

Aus der Kinderklinik und Poliklinik der Universität Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. Christian P. Speer

„Der Einfluss von Zytokingenpolymorphismen
auf die Entwicklung von Osteonekrosen
unter ALL-und Lymphom-Therapie
bei Kindern und Jugendlichen“

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Diana Henn

aus Heidelberg

Würzburg, im Juli 2018

Referent: Prof. Dr. med. Paul-Gerhardt Schlegel

Koreferent: PD Dr. med. Götz Ulrich Grigoleit

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2018

Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Leukämien und Lymphome	1
1.2	Osteonekrosen	4
1.3	Klinische Daten.....	5
1.4	Laborparameter	7
1.5	Zytokine	9
1.6	Fragestellung.....	10
2	Material	12
2.1	Verwendete Geräte	12
2.2	Labormaterialien.....	13
2.3	Molekularbiologische Reagenzien	13
2.4	Testkits	14
2.5	Chemikalien und sonstige Stoffe	14
3	Methoden	15
3.1	DNA Isolation.....	15
3.2	Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes	16
3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
3.3.1	Prinzip der PCR	17
3.3.2	Ansatz zur PCR	18
3.3.3	Protokoll der PCR	20
3.4	Gelelektrophorese	21
3.4.1	Prinzip der Gelelektrophorese	21
3.4.2	Protokoll der Gelelektrophorese	22
3.4.3	Auslesen der Gelelektrophorese.....	23
3.5	Studientyp, Patienten und statistische Verfahren	23
4	Ergebnisse	26
4.1	Patientenkohorte	26
4.2	Klinische Charakteristika der Patienten, die eine Osteonekrose entwickelten.....	32
4.3	Vergleich von Patienten mit und ohne Osteonekrose anhand klinischer Daten und Laborparameter.....	34
4.3.1	Klinische Daten.....	34
4.3.2	Laborparameter	42

4.4	Zytokingenpolymorphismen.....	44
4.4.1	Übersicht der Zytokingenpolymorphismen.....	45
4.4.2	IL-6 high- und low-producer.....	47
4.4.3	Inflamations-Score.....	49
5	Diskussion	52
5.1	Klinische Daten.....	52
5.2	Laborparameter	56
5.3	Zytokine.....	59
5.4	Stärken und Limitierungen.....	62
6	Zusammenfassung.....	65
7	Abbildungsverzeichnis	68
8	Tabellenverzeichnis	69
9	Literaturverzeichnis	70
10	Anhänge	75
10.1	Cytokine Genotyping Tray or Primer Pack	75
10.2	Abkürzungsverzeichnis.....	76
11	Danksagung.....	78

1 Einleitung

Jedes Jahr erkranken in Deutschland circa 1800 Kinder erstmalig an Krebs [1]. Die akute lymphoblastische Leukämie ist dabei mit knapp einem Drittel die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter, Non-Hodgkin-Lymphome tragen mit 7 % und das Hodgkin-Lymphom mit 5 % bei [2] [3] [4].

Die Prognose der genannten Erkrankungen bei Kindern und Jugendlichen ist sehr gut [3] [4] [5]. Jedoch ist die Therapie intensiv und langwierig. Speziell bei Kindern spielen Spätschäden eine große Rolle, da diese natürlicherweise viel häufiger erlebt werden als von Erwachsenen. Eine dieser langfristigen Komplikationen ist die Entwicklung von Osteonekrosen. Da Schmerzen und Einschränkungen in der Mobilität die Folge sind, ist es wichtig, diese Komplikation besonders zu beachten. Die genaue Ursache der Entstehung von Osteonekrosen ist allerdings bislang unklar.

Die vorliegende Arbeit soll durch statistische Auswertung klinischer Patientendaten und Laborparameter, sowie Analyse von Zytokingenpolymorphismen dazu beitragen, Risikofaktoren für die Entwicklung von Osteonekrosen besser abschätzen zu können.

1.1 Leukämien und Lymphome

In die vorliegende Studie wurden Kinder mit akuter lymphoblastischer Leukämie, Hodgkin-Lymphom und Non-Hodgkin-Lymphom aufgenommen.

Akute lymphoblastische Leukämie

Die akute lymphoblastische Leukämie (ALL) weist einen Häufigkeitsgipfel zwischen dem 1. und 5. Lebensjahr auf [6]. Bei der ALL kommt es im Knochenmark zur Vermehrung nicht ausdifferenzierter Blasten, woraufhin es zur Verdrängung der gesunden Hämatopoese kommt. Aus der hieraus resultierenden Anämie, Thrombozytopenie und dem Mangel an funktionsfähigen Granulozyten entstehen unter anderem Symptome wie Blässe, Müdigkeit, Blutungen und Anfälligkeit für bakterielle und virale Infekte [2]. Zur

genauen Diagnostik und Klassifikation der ALL muss nach einer venösen Blutentnahme in der Regel eine Knochenmarkpunktion durchgeführt werden. Durch die nachfolgende mikroskopische, immunologische und genetische Diagnostik kann eine Einteilung in Risikogruppen erfolgen mit anschließender Optimierung und Anpassung der Therapie [2].

Die Therapie der ALL erfolgt in Therapieoptimierungsstudien anhand von Protokollen, die sich je nach Risikogruppe unterscheiden. Hierbei werden unter anderem die Immunzytologie und die Prednison-Response in der Vorphase berücksichtigt [5] [7]. Im Jahr 2016 wurden Kinder und Jugendliche an der Universitäts-Kinderklinik Würzburg, an der die vorliegende Arbeit erstellt wurde, in dem Protokoll „AIEOP-BFM ALL 2009“ behandelt [8]. Diese Therapieoptimierungsstudien werden in definierten zeitlichen Intervallen ausgewertet, aktualisiert und verbessert. Da es sich bei der ALL grundsätzlich um eine seltene Erkrankung handelt [2], kann durch die Kooperation von Ärzten und Ärztinnen im Rahmen dieser Therapieoptimierungsstudien eine größere Fallzahl beobachtet werden. Durch die Studien ist es möglich zu lernen, welche Therapien reduziert werden können, um die Nebenwirkungen einzugrenzen, ohne einen Therapieerfolg einbüßen zu müssen. Auf der anderen Seite ist es wichtig, Therapien teilweise zu intensivieren, um das Rückfallrisiko zu minimieren und Heilungschancen zu vergrößern [8].

Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome

Die malignen Lymphome werden unter anderem in die zwei Hauptgruppen der Hodgkin- und der Non-Hodgkin-Lymphome unterteilt [9].

Hodgkin-Lymphom

Das Hodgkin-Lymphom ist eine Erkrankung des lymphatischen Systems. Etwa 5 % der malignen Erkrankungen im Alter von 0 bis 18 Jahren sind Hodgkin-Lymphome, wobei Kleinkinder seltener erkranken als Jugendliche [3].

Häufig sind zunächst die Lymphknoten im Kopf-Hals-Bereich betroffen, deren schmerzlose Schwellung meist das erste Symptom darstellt. Je nach

Lokalisation der betroffenen Lymphknoten sind auch chronischer Husten, Bauch- oder Knochenschmerzen möglich [7]. Eine EBV-Infektion in der Anamnese gilt mittlerweile als gesicherter Risikofaktor [7].

Zur Sicherung der Diagnostik und Bestimmung der genauen Form des Morbus Hodgkin ist die histologische Untersuchung eines Lymphknotens sowie bildgebende Verfahren zur Beurteilung der Ausbreitung der Erkrankung zwingend erforderlich [9]. Grundlage der Therapie ist die Ann-Arbor-Klassifikation, die die Ausbreitung der befallenen Lymphknoten und das Vorhandensein einer B-Symptomatik berücksichtigt. Die Behandlung erfolgt nach Therapieprotokollen und gliedert die Patienten innerhalb von Therapieoptimierungsstudien [3] in Gruppen von frühen, mittleren und fortgeschrittenen Krankheitsstadien. Die Therapie besteht aus einer sehr wirkungsvollen Chemotherapie, die auf den Patienten abgestimmt wird [7]. In der vorliegenden Studie wurden diese Patienten v.a. mit den Protokollen EuroNet-PHL-C1 oder EuroNet-PHL-LP1 behandelt.

Patienten mit unzureichendem Ansprechen auf Chemotherapeutika erhalten zusätzlich eine Strahlentherapie, da das Hodgkin-Lymphom äußerst strahlensensibel ist [10]. Patienten mit einem erstmalig diagnostizierten Hodgkin-Lymphom haben eine 95-prozentige Chance auf Heilung [3] und auch Kinder und Jugendliche mit Rezidiven erreichen eine Remissionsrate von 90 % [7].

Non-Hodgkin-Lymphom

Beim Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) handelt es sich um eine Gruppe sehr verschiedener Erkrankungen, die durch die maligne Entartung von B- oder T-Lymphozyten gekennzeichnet sind [9].

Im Kindes- und Jugendalter treten zum größten Teil hochmaligne NHL auf, die sich schnell im ganzen Körper ausbreiten und somit als Systemerkrankung den akuten Leukämien ähneln [4]. Grundsätzlich sind die NHL eher eine Erkrankung der Kinder über 14 Jahre [4]. Die Klassifikation erfolgt nach WHO-Einteilung

und unterscheidet maligne Prozesse in Vorläufer-B- und T-Zellen und in reife B- und T-Zellen. Die Stadieneinteilung erfolgt nach der modifizierten St.-Jude-Klassifikation der NHL im Kindesalter und berücksichtigt hierbei vor allem die Ausdehnung, die entscheidend für die Therapieplanung und Prognose ist [4] [7]. Als Leitsymptom zählt die schmerzlose Lymphknotenschwellung im Kopf-Halsbereich [7]. Die Diagnostik umfasst unter anderem eine Biopsie des Tumors, die Bildgebung sowie eine Knochenmarkpunktion [7]. Dieses Vorgehen dient der genauen Bestimmung von Untergruppe und Ausdehnung der Erkrankung, da die verschiedenen Formen des NHL sehr unterschiedlich therapiert werden [4]. Die Therapie erfolgt im Rahmen von Therapieprotokollen, die durch Studien laufend nach dem neuesten wissenschaftlichen Stand verbessert werden [4]. Grundsätzlich sprechen lymphoblastische Lymphome eher auf eine lange Exposition durch Zytostatika an, wohingegen die Therapie der Wahl bei nicht-lymphoblastischen Lymphomen und Burkitt-Lymphomen eine kurze hochdosierte Chemotherapie darstellt. Stets kommen Kortikosteroide zum Einsatz [7]. Patienten innerhalb der vorliegenden Studie mit einem Non-Hodgkin-Lymphom wurden vor allem mit den Therapieoptimierungsstudien ALL-BFM 95 und B-NHL-BFM 04 behandelt.

Kinder und Jugendliche mit einem NHL haben mit einer äußerst intensiven Chemotherapie und Steroiden eine sehr gute Überlebenschance von 90 % [4]. Tritt ein Rezidiv früh in der Behandlungsphase auf, ist die Prognose jedoch generell mit einer geringen Überlebenschance sehr schlecht [7].

1.2 Osteonekrosen

Bei der Osteonekrose, die sich unter einer Chemo- und Steroidtherapie entwickeln kann, handelt es sich um die aseptische Form. Sie ist eine bedeutsame Nebenwirkung bei Kindern und Jugendlichen unter ALL- und Lymphomtherapie, die vor allem die untere Körperhälfte betrifft [11].

Zu Beginn der Osteonekrose bleibt das Knochengewebe mit seiner tragenden Funktion noch erhalten, erst im Verlauf sterben die Zellen des Knochengewebes ab und auch das Knochenmark verfällt. Aus diesem Grund

treten im frühen Stadium weder Schmerzen noch Immobilitätserscheinungen auf. Symptome sind erst dann zu erwarten, wenn auch Knochengewebe mit Gelenkbeteiligung betroffen ist [12]. Entdeckt wird der Knochenabbau daher häufig erst in späteren Stadien mit der Folge, dass durch einen unvollständigen Reparaturmechanismus des Körpers Restschäden zurückbleiben. Die Lebensqualität der Patienten ist dann trotz des guten Heilungserfolges der malignen Grunderkrankung durch eine eingeschränkte Mobilität und Schmerzen deutlich vermindert [13]. Die Diagnose erfolgt durch eine Kernspintomographie [14], in der auch frühe Stadien erkannt werden können [15] und die vor allem bei Kindern aufgrund der fehlenden Strahlenbelastung zum Einsatz kommt [14]. Die Identifizierung von Risikogruppen ist zur frühen Durchführung entsprechender Diagnostik entscheidend, damit eine Therapie frühzeitig angepasst werden kann [15].

Die genaue Ätiologie der Osteonekrose ist bislang unklar. Es konnte zum jetzigen Zeitpunkt ein jugendliches Alter als gesicherter Risikofaktor identifiziert werden [16] [17] [18] [19]. Eine Steroidtherapie wurde in vielen Studien als Risikofaktor eingestuft [16] [18]. Vor allem die Rolle der Gene rückt weiter in den Vordergrund der Forschung. Mehrere Studien zeigen die Bedeutung von Zytokingenpolymorphismen hinsichtlich Knochenmasse und ihrer Resorption auf [20] [21] und sollen daher genauer untersucht werden.

1.3 Klinische Daten

Alter

Der Zusammenhang zwischen jugendlichem Alter und der Entwicklung einer Osteonekrose wurde in vielen Studien hoch signifikant gezeigt und gilt bislang als deutlichster Risikofaktor [16] [17] [18] [22]. Daher wurde das Alter auch in diese Studie mit aufgenommen.

