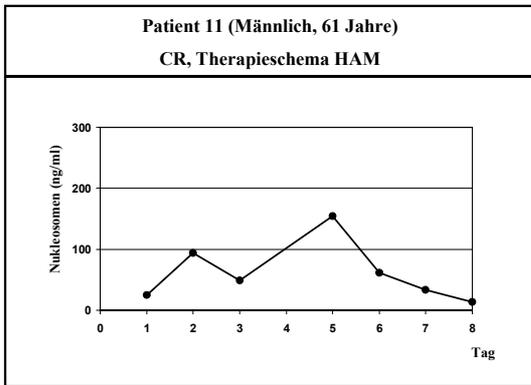
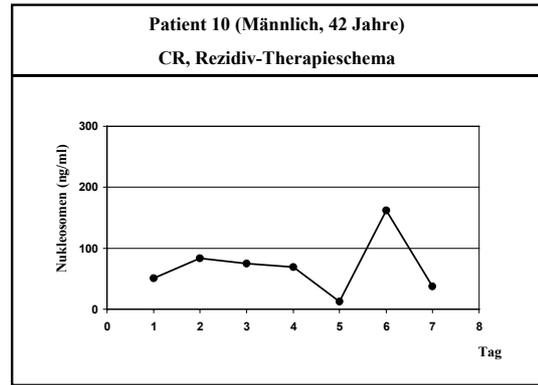
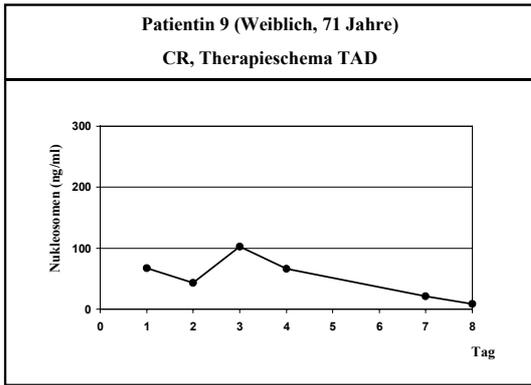
Chemotherapieschemata:

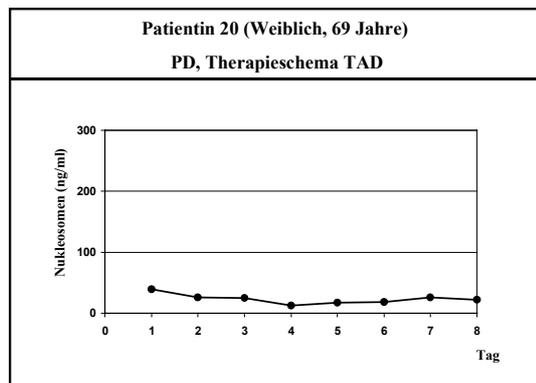
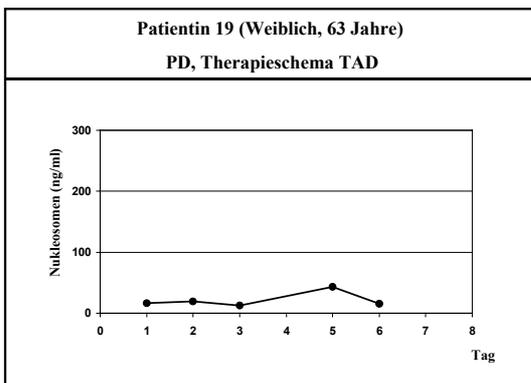
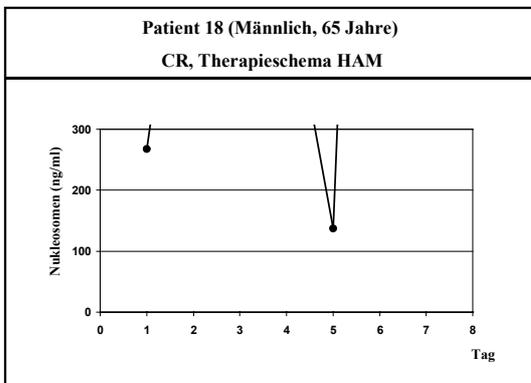
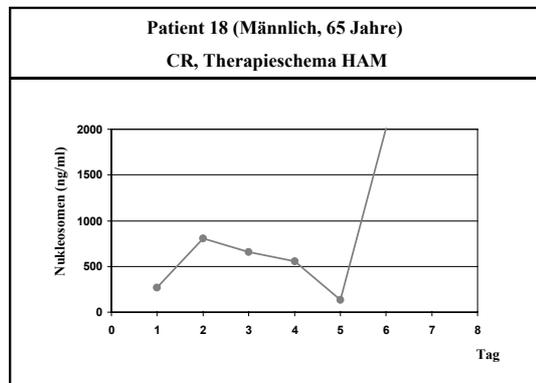
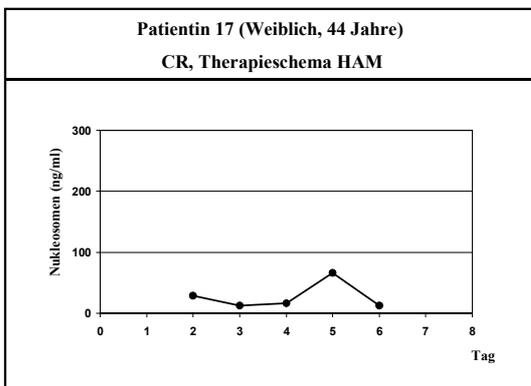
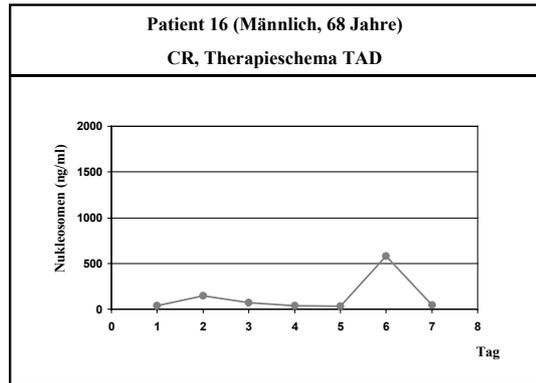
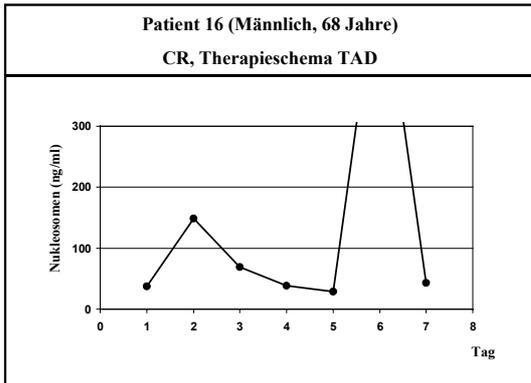
<b>ABVD</b>			
Doxorubicin	25 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1+15
Bleomycin	10 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1+15
Vinblastin	6 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1+15
Dacarbazin	375 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1+15
<b>BEACOPP-Basis</b>			
Bleomycin	10 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d8
Etoposid	100 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1-3
Doxorubicin	25 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Cyclophosphamid	650 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Vincristin	1,4 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 8, max. 2 mg/d abs.
Procarbazin	100 mg/m <sup>2</sup> /d	p.o.	d 1-7
Prednisolon	40 mg/m <sup>2</sup> /d	p.o.	d 1-14
<b>BEACOPP-gesteigert</b>			
Bleomycin	10 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d8
Etoposid	200 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1-3
Doxorubicin	35 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Cyclophosphamid	1250 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Vincristin	1,4 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 8, max. 2 mg/d abs.
Procarbazin	100 mg/m <sup>2</sup> /d	p.o.	d 1-7
Prednisolon	40 mg/m <sup>2</sup> /d	p.o.	d 1-14
<b>Dexa-BEAM</b>			
Dexamethason	3 x 8 mg/d	p.o., i.v.	d 1-10
BCNU	60 mg/d	i.v.	d 2
Etoposid	250 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 4-7
Cytosin-Arabinosid	100 mg/m <sup>2</sup> 2x/d	i.v.	d 4-7, alle 12 h
Melphalan	20 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 3
<b>DHAP</b>			
Cisplatin	100 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Cytosin-Arabinosid	2 x 2 g/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 2 alle 12 h
Dexamethason	40 mg absolut	i.v.	d 1-4, alternativ p.o.
<b>Fludarabin</b>			
	25 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1+5
<b>FCM</b>			
Fludarabin	25 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1-3
Cyclophosphamid	300 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1-3
Methotrexat	25 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	
<b>R-FCM</b>			
Rituximab	10 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 0
Fludarabin	25 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1-3
Cyclophosphamid	300 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Methotrexat	1250 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1