Geschlecht

Über das weibliche Geschlecht als Risikofaktor für die Entwicklung einer Osteonekrose herrscht in der Literatur Uneinigkeit [23]. So wurde in manchen Studien das weibliche Geschlecht als unabhängiger Risikofaktor identifiziert [16] [24], in anderen Studien konnte keine Signifikanz gezeigt werden [17] [19]. Daher wurde das Geschlecht in der vorliegenden Arbeit als möglicher Risikofaktor getestet, um weitere Klarheit zu erzielen.

Diagnose und Protokoll

Zum jetzigen Kenntnisstand gibt es wesentlich weniger Studien zu Osteonekrosen bei Kindern mit Lymphomen als zu Kindern mit ALL. Außerdem vergleichen wenige Studien die Kinder bezüglich ihrer Diagnosen. Daher soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob eine bestimmte maligne Grunderkrankung oder ein damit einhergehendes bestimmtes Therapieprotokoll das Risiko für die Entstehung einer Osteonekrose erhöht.

Steroid und maximale Gewichtszunahme als Surrogat-Marker

In der Behandlung akuter lymphoblastischer Leukämien, Hodgkin-Lymphomen und Non-Hodgkin-Lymphomen spielt der Einsatz von Glukokortikoiden, auch vereinfacht Steroide genannt, eine zentrale Rolle [25]. Steroide haben vielfache immunsuppressive und entzündungshemmende Effekte [26] sowie große Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel [22].

Der Einfluss von Glukokortikoiden in Kombination mit einer Chemotherapie auf die Entwicklung von Osteonekrosen ist in der Literatur bekannt [16] [17] [18] [27]. Je nach Therapieoptimierungsstudie wird im Verlauf der Therapie der oben genannten Erkrankungen entweder Dexamethason oder Prednison verabreicht. Dexamethason hat eine zehnfach stärkere Potenz am Glukokortikoid-Rezeptor als Prednison [26]. Nebenwirkungen beider Steroide während der Behandlung können unter anderem Wachstumsverzögerungen, Muskelabbau und Fettverteilungsstörungen mit deutlicher Gewichtszunahme sein. Diese

Nebenwirkungen treten allerdings sowohl zwischen Prednison und Dexamethason, als auch interindividuell in unterschiedlichem Ausmaß auf [27].

Die Gewichtszunahme könnte als Surrogat-Marker für das Ansprechen auf Steroide dienen und sich daraus eventuell ein höheres Risiko für die Entwicklung einer Osteonekrose abschätzen lassen. Vorhandene Studien haben sich mit der Frage beschäftigt, ob ein generell erhöhter BMI das Risiko für Osteonekrosen erhöht [28]. Jedoch hat sich, nach bestem Wissen der Autorin, bisher keine Studie mit der direkten Gewichtszunahme im ersten steroidintensiven Therapieblock befasst. Daher soll in der vorliegenden Arbeit der Zusammenhang zwischen Gewichtszunahme, Steroiden und der in vorhergehenden Studien beschriebene unterschiedliche Einfluss der Glukokortikoide Prednison und Dexamethason auf die Entwicklung von Osteonekrosen überprüft werden [27].

Lokalisationen der Osteonekrosen

Viele Studien zeigen, dass Osteonekrosen unter ALL-Therapie nicht an allen Stellen des Körpers gleich häufig auftreten, vielmehr gibt es beschriebene Prädilektionsstellen. Dies sind die unteren Extremitäten, vor allem mit Beteiligung der Hüfte, des Femurkopfes und des Knies [19] [23]. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb weiter herausgestellt werden, welche Knochen und Gelenke im Körper besonders gefährdet sind, Osteonekrosen zu entwickeln. Zusätzlich soll auch die große Gruppe der Kinder und Jugendlichen mit Lymphomen in diese Untersuchung eingeschlossen werden

1.4 Laborparameter

Wie beschrieben, üben Steroide einen immensen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel aus. Steroide hemmen die knochenaufbauenden Osteoblasten und fördern die knochenabbauenden Osteoklasten [22] [29]. Dieser Prozess kann anhand des Enzyms, der alkalischen Phosphatase, das ein Marker für Umbauvorgänge im Knochen ist, gemessen werden [9]. Von hoher Bedeutung für den Knochenstoffwechsel sind außerdem Calcium und

anorganisches Phosphat [26]. Des Weiteren spielen Leukozyten im Rahmen der akuten lymphoblastischen Leukämie eine zentrale Rolle [6] und wurden daher in der vorliegenden Arbeit mit Bezug auf die Entwicklung von Osteonekrosen untersucht.

Alkalische Phosphatase

Bei Kindern dominiert das Isoenzym der Knochen-AP und ist somit ein Marker für die Aktivität der Osteoblasten [9]. Ist die AP niedrig, kann auf einen reduzierten Knochenaufbau geschlossen werden [9] [30] [31]. Daher stellt sich die Frage, ob die alkalische Phosphatase als Marker für die drohende Entwicklung einer Osteonekrose dienen kann. Aus diesem Grund wurde bei den Patienten dieser Studie die AP für einen statistischen Vergleich mitaufgenommen.

Calcium

Calcium ist ein wesentlicher Faktor für einen gesunden Knochen. Es wirkt positiv auf die Mineralisation und somit die Stabilisation des Knochens. Steroide aber reduzieren die Calciumaufnahme aus dem Darm und steigern die Calciumausscheidung durch die Nieren [9] [22] [26]. Somit kommt es bei unzureichender Versorgung des Körpers mit Calcium dazu, dass dieses aus dem Knochen herausgelöst und damit der Knochen geschwächt wird. [26]. Eventuell kann daher anhand von niedrigen Calcium-Werten ein Risiko für die Entwicklung von Osteonekrosen abgeschätzt werden [22] [26] [32]. Für die vorliegende Arbeit war deshalb der Serum-Calcium-Spiegel von Interesse.

Anorganisches Phosphat

Knochen besteht zu einem großen Teil aus Phosphat, das im Blut als anorganisches Phosphat gemessen wird. Es ist ein wichtiger Baustein für eine gesunde Knochenmineralisation [26]. Ist Phosphat erniedrigt und kann sich der Knochen dadurch nicht mehr stabil halten, könnte dies ein weiteres Risiko für die Entstehung von Osteonekrosen sein [9] [26].

Leukozyten

Anhand der Anzahl von Leukozyten werden bei einer ALL weitere Therapieregime geplant und Prognosen gestellt. Sie sind einer der wichtigsten Laborparameter bei der Überwachung dieser Erkrankungen [25] [33]. Daher lag es nahe, die Leukozyten auch auf den Einfluss auf Osteonekrosen zu überprüfen.

Die Bedeutung der genannten Laborparameter wurde, soweit bekannt, bisher in keiner Studie im Kontext von Osteonekrosen unter ALL- und Lymphom-Therapie bei Kindern und Jugendlichen betrachtet.

1.5 Zytokine

Der Oberbegriff Zytokine beschreibt eine breite Gruppe an Proteinen, die als lösliche Faktoren vielfältige Aufgaben unter anderem im Bereich von Immunantwort, Entzündung und Knochenstoffwechsel übernimmt. Zytokine halten das sensible System durch eine komplexe Regelung aus gegenseitiger Stimulierung und Inhibierung im Gleichgewicht. Bei vielen Erkrankungen, unter anderem bei Autoimmunerkrankungen oder Immundefekt-Syndromen, liegt ein Missverhältnis oder eine Fehlregulation der Zytokine zugrunde. Gebildet werden die Zytokine von allen kernhaltigen Zellen, vor allem von Immunzellen, wie Mastzellen, Makrophagen und T-Helfer (Th) -Zellen. Je nachdem an welche Zielzelle und Rezeptor die Zytokine binden, haben sie unterschiedliche Effekte [34].

In der vorliegenden Arbeit wurden Gen-Polymorphismen der pro-inflammatorischen Zytokine TNF-alpha, IL-6 und IFN-gamma und die Polymorphismen der anti-inflammatorischen Zytokine TGF-beta und IL-10 bestimmt und näher betrachtet.

Eine vorrangige Aufgabe von TNF alpha stellt die lokale Entzündung und Endothelaktivierung dar. IFN-gamma lässt vermehrt Makrophagen und MHC-Moleküle bereitstellen und ist an der Hemmung von Th-2-Zellen beteiligt [35].

TGF-beta hingegen hemmt Entzündungen und bremst das Wachstum von B-Zellen. IL-10 ist an der Beendigung einer einmal begonnenen Immunreaktion beteiligt. [35]. IL-6 ruft die stärkste Wirkung auf die Produktion von Akut-Phase-Proteinen hervor und aktiviert somit eine Entzündungsreaktion [36]. Es wirkt auf die Entwicklung von B- und T-Zellen ein und lässt Fieber entstehen.

Mehrere Studien heben die Bedeutung der Gene auf den Knochenstoffwechsel hervor und legen den Verdacht nahe, die Ursache beschleunigter Resorption von Knochensubstanz in Zytokinen zu finden [20] [21]. Vor allem das IL-6-Rezeptor-Gen konnte mit Osteopenie und Osteoporose in Verbindung gebracht werden [21]. Erhöhte IL-6-Produktion könnte, laut aktueller Forschung, durch ein systemisches Entzündungsmilieu zur Ausreifung von Osteoklasten und zum Verlust von Knochenmasse führen [37] [38].

In der Patientenkohorte der vorliegenden Studie wurden daher Zytokingenpolymorphismen untersucht mit der Frage, ob sich ein Risikofaktor für die Entwicklung von Osteonekrosen definieren lässt.

Nach bestem Wissen der Autorin liegt zum jetzigen Zeitpunkt keine Studie vor, die den Zusammenhang zwischen den oben genannten Zytokingenpolymorphismen und der Entwicklung von Osteonekrosen bei Kindern und Jugendlichen unter ALL- und Lymphom-Therapie untersucht.

1.6 Fragestellung

Jedes Jahr erkranken in Deutschland circa 900 Kinder an einer akuten lymphoblastischen Leukämie, einem Hodgkin- oder Non-Hodgkin-Lymphom [2] [3] [4]. Eine allgemein bekannte und gefürchtete Nebenwirkung bei diesen jungen Patienten ist die Entwicklung von Osteonekrosen. Die Häufigkeit dieses Auftretens ist mit 10 % bis 70 % sehr unterschiedlich, je nach Betrachtung der Risikogruppe oder Anwendung eines Screening-Verfahrens [18]. Es konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt lediglich Risikofaktoren wie ein jugendliches Alter und intensive Chemo- und Steroidtherapie identifiziert werden [16] [39]. Die genaue Ursache für die Entstehung von Osteonekrosen bleibt aber bisher ungeklärt.

Die Lebensqualität der Patienten mit Osteonekrosen ist durch die häufig resultierende Einschränkung der Bewegungsmöglichkeit und durch Schmerzen deutlich vermindert. Die ständig verbesserten Therapien der malignen Grunderkrankungen ermöglicht sehr häufig eine Heilung. Besonders tragisch ist es, wenn diese Kinder und Jugendliche dann durch Therapienebenwirkungen trotzdem kein unbeschwertes Leben führen können, sondern an den Rollstuhl gebunden sind oder ständige Schmerzen ertragen müssen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Entwicklung von Osteonekrosen besser abschätzen zu können und eventuelle Risikofaktoren herauszuarbeiten. Dabei sollen die in früherer Forschung bereits diskutierten Risikofaktoren validiert werden, neue Risikofaktoren geprüft werden und als erste Studie der Einfluss von Zytokingenpolymorphismen auf die Entwicklung von Osteonekrosen bei Kindern und Jugendlichen unter ALL- und Lymphom-Therapie untersucht werden. Diese Auswertung kann wertvolle neue Erkenntnisse liefern, die Hintergründe von Osteonekrose-Entstehungen besser zu verstehen und durch frühzeitigeres Abschätzen des Risikos für Osteonekrosen die Lebensqualität der jungen Patienten zu verbessern.

2 Material

In diesem Kapitel werden alle verwendeten Materialien, die für den experimentellen Teil der Arbeit benötigt wurden, vorgestellt. Diese wurden für die Isolation der DNA aus venösem Vollblut, die photometrische Überprüfung der Reinheit der DNA-Probe, die PCR, die Gelelektrophorese sowie das Auslesen des Gels mittels Scanner und Computer-Programm benötigt.

2.1 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Sterilwerkbank: Laminarflor 2003 Heraeus Herasafe HSP 18	Heraeus/Kendro Laboratory Products, Hanau
Waage: EMB 200-2	Kern, Balingen
Vortex-Mixer	Retsch, Haan
Galaxy Mini Centrifuge	VWR international, Radnor Pennsylvania, USA
Zentrifuge: Mikro 200R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Stoppuhr: Timer SKT 338 N	Oregon Scientific, Oregon, USA
Gefrierschrank: Froster	Kirsch, Offenburg
PCR Thermal Cycler Mastercycler	eppendorf, Hamburg
Gefrierschrank: öko super -24°C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Zentrifuge: Rotanta 460 RS	Hettich Lab Technology, Tuttlingen
Gelelektrophoresegerät: E835 300V – 500 mA	consort, Turnhoutin Belgien
Scanner: Odyssey Model 9120	Li-Cor Biotechnology – GmbH, Bad Homburg
Mikrowelle: Model-No. MWG-17, 230 V, 50Hz	AFK Deutschland GmbH, Hamburg
Heizblock: Blockthermostat BT 100	Kleinfeld, Labortechnik
Photometer: Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte im Labor der Universitäts-Kinderklinik Würzburg

2.2 Labormaterialien

Artikel	Hersteller
Einmalhandschuhe	Medline International, Chateaubriant, Frankreich
ReagiergefäÙe 1,5 ml	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen: 0,1-10 µl, 2-200 µl, 100-1000 µl	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Pipette Research: 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf
Combitips advanced 0,1 ml	eppendorf AG, Hamburg
Multipette plus	Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg
96 well PCR Microplate	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Transparente Microplatten – Abdeckfolie	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Messzylinder	VITLAB GmbH, Grossostheim
Küvette, Quarzglas Suprasil	VITLAB GmbH, Grossostheim
GelgieÙschale	biostep, Chemnitz

Tabelle 2.2: Laborbedarf für den experimentellen Teil der Arbeit

2.3 Molekularbiologische Reagenzien

Artikel	Hersteller
Taq-DNA-Polymerase, 250 units, 5 U/ µl	Genaxxon bioscience, Ulm
Gel Loading Dye orange 6x concentrate	BioLab Inc., Massachusetts, USA
100 bp Rainbow DNA-Ladder	GeneON GmbH, Ludwigshafen

Tabelle 2.3: Reagenzien für die PCR und Gelelektrophorese

2.4 Testkits

Artikel	Hersteller
Master-Mix	One Lambda, inc. Los Angeles
Primer: TNF-alpha, TGF-beta, IFN-gamma IL-6, IL-10	One Lambda, inc. Los Angeles
GF-1 Blood DNA Extraction Kit: GF-BD-050: 50 preps, GF-1 columns, Collection tubes, Buffer BB, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Elution Buffer	vivantis, Oceanside California, USA

Tabelle 2.4: Vom Hersteller vorpipettierte Reagenzien

2.5 Chemikalien und sonstige Stoffe

Artikel	Hersteller
Ethanol, 70 %	Apotheke des Klinikums der Universität Würzburg
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich Laborchemikalien, Seelze
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe
Tris Acetate-EDTA buffer, 10x concentrate	Sigma-Aldrich, Laborchemikalien, Seelze
SYTO 60 red fluorescent nucleicacid stain	invitrogen, Molecular Probes, Oregon, USA
Destilliertes Wasser	Universitätsklinikum Würzburg

Tabelle 2.5: Sonstige verwendete Chemikalien im Labor

3 Methoden

In diesem Kapitel werden die Methoden dargestellt, die für die Erarbeitung der Ergebnisse notwendig waren. Es wurden etablierte Methoden verwendet, wie sie dem aktuellen Stand der Technik entsprechen. Die Arbeiten erfolgten im Labor der Universitäts-Kinderklinik Würzburg.

3.1 DNA Isolation

Für die DNA-Isolation wurde das „Nucleic Acid Extraction Kit“ GF-1 der Firma vivantis benutzt.

Den Patienten wurde venöses Vollblut entnommen und die DNA nach folgenden Schritten isoliert:

- 200 µl Blut werden mittel Pipette in ein Eppendorf-Gefäß übertragen.
- Man fügt 200 µl Buffer BB Lösung des vivantis-Kits hinzu.
- Diese zwei Komponenten werden mit Hilfe eines kleinen Tisch-Vortexers vermischt.
- Diesem Gemisch werden 20 µl auf 6 °C gekühlte Proteinkinase K hinzugefügt.
- Alle drei Komponenten werden mittels Vortexing gemischt.
- Für die Inkubation für 10 Minuten bei 65 °C wird ein Heizblock für Eppendorf-Gefäße verwendet.
- Es werden 200 µl absolutes Ethanol hinzugefügt und sofort im Vortexer gemischt.
- Dies wird mittels Pipette in ein mitgeliefertes Zentrifugen-Röhrchen auf die Säule zur Filterung übertragen.
- Es wird bei 5000 G 1 Minute lang zentrifugiert.

Die DNA muss jetzt durch folgende Schritte von der Säule gewaschen werden:

- 500 µl Wash Buffer 1 werden auf die Säule mittels einer Pipette gegeben.
- Erneut wird bei 5000 G 1 Minute lang zentrifugiert.

- Der Überstand wird verworfen.
- Dieser Schritt wird noch zwei Mal mit 500 µl Wash Buffer 2 wiederholt. Beim zweiten Mal wird das Zentrifugieren auf 14000 G erhöht und auf 3 Minuten verlängert.
- Der Überstand wird wiederum verworfen.
- Die Säule wird auf ein neues Zentrifugen-Röhrchen übertragen.
- 100 µl erwärmter Elution Buffer wird hinzugegeben.
- Es folgt eine Ruhephase von 2 Minuten.
- Abschließend wird bei 5000 G für 1 Minute zentrifugiert.

Die isolierte DNA wird im Zentrifugen-Röhrchen bei -20 °C gelagert.

3.2 Photometrische Bestimmung des DNA-Gehaltes

Proteine sind ein häufiger Grund für Verunreinigung in einer DNA-Probe. Das Photometer misst die Absorption der Lichtwellenlängen von DNA (260 nm) und Proteinen (280 nm). Der Quotient der Lichtabsorptionen bei den genannten Wellenlängen beschreibt das Verhältnis von DNA zu Proteinen und ist somit ein Maß für Verunreinigung. Die DNA-Probe gilt als verwendbar bei einem Quotienten von 1,7 bis 1,9. Lagen die Quotientenwerte innerhalb dieses Bereiches, wurde die Probe verwendet, ansonsten verworfen [40] [41]:

- An der Küvette befindet sich ein optisches Fenster. Dieses muss so ausgerichtet werden, dass der Lichtstrahl aus dem Photometer auf die Messplatte hindurchscheinen kann.
- Zur Bestimmung des Nullabgleichs für das Photometer wird eine Küvette mit 100 µl destilliertem Wasser gefüllt und das Gerät damit kalibriert.
- Zur Überprüfung des DNA-Gehaltes in der Probe werden 2 µl DNA und 98 µl destilliertes Wasser vermischt und in eine Küvette gefüllt.
- Diese Küvette wird in das Photometer eingesetzt und der Inhalt spektroskopisch auf die Reinheit der Probe bestimmt.

3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde 1983 von Kary Mullis entdeckt und erarbeitet. Sie dient dazu, bestimmte Gensequenzen eines DNA-Abschnitts zu vervielfältigen. In der vorliegenden Arbeit wurde das Verfahren genutzt, um Polymorphismen im Gen, das Zytokine kodiert, festzustellen [42].

3.3.1 Prinzip der PCR

Für die PCR werden die gleichen Substrate benötigt wie bei einer DNA-Synthese in vivo [42]. Dazu gehören doppelsträngige DNA, Primer als Startsequenz, eine DNA-Polymerase und Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs). Nach Trennung der Doppelstränge der DNA in dem Abschnitt, der vervielfältigt werden soll, lagern sich die Primer als Startsequenzen an die komplementären Stränge an. Bei der hier verwendeten Sequenzspezifische-Primer-PCR (SSP-PCR) binden Primer nur an die gesuchte Sequenz eines Allels, wenn sie vollständig komplementär zum DNA-Abschnitt sind. Nur diese gebunden Sequenzen können anschließend in der PCR vervielfacht werden. Es liegen hinterher also ausschließlich dann PCR-Produkte vor, wenn die sequenzspezifischen Primer komplementär zur gesuchten Sequenz des Allels waren [43] [44].

An den Startsequenzen kann die DNA-Polymerase als Katalysator für die DNA-Synthese ansetzen. Diese wird vorzugsweise aus dem thermostabilen Archaeobakterium *Thermus aquaticus* isoliert. Die DNA-Polymerase ergänzt nun die DNA-Stränge komplementär durch die hinzugefügten Desoxynukleotid-Triphosphate.

Dieser Ablauf vollzieht sich in drei Phasen:

In der ersten Phase, der Denaturierungsphase, wird die doppelsträngige DNA bei circa 95 °C denaturiert, um die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen zu spalten. Nach dieser Denaturierungsphase liegt die DNA als Einzelstrang vor und ist bereit, komplementär ergänzt zu werden.

In der zweiten Phase, der Anlagerungs-Phase, binden die Primer aus Oligonukleotiden an den zu vervielfältigenden Abschnitt jeweils am 3'-Ende der Stränge. Um die Anlagerung der Primer vor der Wiederanlagerung der denaturierten Einzelstränge zu favorisieren, liegen die Primer in großem Überschuss vor und die Temperatur wird abgekühlt.

In der dritten Phase, der Elongations-Phase, kann die Taq-Polymerase bei einem Temperatur-Optimum von 72 °C vom Primer als Startpunkt aus den Strang mit freien Desoxynucleotid-Triphosphaten komplementär ergänzen. Somit entsteht wieder ein Doppelstrang.

Diese Phasen werden nun mehrmals wiederholt, um exponentiell viele DNA-Abschnitte herzustellen.

3.3.2 Ansatz zur PCR

Die 3 Phasen der PCR laufen vorprogrammiert in einem Thermocycler automatisch ab. Hierzu wird eine PCR-Platte mit 96 Wells für maximal 6 Patienten vorbereitet.

Man benötigt folgende Materialien für eine Patientenprobe:

- 1 µl Taq-Polymerase, die auf -20 °C gekühlt wurde.
- 140 µl Mastermix mit freien Desoxynucleotid-Triphosphaten.
- 1 µl destilliertes Wasser
- 19 µl DNA
- 1 Thermofolie
- 1 Platte mit Primern

Für 1 Patienten ergibt sich in 2 Reihen mit insgesamt 16 Wells daraus folgendes Pipettierschema:

- Jedes Well enthält die Taq-Polymerase und den Master-Mix mit Desoxynucleotid-Triphosphaten.
- Zusätzlich wird das erste Well einer Patientenreihe für die Negativkontrolle mit der entsprechenden Menge destilliertem Wasser befüllt.

- Den Wells 2-15 fügt man die DNA eines Patienten sowie die sequenzspezifischen Primer nach unten stehendem Schema hinzu.

Well	Inhalt
1	Negativkontrolle
2	TNF-alpha, promotor -308 A
3	TNF-alpha, promotor -308 G
4	TGF-beta1, codon 10 T
5	TGF-beta1, codon 10 C
6	TGF-beta1, codon 25 C
7	TGF-beta1, codon 25 G
8	IL-10, promotor -1082A, -819T
9	IL-10, promotor -1082G, -819C
10	IL-10, promotor -1082A, -819C
11	IL-10, promotor -819T, -592A
12	IL-10, promotor -819C, -592C
13	IL-6, promotor -174C
14	IL-6, promotor -174G
15	IFN-gamma, intron 1 +874T
16	IFN-gamma, intron 1 +874A

Tabelle 3.1: Primer-Schema für die 16 Wells der Microplatte für eine Patientenprobe.

3.3.3 Protokoll der PCR

- 1 µl Taq-Polymerase, die bei -20 °C gekühlt wurde, in 140 µl Mastermix mittels einer Pipette gegeben.
- Dies muss im Vortexer gemischt werden.
- Für die Negativ-Probe werden 7 µl des Taq-Master-Mix-Gemisches und 1 µl destilliertes Wasser gemischt und diese 8 µl in das 1. Well einer Patientenreihe pipettiert.
- Es werden 19 µl DNA eines Patienten in das Mastermix-Taq-Gemisch gegeben
- Dieses muss gründlich gevortext werden.
- Mit einer automatischen Pipette werden 8 µl des Mastermix-Taq-DNA-Gemisches auf die Wells 2-15 Wells mit den bereits enthaltenen Primern verteilt.
- Die Platte wird mit einer Thermofolie abgedeckt.
- Sie wird bei 1000 r/min 10 Sekunden lang zentrifugiert.

Die Platte ist nun bereit für die PCR im Thermocycler mit dem Temperatur-Modus: „Standard“ und einer Deckeltemperatur von 105°C. Hier werden die beschriebenen Phasen wie folgt durchlaufen.

Die erste Phase, die Denaturierung, wird einmal durchlaufen.

Zunächst für 130 Sekunden bei 96 °C, anschließend für 60 Sekunden bei 63°C.

Die zweite Phase, die Anlagerungs-Phase, wird in 9 Zyklen wiederholt.

Zunächst 10 Sekunden bei 96 °C, anschließend für 60 Sekunden bei 63 °C.

Die dritte Phase, die Elongations-Phase, wiederholt sich für 20 Zyklen.

Zunächst 10 Sekunden bei 96 °C, dann 50 Sekunden bei 59 °C und zuletzt 30 Sekunden bei 72 °C.

Wenn nach einer Stunde genügend DNA vorliegt, kann die Platte herausgenommen werden. Anschließend kann diese bei 4 °C gelagert oder sofort zum Beispiel für die Gelelektrophorese verwendet werden.

Zur Vorbereitung auf die Gelelektrophorese wird in jedes Well 2 µl des orangenen Farbstoffes „6x concentrate Gel Loading Dye orange“ mittels automatischer Pipette hinzugefügt und die Platte bei 1000 r/min 5 Sekunden lang zentrifugiert.

Die Proben sind nun bereit, um in der Gelelektrophorese analysiert zu werden.

3.4 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese handelt es sich um ein Verfahren, mit dem Moleküle durch Auftrennung spezifische Banden bilden und durch hinzugefügten Farbstoff sichtbar werden. Grundsteine für die heutigen Verfahren legte der schwedische Chemiker Arne Tiselius bereits Anfang des 20. Jahrhunderts [45].

3.4.1 Prinzip der Gelelektrophorese

Bei der hier angewandten Gelelektrophorese wurde ein Agarose-Gel als Trägersubstanz verwendet. Durch den Siebeffekt des Agarosegels kann die DNA nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Das Gel verzögert die Wanderung größerer Moleküle und lässt somit kleinere Moleküle schneller wandern und unterschiedliche Banden bilden. Da zusätzlich ein elektrisches Feld angelegt wird, wird die DNA auch aufgrund ihrer Ladung aufgetrennt. Die Wanderung erfolgt von der Kathode zur Anode und lässt negativer geladene Teilchen schneller wandern. So bilden sich wiederum charakteristische Banden. Die hinzugefügte Leiter erlaubt als Größenstandard eine spätere Interpretation der Banden [46].

3.4.2 Protokoll der Gelelektrophorese

Zunächst muss das Gel für die Analyse der PCR vorbereitet werden.