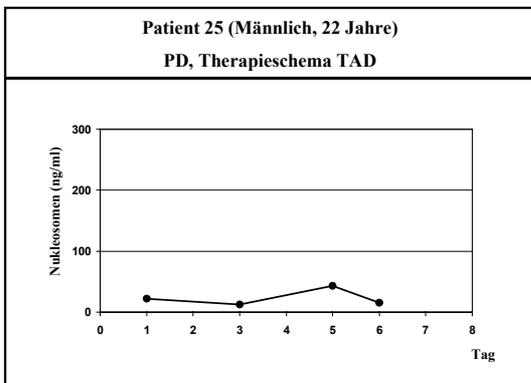
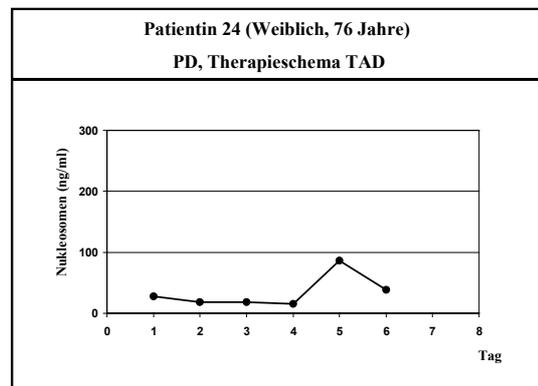
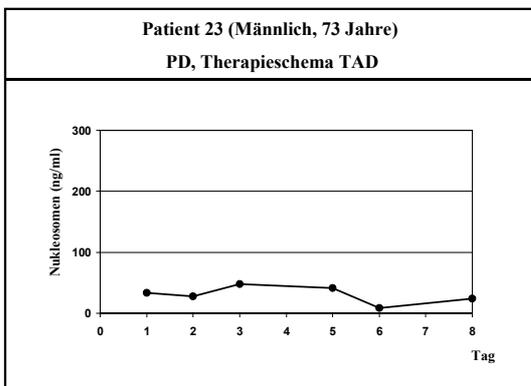
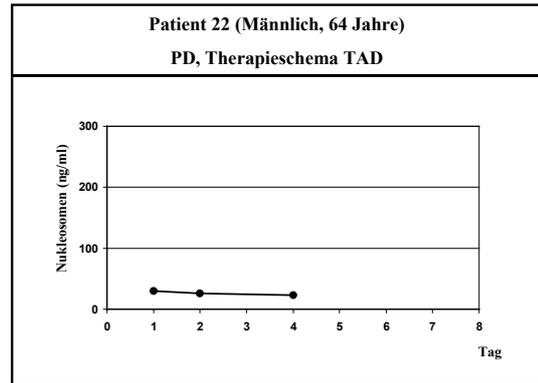
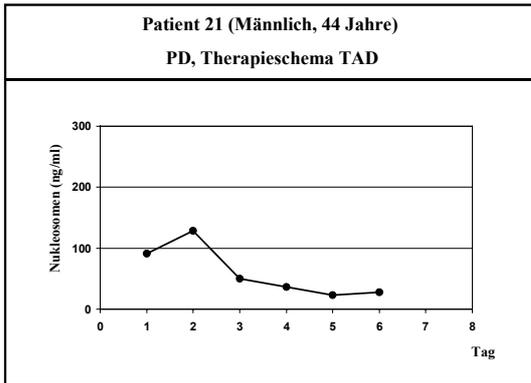
<b>CHOP</b>			
Cyclophosphamid	750 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Doxorubicin	50 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Vincristin	1,4 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Prednisolon	100 mg absolut	i.v.	d 3
<b>R-CHOP</b>			
Rituximab	375 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Cyclophosphamid	750 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Doxorubicin	50 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Vincristin	1,4 – 2 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Prednisolon	100 mg absolut	p.o.	d 1-5
<b>CHOEP</b>			
Cyclophosphamid	750 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Doxorubicin	50 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Vincristin	1,4 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1
Etoposid	100 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 1-3
Prednisolon	100 mg absolut	p.o.	d 1-5
<b>Hyper-CDT</b>			
hyperfraktioniertes Cyclophosphamid	- - 300 mg/m <sup>2</sup>	- i.v.	- d 1-3 (12 stündl.)
Dexamethason	20 mg/m <sup>2</sup> /d	p.o.	d1-4, 9-12, 17-20
Thalidomid	100-400 mg/m <sup>2</sup>		einmalig
<b>Campath-FCD</b>			
Alemtuzumab	3/10/30/30 mg	i.v.	d1-4
Fludarabin	25 mg/m <sup>2</sup>	i.v.	d2-4
Cyclophosphamid	600 mg/m <sup>2</sup>	i.v.	d3
Doxorubicin	50 mg/m <sup>2</sup>	i.v.	d4
<b>R-Dexa-BEAM</b>			
Rituximab	375 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d1
Dexamethason	3x8 mg	i.v.	d1-10
Carmustin	60 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d2
Melphalan	20 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d3
Etoposidphosphat	75 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d4-7
Cytosin-Arabinosid	100 mg/m <sup>2</sup>	i.v.	d4-7 /12 stündl.)
<b>TAD</b>			
Cytarabin	100 mg/m <sup>2</sup>	i.v.	d 1-2, d 3-8 (12-stündl.)
Daunorubicin	60 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 3-5
6-Thioguanin	100 mg/m <sup>2</sup>	i.v.	d 3-9 (12 stündl.)
<b>HAM</b>			
Cytarabin oder Cytarabin	3 g/m <sup>2</sup> (<60 J.) 1 g/m <sup>2</sup> (>60 J.)	i.v.	d 1-3 (12-stündl.) d 1-3 (12-stündl.)
Mitoxantron	10 mg/m <sup>2</sup> /d	i.v.	d 3-4