- Es werden 4,5 g Agarose-Gel mit 300 ml eines mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnten Tris Acetate-EDTA Buffer vermischt.
- Die Erwärmung in der Mikrowelle dauert 5 bis 10 Minuten, bis die Substanz schlierenfrei ist.
- Es werden 6 µl des blauen Farbstoffes Syto 60 hinzugegeben und gründlich verrührt.
- Das fertige Gel kann nun in die dafür vorgesehene Schale gegossen werden.
- Die Kämme werden in die Gelgießschale eingesetzt.
- Nach einer 30 minütigen Aushärtung des Gels sind nach Entfernung der Kämme kleine Taschen entstanden.
- Das Gel kann in das Gel-Elektrophorese-Gerät eingelegt werden.
- Die Schale des Gel-Elektrophorese-Gerätes wird mit einem 1:10 verdünnten TAE-Gemisch gefüllt, so dass das Gel ganz mit der Flüssigkeit bedeckt ist.
- Aus jedem Well der PCR-Platte werden 9 µl entnommen und in die Taschen mittels Pipette gegeben. Pro Reihe der Taschen können zwei Patienten analysiert werden.
- Jeweils die erste Tasche einer Patientenreihe wird für einen späteren Größenvergleich der Banden mit dem Leiter Rainbow DNA-Ladder - 100bp versehen.
- Es folgen die Negativ-Kontrolle und die 15 Proben mit der DNA eines Patienten.
- Die Elektroden können nun angeschlossen werden.
- Die Gel-Elektrophorese läuft bei 150 V mit 500 mA, 150 W eine Stunde lang.

3.4.3 Auslesen der Gelelektrophorese

Das Gel wird in den Scanner des Herstellers LI-COR gelegt und als Schwarz-Weiß-Bild dargestellt. Für das Computer-Programm ODYSSEY 2.1 wurden folgende Einstellungen verwendet:

- Quality: lowest, zur schnelleren Messzeit
- Focus offset: 2,0 mm
- Intensity: 700 bei 2.0
- Gel 19 cm auf 19 cm scannen.

Die Banden werden anhand des Worksheets aus Anhang 10.1 ausgewertet.

3.5 Studientyp, Patienten und statistische Verfahren

Die vorliegende Arbeit ist zum einen eine experimentelle Studie, in der genetisches Material gesammelt, im Labor analysiert und Daten prospektiv erhoben wurden. Zum anderen ist die Studie eine nicht-interventionelle klinische Studie, deren Daten retrospektiv untersucht wurden. Hierbei erhielten die Patienten eine Therapie, die unabhängig von der vorliegenden Studie, ausschließlich aus medizinischen Gründen angeordnet wurde. Anschließend wurden die Patienten und ihre Krankheitsverläufe beobachtet und beschrieben [47].

In die Studie wurden 129 konsekutive Kinder und Jugendliche aufgenommen, die in der Universitäts-Kinderklinik Würzburg aufgrund einer B-Vorläufer-ALL (90 Patienten), T-ALL (13 Patienten), eines Hodgkin-Lymphoms (18 Patienten) oder Non-Hodgkin-Lymphoms (8 Patienten) behandelt wurden. Darunter waren 68 Jungen und 61 Mädchen. Der Altersmedian lag bei 7,3 Jahren. 21 Kinder und Jugendliche entwickelten eine Osteonekrose innerhalb der Nachbeobachtungszeit, die im Median 5,3 Jahre betrug. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (183/12).

Zur Beschreibung der Ergebnisse wurden folgende Tests verwendet [48] [49]:

Chi-Quadrat-Test, Fisher und Yates, Mehta und Patel

Der Chi-Quadrat-Test (pc) nach der Maximum-Likelihood-Methode wurde im Allgemeinen zur Beschreibung der Abhängigkeit zwischen zwei klassifizierten Variablen berechnet. Im Falle einer zu geringen Feldbesetzung bzw. zu geringen Erwartungswerten wurde bei einer 4-Felder-Tafel der exakte Test nach Fisher und Yates berechnet (pfy) und bei größeren Tafeln der exakten Test nach Mehta und Patel (pmp).

Mann und Whitney

Mit dem U-Test nach Mann und Whitney wurde ein Messwert zwischen zwei Gruppen verglichen, wenn keine Gaußsche Normalverteilung der Messwerte angenommen werden konnte.

Kruskal und Wallis

Bei drei oder mehr zu vergleichenden Gruppen wurde der U-Test durch die einfaktorielle Rangvarianzanalyse nach Kruskal und Wallis ersetzt.

Kaplan und Meier

Die Überlebensstatistik wurde nach Kaplan und Meier erstellt. Startpunkt war in dieser Studie für alle Patienten der Therapiebeginn. Endpunkt war der letzte ausgeschiedene Patient. Für alle Zeitpunkte wurde der Anteil der Patienten geschätzt die noch am Leben sind. Diese ergeben sich aus der Beobachtungszeit der überlebenden Patienten sowie der Überlebenszeit der verstorbenen Patienten. Diese geschätzte Überlebensrate umfasst auch Patienten, die lebend ausgeschieden sind. Dieses Verfahren erlaubt den Vergleich der Überlebensraten zwischen Gruppen. Zum Vergleich von je zwei Gruppen wird der log-rank Test berechnet.

Multivariate Überlebensstatistik

Die multivariate Überlebensstatistik nach Cox berechnet den sog. Prognose-Index. Dieser ergibt sich aus den Zeiten bis „last seen“, dem Status bei

last seen und mehreren angegebenen Variablen, den Prediktoren. Die Prediktor-Variablen sollten Gaußverteilt oder bivariat sein. Das Ergebnis ist eine Serie von Tabellen mit den Angaben β , Risikoverhältnis = Hazard-Ratio (HR) und p-Wert. Der Prognoseindex kann für jeden Patienten aus der Summe der mit β gewichteten Variablen errechnet werden. Die Analyse wird mit allen denkbaren Prediktor-Variablen begonnen und nach Entfernung des jeweils schlechtesten Prediktors solange fortgeführt, bis alle Prediktoren signifikant sind.

Konfidenzintervall

Ein Konfidenzintervall wird berechnet, um die Güte eines Schätzwertes zu beurteilen. Der aus der vorhandenen Stichprobe ermittelte Schätzwert repräsentiert nur den tatsächlichen Wert der Grundgesamtheit, und stimmt mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht exakt mit ihm überein. Das Konfidenzintervall (CI oder Vertrauensbereich) gibt einen Hinweis auf die Genauigkeit des errechneten Ergebnisses. Ein 95%-Konfidenzintervall gibt den Bereich an, der mit 95%-iger Wahrscheinlichkeit den ermittelten Parameter überdeckt.

Gaußsche Normalverteilung

Zur Überprüfung auf eine Gaußsche Normalverteilung wurde die Probitdarstellung mit den Grenzen nach Lilliefors verwendet.

p-Werte

Um die Testergebnisse quantitativ vergleichen zu können, wurden p-Werte berechnet. Ein p-Wert unter 0,05 wird als signifikant bezeichnet und das Ergebnis als wesentlich interpretiert.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenkohorte

In diese Studie wurden Daten von 129 Patienten aufgenommen und ausgewertet. Im Folgenden werden die Patienten hinsichtlich Alter, Geschlecht, Diagnose, Therapie, Gewichtsverlauf und Rezidiv- und Überlebensstatistik vorgestellt.

Alter

Die 129 Patienten umfassen ein Altersspektrum von 66 Tagen bis 22 vollendeten Lebensjahren bei der Erstdiagnose. Der Patient mit 22 Jahren stellt eine Ausnahme dar. Das mittlere Alter betrug $8,2 \pm 5,5$ Jahre mit einem Altersmedian von 7,3 Jahren und einem 68 %-CI von 2,5 bis 15,3 Jahren.

Das Alter bei Erstdiagnose der Grunderkrankung war signifikant verschieden. Kinder mit B-Vorläufer-ALL waren im Mittel 6,3 Jahre, T-ALL-Patienten 9,9 Jahre, NHL-Kinder 11,8 Jahre und HD-Patienten 14,8 Jahre alt. Diese Altersverteilung ist repräsentativ [2] [3] [4].

In Abbildung 4.1 ist das Alter der Patienten bei Erstdiagnose in Bezug auf die Erkrankungen verteilt dargestellt. Das Alter ist in Jahren und Jahresbruchteilen bei Erstdiagnose angegeben. Die Boxen umfassen 68 % der Patienten, die Linie in der Box markiert den Median und die Whiskers zeigen die Spanne an.

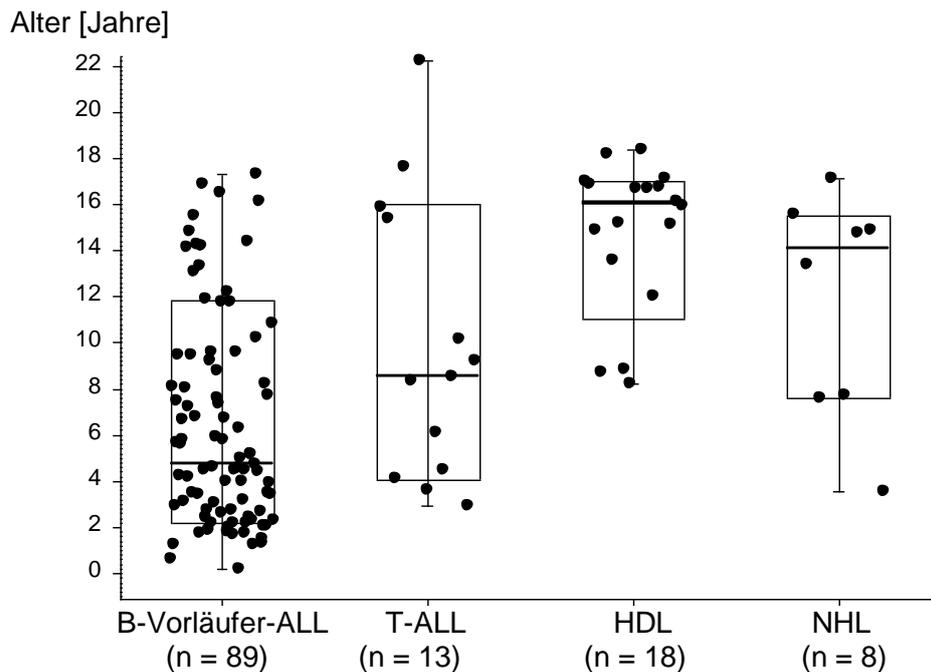


Abbildung 4.1: Darstellung des Alters der Patienten bei Erstdiagnose für die verschiedenen Erkrankungsgruppen

Geschlecht

Männliche Kinder erkranken leicht vermehrt an malignen Erkrankungen [50] und auch in dieser Studie waren mit 68 männlichen zu 61 weiblichen Patienten etwas mehr Jungen betroffen als Mädchen. Dies entspricht einem Verhältnis von 53 % Jungen zu 47 % Mädchen.

Diagnose

Wie in Tabelle 4.1 erkennbar, wurden in diese Studie vor allem Kinder mit einer B-Vorläufer-ALL aufgenommen. Die T-ALL gehört zu den akuten lymphoblastischen Leukämien. Sie ist aber, wie auch in dieser Studie, deutlich seltener als die B-Vorläufer-ALL. Eine weitere große Patientengruppe betrifft Kinder und Jugendliche mit Lymphomen.

Diagnosegruppe	Anzahl	%
B-Vorläufer-ALL	90	69,77
T-ALL	13	10,08
Hodgkin-Lymphom	18	13,95
Non-Hodgkin-Lymphom	8	6,20

Tabelle 4.1: Diagnosegruppen

Therapie

Die Behandlung der Patienten erfolgte risikostratifiziert innerhalb von Therapieoptimierungsstudien.

63 Patienten wurden gemäß ALL-BFM 2000 therapiert. Diese Therapieoptimierungsstudie wurde im Jahr 2009 von der AIEOP-BFM ALL 2009-Studie abgelöst. 30 der ALL-Patienten aus der vorliegenden Arbeit wurden in dieser Studie behandelt. Die 16 Patienten mit Hodgkin-Lymphom wurden in der Therapieoptimierungsstudie EuroNet-PHL-C1 und 2 Patienten nach EuroNet-PHL-LP1 behandelt. 18 Kinder wurden zu einer Gruppe zusammengefasst, die keine der 4 oben genannten Protokolle erhielten. 2 Patienten mit einer Säuglingsleukämie wurden nach Interfant 06 therapiert, 2 Patienten mit einer bcr-abl positiven ALL in EsPhALL, eine Patientin mit einem lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphom erhielt nur eine Lymphknoten-Resektion, 5 Patienten mit B-NHL wurden im B-NHL 2004 Protokoll behandelt und 2 Patienten im ALL 95 Protokoll. 5 ALL- Patienten mit einem Rezidiv wurden mit dem ALL-Rezidiv-Protokoll therapiert. Eine Patientin mit einem MALT-Lymphom des Magens erhielt Rituximab als Monotherapie.

Wie Tabelle 4.2 für die ALL zeigt, wurden 40 % der Patienten der Standard-Risiko-Gruppe (SR), ca. 18 % der mittleren Risikogruppe (MR) und ca. 15 % der Hochrisiko-Gruppe (HR) zugeordnet.

	Gruppe	Anzahl	%
Therapie- optimierungs- studien	ALL-BFM 2000	63	48,84
	AIEOP-BFM 2009	30	23,26
	EuroNet-PHL-C1	16	12,40
	EuroNet-PHL-LP1	2	1,55
	Andere	18	13,95
Risikogruppen für ALL- Patienten	SR	52	40,31
	MR	23	17,83
	HR	19	14,73
	keine Einteilung	35	27,13

Tabelle 4.2: Therapieoptimierungsstudien und Einteilung der ALL-Patienten in Risikogruppen

Ein wesentlicher Bestandteil der Therapie von Leukämien und Lymphomen sind Steroide aus der Gruppe der Glukokortikoide. Die Dauer und Intensität der Steroidgabe unterscheidet sich zwischen den verschiedenen Protokollen. Die Therapie-Protokolle für Lymphom-Patienten enthalten kürzere Steroidphasen als die Leukämie-Therapieoptimierungsstudien [51] [52] [53].

Von 129 Patienten erhielten 87 Kinder während ihrer Therapie das Glukokortikoid Prednison. 38 Patienten erhielten protokollgemäß Dexamethason. Lediglich vier Kinder erhielten kein Steroid. Stattdessen erhielt eine Patientin als Therapie Rituximab und in zwei Fällen erfolgte nur die Resektion befallener Lymphknoten, davon einmal im Rahmen des Protokolls EuroNet-PHL-LP 1. Bei einem Patienten fehlte die Angabe. Diese Patienten wurden zu der Gruppe „kein Steroid“ zusammengefasst.

Art der Therapie	n	%
Prednison	87	67,44
Dexamethason	38	29,46
Kein Steroid	4	3,10

Tabelle 4.3: Art der Steroidtherapie

Allgemeine Gewichtszunahme

Im Folgenden werden Patientengruppen hinsichtlich ihrer Gewichtszunahme während ihres ersten Therapieblocks verglichen. Für ALL-Patienten entspricht dies dem Zeitraum des Therapieblocks IA. Für Lymphom-Patienten wurden Daten im Zeitraum von Beginn des ersten Chemotherapie-Blocks bis 4 Wochen danach herangezogen.

Die Patienten hatten ein mittleres initiales Gewicht von 30,12 kg. Das maximale Gewicht lag im Mittel bei 32,24 kg. Die mittlere Gewichtszunahme lag bei 1,78 kg mit einem Gewichtsverlust von maximal 7 kg und einer maximalen Gewichtszunahme von 11,3 kg, die mittlere prozentuale Gewichtszunahme betrug 8,66 %, wie in Tabelle 4.4 ersichtlich ist.

Gewicht	n	MW	ST	Median	68% CI	Min	Max	
Initial [kg]	98	30,12	22,04	20,95	12,38	56,21	4,9	102,2
Maximalgewicht [kg]	95	32,24	22,24	23,60	14,55	58,54	5,3	100,1
Tag des maximalen Gewichts im ersten Block	85	18,12	7,91	17,00	10,00	28,00	1	31
Gewichtszunahme [kg]	95	1,78	2,17	1,60	0,30	3,04	-7	11,3
Gewichtszunahme [%]	95	108,66	9,33	107,00	101,25	115,40	79,83	139,84

Tabelle 4.4: Gewicht und Gewichtszunahme

Rezidiv- und Überlebensstatistik

Der Erfolg der Therapien ist deutlich an der Rezidiv- und Überlebensstatistik zu erkennen. Erfreulicherweise überlebten 96,1 % der Kinder dieser Studie ihre maligne Grunderkrankung. 88,4 % der Patienten überlebten rezidivfrei. 14 Patienten erlitten ein Rezidiv, welches 9 Kinder ebenfalls überlebten. Leider verstarben dennoch 4 Patienten an ihrem Rezidiv und ein Kind verstarb ohne Rezidiv an einer schweren Graft-versus-Host-Disease.

Im Median lag die Nachbeobachtungszeit für rezidivfreies Überleben bei 5,3 Jahren. Das Ende der Probeentnahme war mindestens 2 Jahre vor Ende

der Nachbeobachtungszeit. Innerhalb dieser Beobachtungszeit entwickelten 21 Patienten eine Osteonekrose.

Die unten stehende Graphik in Abbildung 4.2 zeigt die rezidivfreie Überlebensrate nach Kaplan-Meier-Berechnung. Auf der x-Achse ist die Zeit in Jahren bis Ende der Nachbeobachtungszeit aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Überlebenswahrscheinlichkeit ohne Rezidiv. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sind dies 128 Patienten. Bei einem Patienten war das Datum der Erstdiagnose unbekannt. Die mittlere Linie ist die rezidivfreie Überlebensrate, die beiden äußeren Linien begrenzen deren 95 %-Vertrauensbereich nach oben und unten. Die senkrechten Striche markieren Patienten, die am Ende ihrer Beobachtungszeit rezidivfrei lebten. Die Wahrscheinlichkeit nach 5 Jahren rezidivfrei zu leben betrug in dieser Kohorte 87,2%.

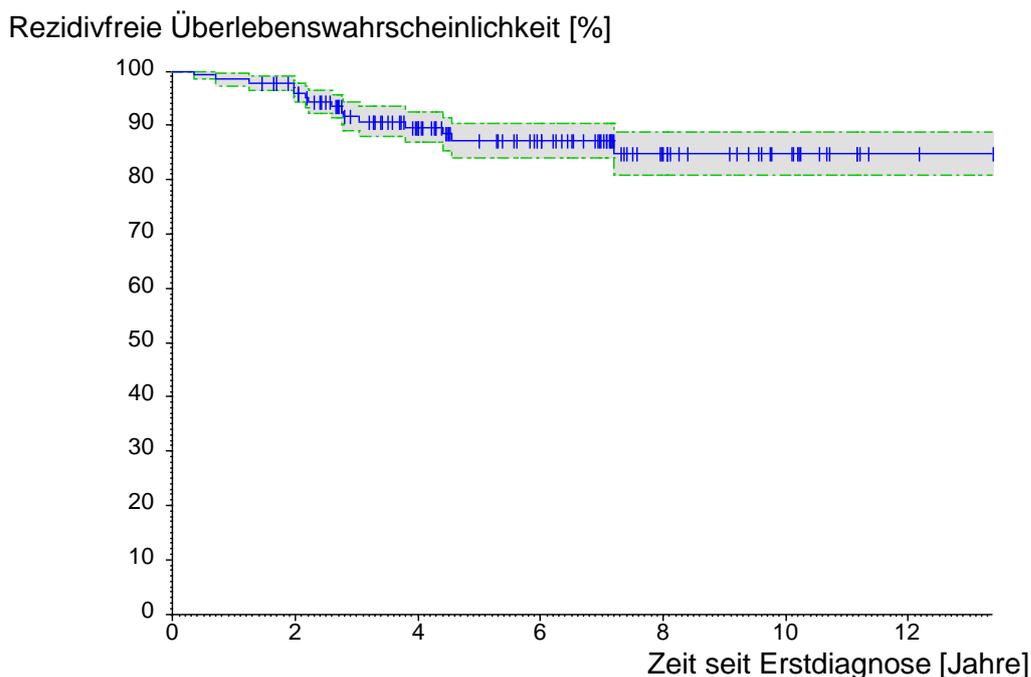


Abbildung 4.2: Rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit

Durch eine multivariate Überlebensstatistik konnte gezeigt werden, dass das rezidivfreie Überleben nicht durch das Auftreten einer Osteonekrose beeinflusst wurde.

4.2 Klinische Charakteristika der Patienten, die eine Osteonekrose entwickelten

21 von 129 Patienten entwickelten im Verlauf Osteonekrosen. Die klinischen Parameter der Kinder, die eine Osteonekrose entwickelten, sind in Tabelle 4.6 dargestellt. Diese Parameter sind: Diagnose der malignen Grunderkrankung, Geschlecht, Alter bei Erstdiagnose, Therapie, verwendetes Steroid in der Induktionsphase, Anzahl der betroffenen Osteonekrose-Lokalisationen, maximale prozentuale Gewichtszunahme im ersten Therapieblock bezogen auf das initiale Gewicht bei Erstdiagnose, minimale alkalische Phosphatase als Marker für den Knochenstoffwechsel, und die Lokalisation der Bestrahlung, falls diese stattfand.

Ergebnisse

Patientennummer	Diagnose	Geschlecht	Alter bei ED [Jahre]	Therapie	Art des Steroids	Anzahl betroffener ON-Stellen	Max. Gewichtszunahme [%]	Min.AP [U/L] (altersadaptierter Normwert)	Bestrahlung
1	B-Vorläufer- ALL	männlich	5	AIEOP-BFM	Prednison	1	7,0	64 (101-347)	nein
2	B-Vorläufer- ALL	männlich	14	ALL-BFM 2000	Prednison	5	1,9	51 (83-381)	nein
3	B-Vorläufer- ALL	männlich	15	ALL-BFM 2000	Prednison	4	-0,7	42 (83-381)	nein
4	B-Vorläufer- ALL	männlich	4	ALL-BFM 2000	Prednison	4	8,3	49 (101-347)	nein
5	B-Vorläufer- ALL	männlich	11	AIEOP-BFM	Prednison	3	6,7	51 (50-316)	nein
6	B-Vorläufer- ALL	weiblich	5	ALL-BFM 2000	Prednison	1	9,9	154 (101-347)	nein
7	B-Vorläufer- ALL	männlich	7	EsPhALL	Prednison	2	9,7	46 (50-316)	nein
8	B-Vorläufer- ALL	weiblich	9	AIEOP-BFM	Prednison	1	9,5	49 (71-321)	nein
9	B-Vorläufer- ALL	männlich	16	ALL-BFM 2000	Dexamethason	2	15,4	46 (83-381)	nein
10	B-Vorläufer- ALL	männlich	2	ALL-BFM 2000	Dexamethason	2	37,7	80 (115-409)	nein
11	T-ALL	männlich	15	AIEOP-BFM	Dexamethason	7	7,7	42 (83-381)	nein
12	T-ALL	männlich	15	AIEOP-BFM	Prednison	4	2,6	34 (83-381)	nein
13	T-ALL	männlich	22	ALL-Rez	Prednison	2	1,9	35 (40-129)	nein
14	T-ALL	weiblich	9	EsPhALL	Prednison	7	1,9	40 (71-321)	nein
15	Hodgkin-Lymphom	weiblich	17	Euro-Net-PHL-C1	Prednison	2	3,5	41 (60-329)	nein
16	Hodgkin- Lymphom	weiblich	18	Euro-Net-PHL-C1	Prednison	4	-0,7	26 (35-105)	ja
17	Hodgkin- Lymphom	weiblich	18	Euro-Net-PHL-C1	Prednison	1	-0,5	32 (35-105)	ja
18	Hodgkin- Lymphom	weiblich	16	Euro-Net-PHL-C1	Prednison	4	1,3	44 (60-329)	ja
19	Hodgkin- Lymphom	weiblich	16	EuroNet PHL LP1	Prednison	6	1,2	37 (60-329)	nein
20	Hodgkin- Lymphom	weiblich	17	EuroNet-PHL C1	Prednison	2	1,7	45 (60-329)	ja
21	Non-Hodgkin-Lymphom	männlich	7	B-NHL-BFM 04	Dexamethason	2	5,0	100 (50-316)	nein

Bestrahlungslokalisation:

Nr.16: tief cervical supraclaviculär bds., mediastinal, hilär bds., paraaortal bis Nieren, Milz, beide Lungen, Os ilium (=ON Lokalisation)

Nr.17: infra- und supradiaphragmal

Nr.18: LK cervical, LK supra- und infraclaviculär bds., mediastinal, hilär rechts

Nr.20: mediastinal, supra- und infraclaviculär und axillär links. Nach Auftreten der ON am Knie bds.: zusätzlich Bestrahlung links axillär, infraclaviculäres Lymphabflussgebiet

Tabelle 4.5: Übersicht der 21 Osteonekrosepatienten

4.3 Vergleich von Patienten mit und ohne Osteonekrose anhand klinischer Daten und Laborparameter

Die Entwicklung einer Osteonekrose ist eine bedeutende Langzeit-Nebenwirkung der ALL- und Lymphomtherapie. Klinisch entwickeln die Patienten Schmerzen und eine Einschränkung der Mobilität sowie eine erhöhte Frakturgefahr mit einer zum Teil deutlichen Einschränkung der Lebensqualität. Zur besseren Prävention dieser Folgeerkrankung der ALL-/und Lymphomtherapie ist es dringend notwendig, Risikofaktoren für die Entwicklung dieser spezifischen Nebenwirkung zu definieren.

4.3.1 Klinische Daten

Im Folgenden wurden Patienten mit und ohne Osteonekrosen verglichen hinsichtlich ihres Alters bei Erstdiagnose, der Gewichtszunahme im ersten Therapieblock, des Geschlechts, der Diagnose der malignen Grunderkrankung, der Art des Therapieprotokolls und des angewandten Steroids in der Induktions-Phase. Außerdem wird auf die Lokalisation der Osteonekrosen eingegangen.

Alter

Das Alter übte einen hoch signifikanten Einfluss auf die Entwicklung von Osteonekrosen aus ($p(u) = 0,00005$). Das mittlere Alter der Osteonekrose-Patienten betrug 12,72 Jahre im Gegensatz zu im Mittel 7,38 Jahren der Kinder ohne Osteonekrose.

Maximale Gewichtszunahme

In den ersten vier Wochen der Therapie nahmen Patienten mit Osteonekrose marginal mehr zu, als Kinder die später keine Osteonekrose entwickelten. Erstere nahmen im Mittel 1,94 kg zu, letztere steigerten ihr Gewicht im Mittel um 1,73 kg.

Vergleich Gewichtszunahme nach Art des Steroids

Patienten, die im Rahmen ihrer Therapie Dexamethason erhielten, zeigten mit $113 \% \pm 12 \%$ eine wesentlich größere Gewichtszunahme als Patienten mit Prednison-Behandlung, die $106 \% \pm 6 \%$ zunahmen, wie Abbildung 4.3 zeigt. Dieser Unterschied ist mit $p(u) = 0,0015$ signifikant. In Abbildung 4.3 ist die prozentuale Gewichtszunahme in Boxplots dargestellt, aufgeteilt nach Art des Steroids. Der dunkler hinterlegte Bereich stellt den Bereich von Gewichtsverlusten dar. Die Linie in der Box markiert den Median und die Whiskers zeigen die Spanne an.