Einzelverläufe der Nukleosomenkonzentrationen der AML-Patienten während des 1. Zyklus:









## **Mein Dank gilt**

- Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel für die Überlassung des Themas und die Gewährung der Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Klinische Chemie.
- Herrn Dr. Stefan Holdenrieder für die vielen intensiven Beratungen in allen organisatorischen und fachlichen Fragen der Doktorarbeit, für die Organisation der Zusammenarbeit mit anderen Instituten, für die Unterstützung beim Erstellen der Poster, Vortrag und Publikation und für die stetige Aufmunterung und Motivation während der Erstellung der Doktorarbeit.
- Frau Dr. med. P. Stieber für die zahlreiche Unterstützung in vielen organisatorischen und fachlichen Angelegenheiten und der Ermöglichung an internationalen Kongressen teilzunehmen.
- Frau Dr. med. D. Nagel für die statistischen Auswertungen und kritischen Überarbeitung der Doktorarbeit.
- Prof. Dr. med. A. Schalhorn aus der III. Medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern für die Möglichkeit Patienten seiner Klinik für die Studie zu gewinnen und Prof. Dr. med. Dr. phil. T. Haferlach und PD Dr. med. J. Braess aus der III. Medizinischen Klinik für das Bereitstellen von Knochenmarkbefunden der AML-Patienten.
- Frau Hofmann für die zahlreiche Unterstützung in der Datenverarbeitung und das Messen der Thymidinkinase-Proben.
- Der Firma Roche Diagnostics für die Bereitstellung der Reagenzien für die Bestimmung der Nukleosomen und weiteren Tumormarker und Immunotech in der Tschechischen Republik für die Bereitstellung der Reagenzien für die Bestimmung der Thymidinkinase.

## **Lebenslauf**

### Persönliche Daten:

Name: Susanne Müller  
Geburtstag: 03.06.1979  
Geburtsort: Markt Rettenbach / Unterallgäu

### Schulbildung:

1985 – 1989 Grundschule Bad Wörishofen  
1989 – 1998 Gymnasium Maristenkolleg Mindelheim

### Freiwilliges Soziales Jahr:

09/1998 – 04/1999 Kreiskrankenhaus Ottobeuren

### Studium:

05/1999 – 10/2005 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität in München  
10/2005 Ärztliche Prüfung und Approbation

### Dissertation:

Seit 06/2002 Am Institut für Klinische Chemie im Klinikum Großhadern in München  
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. D. Seidel

### Berufliche Tätigkeit

Seit 01/2006 Assistenzärztin in der Inneren Medizin in den Kliniken an der Paar - Krankenhaus Aichach  
Chefarzt Dr. W. Remplik