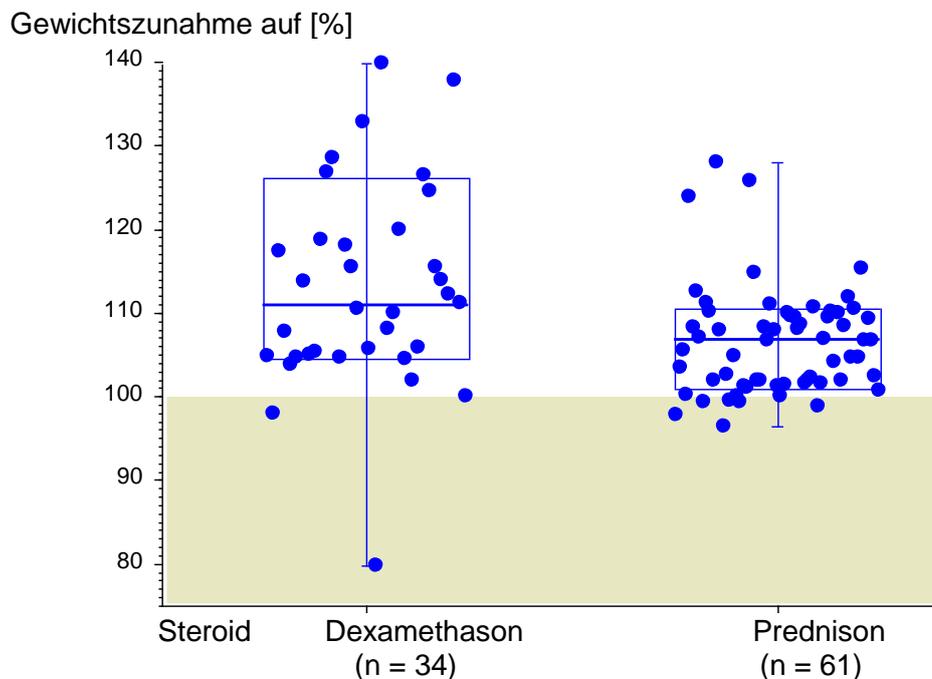


Abbildung 4.3: Gewichtszunahme nach Art des Steroids

Die absolute Gewichtszunahme war ebenfalls mit $p(u) = 0,018$ signifikant verschieden zwischen Kindern mit Dexamethason-Therapie, die $2,26 \text{ kg} \pm 2,69 \text{ kg}$ zunahmen und Kindern mit Prednison-Behandlung, die im Mittel $1,51 \text{ kg} \pm 1,79 \text{ kg}$ zunahmen.

Vergleich Gewichtszunahme nach Diagnose

Die Art der Diagnose machte einen signifikanten Unterschied aus bezüglich der prozentualen Gewichtszunahme. Kinder mit Leukämie erhöhten ihr Gewicht mit 2,01 kg, bzw. 1,91 kg wesentlich stärker als Patienten mit Lymphomen. Bei ihnen fiel die Gewichtszunahme mit 0,27 kg, bzw. 0,92 kg deutlich geringer aus, wie in Tabelle 4.6 zu sehen ist.

Diagnose	Gewichtszunahme (kg)			p(kw)
	n	MW	ST	
B-Vorläufer-ALL	70	2,01	2,29	0,024
T-ALL	11	1,91	1,74	
Hodgkin-Lymphom	9	0,27	1,02	
NHL	5	0,92	1,76	

Tabelle 4.6: Prozentuale Gewichtszunahme nach Diagnose aufgeteilt

Geschlecht

Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Osteonekrose-Patienten war mit 18,18 % Jungen zu 14,75 % Mädchen nahezu gleich und auch in der Gruppe ohne Osteonekrose ergab sich kein Unterschied zwischen den Geschlechtern.

Diagnose

Patienten mit Hodgkin-Lymphom oder T-ALL entwickelten häufiger eine Osteonekrose als Kinder mit B-Vorläufer-ALL oder NHL. Ein Drittel der Hodgkin-Lymphom-Patienten und knapp ein Drittel der T-ALL-Patienten entwickelten eine Osteonekrose. Bei B-Vorläufer-ALL- und Non-Hodgkin-Lymphom-Kindern waren mit jeweils etwa 12 % seltener betroffen.

Art des Protokolls

Eine Abhängigkeit zwischen der Entwicklung von Osteonekrosen und angewandtem Therapie-Protokoll war mit $p = 0,060$ nur knapp nicht signifikant. 90,16 % bzw. 86,67 % der Patienten, die gemäß der Therapieoptimierungs-

studie ALL-BFM 2000 bzw. der Nachfolgestudie AIEOP-BFM ALL 2009 behandelt wurden, entwickelten keine Osteonekrose.

Steroid im ersten Therapieblock

Es ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Entwicklung von Osteonekrosen zwischen den verwendeten Steroiden Prednison und Dexamethason, bzw. zwischen der Therapie mit und ohne Steroid.

Von 21 Patienten mit Osteonekrose wurden 4 (19 %) mit Dexamethason behandelt und von den 102 Patienten ohne Osteonekrose 34 (31 %). Dieser Unterschied ist mit $p = 0.18$ nicht signifikant. Die 4 Kinder ohne Steroidtherapie entwickelten keine Osteonekrose.

Kinder mit Dexamethason-Therapie waren mit 6,11 Jahren deutlich jünger als Kinder mit Prednison-Gabe, die im Mittel 9,01 Jahre alt waren. Sie waren außerdem wesentlich jünger als Kinder ohne Steroid-Therapie, die im Mittel 11,42 Jahre alt. Wie in Tabelle 4.7 dargestellt ist, ist die Verteilung mit $p(kw) = 0,0044$ signifikant.

Steroid	Alter bei ED [Jahre]			p_{kw}
	N	MW	ST	0,0044
keines	4	11,42	3,09	
Dexamethason	38	6,11	5,03	
Prednison	86	9,01	5,51	

Tabelle 4.7: Vergleich der Steroide bezogen auf das Alter bei ED

Übersichtstabellen

Tabelle 4.8 und Tabelle 4.9 zeigen Übersichten hinsichtlich der oben genannten klinischen Parameter zu Osteonekrose-Patienten und Patienten, die keine Osteonekrose entwickelten. In Tabelle 4.9 beziehen sich die Prozentangaben jeweils auf die Zeile.

Parameter	Osteonekrose						p (u)
	ja			nein			
	n	MW	ST	n	MW	ST	
Alter [Jahre]	21	12,72	5,53	106	7,38	5,05	0,00005
Maximale Gewichtszunahme [kg]	21	1,94	2,11	74	1,73	2,20	0,87

Tabelle 4.8: Alter und maximale Gewichtszunahme

Parameter	Osteonekrose				p-Wert	
	ja		nein			
	n	%	n	%		
Geschlecht					0,60	
	Männlich	12	18,18	54		81,82
	Weiblich	9	14,75	52		85,25
Diagnose					0,086 (chi)	
	Prä-B-ALL	10	11,36	78		88,64
	T-ALL	4	30,77	9		69,23
	HD	6	33,33	12		66,67
	NHL	1	12,50	7		87,50
Art des Protokolls					0,060	
	ALL-BFM 2000	6	9,84	55		90,16
	AIEOP-BFM ALL 2009	4	13,33	26		86,67
	Euro-Net-PHL-C1	5	31,25	11		68,75
	Euro-Net-PHL-LP1	1	50,00	1		50,00
	Seltene	5	27,78	13		72,22
Steroid					0,39	
	Prednison	17	20,00	68		80,00
	Dexamethason	4	10,53	34		89,47
	andere Therapie	0	0,00	4		100,00
Nur Dexamethason		4	19,00	34	31,00	0,18 (pc)

Tabelle 4.9: Vergleich zwischen Patienten mit und ohne Osteonekrose hinsichtlich Geschlecht, Diagnose, Art des Protokolls und Steroid

Lokalisationen der Osteonekrosen

Insgesamt traten bei den 21 betroffenen Patienten an 35 Stellen Osteonekrosen auf. Am häufigsten waren Osteonekrosen an der unteren Extremität lokalisiert. Die langen Röhrenknochen, vor allem der Femur, stellten Prädilektionsstellen dar und machten die Hälfte aller Osteonekrosen aus. Hüfte und Becken waren mit 20 % ebenfalls häufig betroffen. Eine Ausnahme an der unteren Extremität stellt der Fuß dar, der mit ca. 14 % nur vereinzelt betroffen war. Die mit ca. 14 % eher seltenen Osteonekrosen an der oberen Extremität traten alle am Humeruskopf auf.

Diagnose und Lokalisation der Osteonekrose

Tabelle 4.10 gibt eine Übersicht, an welcher Lokalisation Osteonekrosen innerhalb einer Diagnosegruppe am häufigsten auftrat. Die Prozentangaben beziehen sich jeweils auf eine Zeile.

5,81 % aller Kinder mit B-Vorläufer-ALL entwickelten eine Osteonekrose an Tibia oder Fibula und 4,65 % am Fuß. Andere Lokalisationen waren in dieser Patientengruppe seltener vertreten. T-ALL-Kinder entwickelten zu 23,08 % eine Osteonekrose am distalen Femur oder Knie, aber auch Tibia oder Fibula und Hüfte oder Becken waren mit jeweils 15,38 % häufige Osteonekrose-Lokalisation bei T-ALL-Patienten. Ein ähnliches Verteilungsmuster lag bei Hodgkin-Lymphom-Patienten vor, die mit 22,22 % am häufigsten am distalen Femur oder Knie eine Osteonekrose entwickelten, gefolgt von 16,67 % an Hüfte oder Becken. Häufiger als alle anderen Patienten entwickelten Hodgkin-Lymphom-Patienten mit 16,67 % eine Osteonekrose am Humeruskopf. Der einzige Patient mit einem Non-Hodgkin-Lymphom, der eine Osteonekrose entwickelte, zeigte diese am distalen Femur bzw. Knie.

Diagnose	Lokalisation Osteonekrose				p(mp)
	ja		nein		
	n	%	n	%	
Humeruskopf					
B-Vorläufer-ALL	1	1,16%	85	98,84%	0,019
T-ALL	1	7,69%	12	92,31%	
Hodgkin-Lymphom	3	16,67%	15	83,33%	
NHL	0	0,00%	8	100,00%	
Tibia/Fibula					
B-Vorläufer-ALL	5	5,81%	81	94,19%	0,49
T-ALL	2	15,38%	11	84,62%	
Hodgkin-Lymphom	1	5,56%	17	94,44%	
NHL	0	0,00%	8	100,00%	
Hüfte/Becken					
B-Vorläufer-ALL	2	2,33%	84	97,67%	0,029
T-ALL	2	15,38%	11	84,62%	
Hodgkin-Lymphom	3	16,67%	15	83,33%	
NHL	0	0,00%	8	100,00%	
dist.Femur / Knie					
B-Vorläufer-ALL	2	2,33%	84	97,67%	0,0027
T-ALL	3	23,08%	10	76,92%	
Hodgkin-Lymphom	4	22,22%	14	77,78%	
NHL	1	12,50%	7	87,50%	
Fuß					
B-Vorläufer-ALL	4	4,65%	82	95,35%	0,69
T-ALL	1	7,69%	12	92,31%	
Hodgkin-Lymphom	0	0,00%	18	100,00%	
NHL	0	0,00%	8	100,00%	

Tabelle 4.10: Übersichten zu Diagnose und Lokalisation der Osteonekrose

Verglichen wurde die Gruppe der Patienten mit Osteonekrose an einer bestimmten Stelle mit der Gruppe der Patienten mit Osteonekrose an einer anderen Stelle oder ohne Osteonekrose. Es erfolgte weiterhin eine Unterteilung der Patienten in 4 Diagnosegruppen.

Ziel dieser Betrachtung und Ermittlung des p-Wertes war es, herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen Diagnose der Grunderkrankung und

Lokalisation der Osteonekrose gibt. Hierfür wurde ein p-Wert pro Osteonekrose-Lokalisation berechnet. Mittels p-Wert lässt sich beantworten, ob die Patientenzahlen sich zufällig auf die Diagnose- und Osteonekrose-Gruppen verteilen oder ob Zusammenhänge erkennbar sind. Bei signifikantem p-Wert kann dann eine Abhängigkeit zur Diagnose postuliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass es einen Zusammenhang zwischen der Osteonekrose am distalen Femur bzw. Knie und der Diagnose gibt, da der p-Wert hier mit 0,0027 eine signifikante Verteilung der Patienten anzeigt.

Alter und Lokalisation der Osteonekrose

In der vorliegenden Arbeit zeigte nicht jede Osteonekrose-Lokalisation einen signifikanten Zusammenhang mit einem höheren Alter bei Erstdiagnose. Kinder mit einer Osteonekrose an Tibia oder Fibula waren im Mittel nicht signifikant älter als Kinder ohne Osteonekrose oder mit Osteonekrose an einer anderen Lokalisation. Patienten mit einer Osteonekrose am Fuß waren im Mittel jünger als Kinder ohne die genannte Erkrankung.

Osteonekrosen an Humeruskopf, Hüfte/Becken oder distalem Femur/Knie hingen signifikant mit einem höheren Alter bei Erstdiagnose ab.

Ort der Osteonekrose	Auftreten der Osteonekrose	Alter ED [Jahre]			p _U
		n	MW	ST	
Humeruskopf	ja	5	16,479	0,471	0,00037
	nein	120	7,931	5,365	
Tibia oder Fibula	ja	8	10,100	5,630	0,33
	nein	117	8,148	5,514	
Hüfte oder Becken	ja	7	14,515	5,927	0,0041
	nein	118	7,903	5,293	
distaler Femur oder Knie	ja	10	14,303	3,563	0,00015
	nein	115	7,749	5,354	
Fuß	ja	5	7,756	5,128	0,93
	nein	120	8,295	5,554	
Gesamt	ja	21	12,722	5,530	0,00005
	nein	106	7,382	5,045	

Tabelle 4.11: Vergleich zwischen Alter bei Erstdiagnose (ED) und verschiedenen Osteonekrose-Lokalisationen

4.3.2 Laborparameter

Im Folgenden wurden Patienten mit und ohne Osteonekrose verglichen hinsichtlich des initialen AP-Wertes, des niedrigsten AP-Wertes im Behandlungszeitraum, des Calcium- und anorganischen Phosphatwertes jeweils initial und am Tag der niedersten AP, sowie der Leukozytenzahl bei ALL-Patienten.

Alkalische Phosphatase

Die initialen AP-Werte zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit oder ohne Osteonekrose. Die niedrigste AP hingegen zeigte mit $p(\text{fy}) = 0,0055$ einen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit und ohne Osteonekrose. Der niedrigste Wert der AP war bei Osteonekrose-Patienten mit 48,37 U/L signifikant niedriger als bei den Kindern ohne Osteonekrose, die eine mittlere niedrigste AP von 63,10 U/L hatten.

Bezogen auf das Geschlecht konnte ein weiterer signifikanter Unterschied gezeigt werden. Die initiale AP war bei männlichen Patienten mit $154,9 \text{ U/l} \pm 59,8 \text{ U/l}$ im Mittel höher, als bei den Patientinnen, die eine AP von

131,69 U/l \pm 53,2 U/l im Mittel hatten. Der p(u)-Wert ist 0,047. Die Normwerte zwischen weiblichen und männlichen Kindern in den jeweiligen Altersgruppen sind vergleichbar.

Calcium

Die initialen Calciumwerte zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Patienten mit oder ohne Osteonekrose. Allerdings war der Calcium-Wert am Tag des niedrigsten AP-Wertes mit einem Mittelwert von 2,10 mmol/L in der Osteonekrose-Gruppe signifikant niedriger, als in der Gruppe der Nicht-Osteonekrose-Gruppe mit 2,18 mmol/L.

Anorganisches Phosphat

Das initiale anorganische Phosphat unterschied sich signifikant zwischen den Osteonekrose-Patienten mit im Mittel 1,39 mmol/L im Gegensatz zu den Kindern ohne Osteonekrose mit einem Mittelwert von 1,53 mmol/L. Das anorganische Phosphat am Tag der niedrigsten AP zeigte keinen Unterschied zwischen den Vergleichsgruppen.

Leukozyten

Die Befunde zu den Leukozytenzahlen betreffen nur die ALL-Diagnosen B-Vorläufer-ALL und T-ALL. Patienten mit einer Osteonekrose an Femur oder Knie hatten signifikant höhere Leukozytenzahlen bei Erstdiagnose. Diese hatten im Mittel 195.452 Leukozyten pro μ l, hingegen Kinder mit einer Osteonekrose an einer anderen Lokalisation oder ohne Osteonekrose eine Leukozytenzahl von gemittelten 38.511 Leukozyten pro μ l aufwiesen. Dieser Unterschied ist mit p(u)= 0,022 signifikant, wie in Tabelle 4.18 dargestellt ist. Die Leukozytenzahl im Hinblick auf alle Osteonekrose-Lokalisationen zeigte keinen signifikanten Unterschied

Übersichtstabellen:

Tabelle 4.12 zeigt eine Übersicht der Patienten mit und ohne Osteonekrose verglichen hinsichtlich der genannten Laborwerte.

Parameter	Osteonekrose						p (u)
	ja			nein			
	n	MW	ST	n	MW	ST	
AP initial [U/L]	19	142,74	53,90	79	143,13	58,66	0,95
Niedrigste AP absolut [U/L]	19	48,37	17,12	79	63,10	34,57	0,0055
Calcium initial [mmol/L]	19	2,34	0,24	79	2,31	0,18	0,41
Calcium am Tag der niedrigsten AP [mmol/L]	19	2,10	0,16	78	2,18	0,15	0,034
AnorgPh initial [mmol/L]	19	1,39	0,31	79	1,53	0,27	0,024
AnorgPh am Tag der niedrigsten AP [mmol/L]	19	1,23	0,36	78	1,37	0,33	0,14
Leukozytenzahl [1/ μ l]	11	4458,18	3337,03	69	5289,71	2344,68	0,16

Tabelle 4.12: Vergleich zwischen Patienten mit und ohne Osteonekrose hinsichtlich AP, Ca, AnorgPh, Leukozytenzahl

Tabelle 4.13 zeigt die Leukozytenzahl bezogen auf Patienten mit Osteonekrose an Femur oder Knie.

Parameter	ON Femur/Knie						p (u)
	ja			nein			
	n	MW	ST	n	MW	ST	
Leukozyten [1/ μ l]	5	195 452	348 743	83	38 511	92 908	0,022

Tabelle 4.13: Vergleich zwischen ALL-Patienten mit und ohne Osteonekrose an Femur oder Knie bezüglich der absoluten Leukozytenzahl bei Erstdiagnose

4.4 Zytokingenpolymorphismen

Zytokine hemmen oder fördern Entzündungsreaktionen und nehmen dadurch Einfluss auf vielfältige Prozesse im Körper [34], unter anderem auch auf den

Knochenstoffwechsel [21] [37]. Die genauere Betrachtung und der Vergleich von Zytokingenpolymorphismen kann ein besseres Abschätzen von Risikogruppen für die Entwicklung von Osteonekrosen möglich machen.

4.4.1 Übersicht der Zytokingenpolymorphismen

Für die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und IFN-gamma ergaben sich signifikante Unterschiede innerhalb der Gruppen.

In der Gruppe der Kinder mit Osteonekrosen trat der IL-6-Polymorphismus G/G, der einer hohen Produktion entspricht, wesentlich häufiger auf, als der Polymorphismus C/C, der einer niedrigen Produktion entspricht.

Der Genotyp T/T, der einer hohen Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IFN-gamma entspricht, zeigte sich häufiger in der Gruppe der Kinder mit Osteonekrose, als der Genotyp A/A mit einer geringen Produktion. In der Gruppe der Kinder ohne Osteonekrose zeigte sich ein entsprechendes Bild. Hier war der Genotyp T/T mit einer hohen entzündungsfördernden Produktion seltener, der Genotyp A/A mit einer geringen Produktion war häufiger.

Die untersuchten Genpolymorphismen im TGF-beta-, IL-10- und TNF-alpha-Gen waren nicht signifikant unterschiedlich innerhalb der Gruppen.

Tabelle 4.14 zeigt eine Übersicht der Zytokingenpolymorphismen aus den Genen für TNF-alpha, TGF-beta 10, TGF-beta 25, IL-10-1082, IL-10-819, IL-10-592, IL-6 und IFN-gamma im Vergleich zwischen Patienten mit und ohne Osteonekrose. Die p-Werte beziehen sich auf ein Zytokin und die Prozentangaben auf die Spalte. Für die untersuchten Genotypen der Polymorphismen ist ein Einfluss auf die Höhe der Zytokinproduktion in Tabelle 4.15 beschrieben.

Zytokin	Osteonekrose				p-Wert	
	ja		nein			
	n	%	n	%		
TNF-alpha-308						
	G/G	9	47,37	57	54,28	0,79
	A/G	6	31,58	32	30,48	
	A/A	4	21,05	16	15,24	
TGF-beta 10						
	C/C	5	26,31	19	18,45	0,74
	T/C	8	42,11	48	46,60	
	T/T	6	31,58	36	34,95	
TGF-beta 25						
	C/C	1	5,56	4	3,88	0,71
	G/C	2	11,11	25	24,27	
	G/G	15	83,33	74	71,85	
IL-10-1082						
	A/A	4	20,00	27	25,71	0,81
	G/A	11	55,00	57	54,29	
	G/G	5	25,00	21	20,00	
IL-10-819						
	C/C	11	55,00	61	58,10	0,12
	C/T	9	45,00	34	32,38	
	TT	0	0,00	10	9,52	
IL-10-592						
	C/C	11	55,00	61	58,10	0,12
	C/A	9	45,00	34	32,38	
	A/A	0	0,00	10	9,52	
IL-6-174						
	C/C	7	36,84	66	71,74	0,011
	C/G	2	10,53	8	8,70	
	G/G	10	52,63	18	19,56	
IFN-gamma-874						
	A/A	7	35,00	28	26,41	0,033
	T/A	5	25,00	58	54,72	
	T/T	8	40,00	20	18,87	

Tabelle 4.14: Vergleich zwischen Patienten mit und ohne Osteonekrose bezüglich der Zytokingenpolymorphismen von TNF-alpha, TGF-beta, IL-10, IL-6 und IFN-gamma.

In Tabelle 4.15 sind die Zytokine mit ihren Produktionen und den dazugehörigen Genotypen dargestellt.

Typus	Intensität	Ausprägung
TNF- α	High	G/A A/A
	Low	G/G
TGF- β 1	High	T/T G/G T/C G/G
	Intermediate	T/C G/C C/C G/G T/T G/C
	Low	C/G G/C C/C C/C T/T C/C T/C C/C
IL-10	High	GCC/GCC
	Intermediate	GCC/ACC GCC/ATA
	Low	ACC/ACC ACC/ATA ATA/ATA
IL-6	High	G/G G/C
	Low	C/C
IFN- γ	High	T/T
	Intermediate	T/A
	Low	A/A

Tabelle 4.15: Zytokinproduktionen bezogen auf die jeweiligen Genotypen

4.4.2 IL-6 high- und low-producer

Für den IL-6-174-Polymorphismus ist eine hohe IL-6 Produktion bei G/G Homozygoten und Heterozygoten beschrieben, vgl, Abschnitt 10.1, während Probanden mit dem C/C Polymorphismus weniger IL-6 produzieren. Auch hier zeigt sich, dass Patienten, die einen IL-6 high-producer Genotyp aufweisen, häufiger Osteonekrosen entwickelten als Kinder mit einem IL-6-low-producer Genotyp.

Für die Produktionen der Zytokine TNF-alpha, TGF-beta 10, TGF-beta 25, IL-10-1082, IL-10-819, und IL-10-592 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Bei dem Zytokin IFN-gamma entspricht genau ein Genotyp einer bestimmten Produktion. Somit ergaben sich bei Betrachtung der Produktion keine neuen Erkenntnisse im Vergleich zu der des Genotyps.

Tabelle 4.16 gibt eine Übersicht zur Produktion der Zytokine im Vergleich zwischen Kindern mit und ohne Osteonekrose.

Zytokin-Produktion	Osteonekrose				p-Wert
	ja		nein		
	n	%	n	%	
TNF-alpha	19	100,00	105	100,00	0,58
low (G/G)	9	47,37	57	54,29	
high (A/G) (A/A)	10	52,63	48	45,71	
TGF-beta	18	100,00	103	100,00	0,96
low	2	11,11	13	12,62	
intermediate	4	22,22	25	24,27	
high	12	66,67	65	63,11	
IL-10	20	100,00	105	100,00	0,81
low	4	20,00	27	25,71	
intermediate	11	55,00	57	54,29	
high	5	25,00	21	20,00	
IL-6	19	100,00	92	100,00	0,0045
low	7	36,84	66	71,74	
high	12	63,16	26	28,26	
IFN-gamma	20	100,00	106	100,00	0,033
low	7	35,00	28	26,41	
intermediate	5	25,00	58	54,72	
high	8	40,00	20	18,87	

Tabelle 4.16: Vergleich zwischen Osteonekrose ja und nein bezüglich der Zytokin-Produktion

Verglichen wurde die Gruppe der Patienten mit Osteonekrose mit der Gruppe ohne Osteonekrose. Bei nicht-signifikanten p-Werten ist die Verteilung der

Patienten zwischen den Gruppen bezogen auf die Produktionsgrade sehr wahrscheinlich zufällig. Deutlich zu erkennen ist die signifikant unterschiedliche Verteilung zwischen der Osteonekrose Ja- und Nein-Gruppe beim Zytokin IL-6 für die Produktionsgrade (p -Wert $< 0,05$).

4.4.3 Inflammations-Score

Tabelle 4.17 gibt eine Übersicht über die Inflammation, die durch Zytokine hervorgerufen wird im Vergleich von Osteonekrose-Patienten mit Patienten ohne Osteonekrose.

Von PD Dr.med. Beate Winkler wurde ein Inflammationsscore folgendermaßen entwickelt. Der Inflammations-Score errechnet sich aus der Summe der Produktionsgrade der pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen. Die Einzelwerte werden addiert und ergeben einen Inflammations-Score.

Anti-inflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF-beta:

Produktion high= -1, intermediate=0, low=+1

Pro-inflammaotrische Zytokine TNF-alpha, IL-6 und IFN-gamma:

Produktion high= +1, intermediate=0, low=-1.

Daraus ergibt sich ein stärkerer Grad an Inflammation, je höher der Score ausfällt.

Tabelle 4.17 zeigt einen Vergleich zwischen Patienten mit und ohne Osteonekrose bezüglich des Inflammations-Scores. Der Anteil der Kinder mit dem jeweiligen Inflammations-Score ist in Prozent angegeben. Die Prozentwerte beziehen sich jeweils auf eine Spalte.

Inflammations-Score	Osteonekrose				p-Wert
	ja		nein		
	n	%	n	%	
≤ -2	5	29,41	43	48,31	0,092
-1	1	5,88	16	17,98	
0	5	29,41	15	16,85	
+1	2	11,77	10	11,24	
≥ +2	4	23,53	5	5,62	

Tabelle 4.17: Vergleich zwischen Osteonekrose ja und nein bezüglich der Inflammation, die die Zytokine hervorrufen

Verglichen wurde die Gruppe der Patienten mit Osteonekrose mit der Gruppe ohne Osteonekrose. Die Verteilung der Patienten der 2 Gruppen auf die Grade des Inflammations-Scores ist nicht signifikant ($p > 0,05$).

Die Graphik aus Abbildung 4.4 zeigt auf der x-Achse den Inflammations-Score von -2 bis 2. Auf der y-Achse sind die Prozentwerte angegeben. Die blauen Punkte entsprechen den Prozentwerten der Patienten, die keine Osteonekrose entwickelten. Die roten Punkte zeigen die Prozentwerte der Kinder mit Osteonekrose. Die blaue Linie entspricht der Trendlinie, keine Osteonekrose zu bekommen.

In Abbildung 4.4 lässt sich ein möglicher Trend erkennen, dass ein hoher bzw. niedriger Inflammations-Score einen Unterschied macht. Es zeigt sich, dass viele Kinder Osteonekrose-frei blieben, wenn sie einen niedrigen Inflammations-Score aufwiesen. Gleichermäßen blieben wenige Kinder Osteonekrose-frei, wenn sie einen hohen Inflammations-Score aufwiesen.

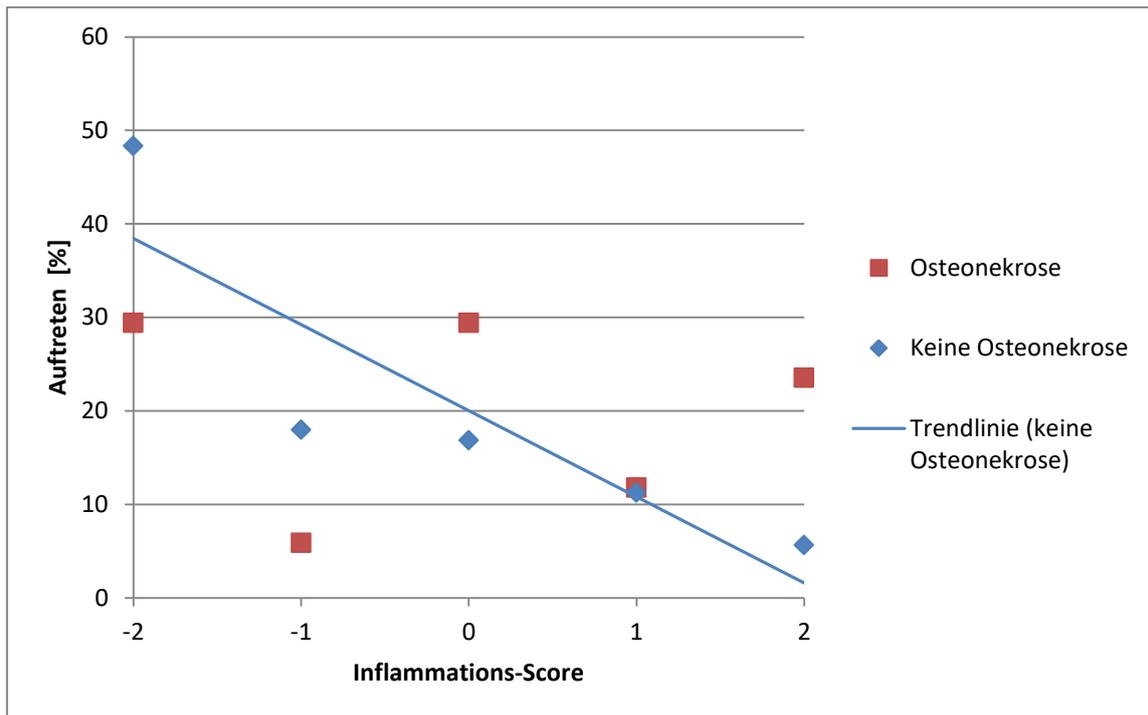


Abbildung 4.4: Trend des Inflammations-Scores bezüglich der Wahrscheinlichkeit, keine Osteonekrose zu bekommen

Die erhobenen Werte und Berechnungen des Inflammations-Scores ließen sich nur für die Gruppe der Patienten ohne Osteonekrose interpretieren. Hier zeigte sich der oben beschriebene Trend. Innerhalb der Gruppe der Patienten mit Osteonekrose waren die Werte sehr verstreut und es ließ sich kein Trend erkennen. Somit, konnte in dieser Studie anhand des Inflammations-Scores keine Aussage über die Wahrscheinlichkeit eine Osteonekrose zu entwickeln getroffen werden. In der Gruppe ohne Osteonekrose ließ sich allerdings ein Zusammenhang zwischen Inflamationsgrad und Anzahl der Kinder ohne Osteonekrose erkennen. Knapp die Hälfte der Kinder ohne Osteonekrose hat den niedrigsten Grad an Inflammation. Nur ca. 5 % der Kinder dieser Gruppe hat den höchsten Inflamationsgrad.

5 Diskussion

In Deutschland machen Leukämien und Lymphome 44,8 % der malignen Erkrankungen im Kindesalter aus. Durch intensive Therapien können sehr gute Heilungserfolge von ca. 80-90 % erreicht werden [54]. Allerdings sind diese hochdosierten Therapieregime auch für viele Nebenwirkungen und Spätfolgen verantwortlich, die häufig die Lebensqualität der geheilten Patienten deutlich beeinträchtigen. Vor allem die Osteonekrose, die als Nebenwirkung auftreten kann, schränkt Patienten mit schweren Formen unter Umständen massiv durch Schmerzen und in ihrer Mobilität ein. Daher ist es wichtig, Risikofaktoren für die Entwicklung der Osteonekrose weiter zu erforschen, um betroffene Patienten frühzeitig zu identifizieren und Anpassungen und Interventionen vornehmen zu können. Bisher durchgeführte Studien kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich möglicher Risikofaktoren. Die vorliegende Studie beschäftigte sich mit der Validierung früherer Forschung sowie der Erarbeitung neuer Risikofaktoren.

5.1 Klinische Daten

Alter

Der Zusammenhang zwischen jugendlichem Alter bei Erstdiagnose und dem gesteigerten Risiko für die Entwicklung einer Osteonekrose wurde in vielen vorherigen Studien gezeigt und konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig bestätigt werden. Es gilt bisher als deutlichster Hauptrisikofaktor [16] [17] [18] [22]. In der vorliegenden Studie ergab der Vergleich zwischen Kindern mit und ohne Osteonekrose bezüglich des Alters bei Erstdiagnose der malignen Grunderkrankung ein hoch signifikantes Ergebnis. Patienten, die eine Osteonekrose entwickelten, waren initial mit im Mittel 12,72 Jahren wesentlich älter als Kinder, die von dieser Spätfolge nicht betroffen waren. Bei diesen betrug das mittlere Alter 7,38 Jahre.

Geschlecht

Das weibliche Geschlecht als Risikofaktor für eine Osteonekrose wird in der Forschung kontrovers diskutiert. Manche Studien sehen einen signifikanten Zusammenhang [16] [24], einige andere Studien kommen nicht zu diesem Ergebnis [17] [19] [55]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte das weibliche Geschlecht nicht als Risikofaktor identifiziert werden. Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Patienten mit Osteonekrosen war nahezu gleich bzw. leicht verschoben zu Lasten der Jungen. Die vorliegende Studie trägt somit dazu bei, dass bei diesem strittigen Punkt weitere Klärung geschaffen wird.

Diagnose

Die Art der Diagnose zeigte zwar kein signifikantes Ergebnis, jedoch war die Verteilung, ob Kinder eine Osteonekrose entwickelten oder nicht, bemerkenswert. Circa ein Drittel der Patienten, die Osteonekrosen entwickelten, waren an einem Hodgkin-Lymphom erkrankt und ein knappes Drittel an einer T-ALL. Patienten mit T-ALL waren im Mittel unter 10 Jahren alt (9,8 Jahre), allerdings waren die Kinder aus dieser Gruppe, die eine Osteonekrose entwickelten, mit im Mittel 15,25 Jahre wesentlich älter als der Durchschnitt innerhalb dieser Diagnosegruppe. Diese Tatsache zeigt erneut den Einfluss des Alters auf das Risiko, eine Osteonekrose zu entwickeln.

Protokoll

Die Art des angewandten Protokolls konnte zwar nicht als signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung von Osteonekrosen gezeigt werden, jedoch fällt auf, dass 90,16 % bzw. 86,67 % der Kinder, die das Protokoll ALL-BFM 2000 bzw. die Nachfolgestudie AIEOP-BFM ALL 2009 als Therapieplan erhielten, keine Osteonekrose entwickelten.

Steroid und Gewichtszunahme

Steroide sind in der Therapie der ALL- und Lymphome unerlässlich. Jedoch bringen sie durch ihre erforderliche hohe Dosierung und lange Gabe zahlreiche Nebenwirkungen mit sich.

Viele Studien zeigen die Steroidtherapie im Kontext der ALL-Therapie als signifikanten Risikofaktor für die Entwicklung von Osteonekrosen [16] [17] [18] [22]. Auch in der vorliegenden Studie entwickelte keines der Kinder ohne Steroidtherapie eine Osteonekrose. Da der Fokus der vorliegenden Arbeit nicht auf dem Vergleich zwischen Kindern mit und ohne Steroidtherapie lag, konnten nur wenige Kinder ohne Steroidtherapie eingeschlossen werden und somit diesbezüglich kein Signifikanz-Niveau erreicht werden.

Einige Forschungsarbeiten kommen zu dem Ergebnis, dass Dexamethason häufiger Osteonekrosen mitverursacht als Prednison [27]. Allerdings wurde in einer Studie an 492 Kindern mit ALL gezeigt, dass Dexamethason nur in der Altersgruppe zwischen 10 und 18 Jahren signifikant häufiger Osteonekrosen auslöste [27]. In der vorliegenden Studie zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Entwicklung von Osteonekrosen bei Patienten, die Dexamethason statt Prednison erhielten. Es muss allerdings beachtet werden, dass die Altersstruktur signifikant verschieden war. Kinder mit Dexamethason-Therapie waren im Mittel 6 Jahre alt und somit laut der oben genannten Studie nicht in der Gruppe der Kinder, bei denen mehr Nebenwirkungen durch Dexamethason zu erwarten war. Somit liegt der Verdacht nahe, dass der Vergleich zwischen Dexamethason und Prednison bezüglich der Entwicklung von Osteonekrosen durch das Alter beeinflusst war.

Es lässt sich aber daraus ableiten, dass Kinder, die aufgrund ihres jüngeren Alters ein geringes Risiko für die Entwicklung einer Osteonekrose haben, nicht häufiger Osteonekrosen bekommen, nur weil sie Dexamethason statt Prednison erhalten.

Als sehr häufige Nebenwirkung von Steroiden wird die Gewichtszunahme, bedingt durch gesteigerten Appetit, Ödembildung und Fettumverteilung beobachtet. Die Gewichtszunahme unter Steroidtherapie betrifft fast alle Patienten [26], so auch in dieser Studie. Kinder mit hohen und langen Gaben an Steroiden, wie sie bei der Leukämietherapie eingesetzt werden [51], nahmen im Mittel stärker zu als Kindern mit Lymphomen, die kürzere Steroidblöcke erhielten [52] [53].

Frühere Studien zeigten, dass Nebenwirkungen deutlich häufiger unter dem potenteren Dexamethason im Vergleich zu dem schwächer wirksamen Prednison auftraten [27]. In der vorliegenden Arbeit konnte signifikant bestätigt werden, dass Patienten unter Dexamethason-Therapie sowohl prozentual als auch absolut mehr an Gewicht zunahmten. Sie steigerten ihr Gewicht im Mittel um $113 \% \pm 12 \%$, bzw. $2,26 \text{ kg} \pm 2,69 \text{ kg}$. Kindern unter Prednison-Therapie nahmen im Mittel $106 \% \pm 6 \%$ bzw. $1,51 \text{ kg} \pm 1,79 \text{ kg}$ zu.

Allerdings reagiert nicht jeder Mensch in gleichem Ausmaß auf Steroide und nimmt an Körpergewicht zu. Es stellte sich die also die Frage, ob die Gewichtszunahme im ersten steroidintensiven Block ein Zeichen für die individuell unterschiedliche Reaktion auf Steroide sein kann. Wenn bestimmte Kinder auf Steroide mit höherer Gewichtszunahme reagierten wäre es denkbar, dass diese Kinder dann später auch mit höherer Wahrscheinlichkeit eine Osteonekrose entwickelten aufgrund einer individuell stärkeren Reaktion auf Steroide. Es wurde somit die Vermutung angestellt, dass man Patienten, die später eine Osteonekrose entwickelten, an einer größeren Gewichtszunahme im ersten Steroid-intensiven Therapieblock hätte identifizieren können. In dieser Studie konnte lediglich ein marginaler Unterschied im ersten Steroid-intensiven Therapieblock gezeigt werden. Kinder mit Osteonekrosen nahmen im Mittel $1,94 \text{ kg}$ zu, Kinder, die keine Osteonekrosen entwickelten, nahmen im Mittel $1,73 \text{ kg}$ zu.

Lokalisation der Osteonekrosen

Es ist bekannt, dass sich Osteonekrosen unter ALL-Therapie nicht an allen Stellen des Körpers gleich häufig entwickeln. Prädilektionsstellen sind die unteren Extremitäten, vor allem mit Beteiligung der Hüfte, des Femurkopfes und des Knies [19] [23]. In der vorliegenden Arbeit stellte der Femur die Hauptprädilektionsstelle dar. Hüfte und Becken waren ebenfalls häufige Lokalisationen. Die obere Extremität war selten betroffen. Falls dort Osteonekrosen auftraten, wurden diese am Humeruskopf festgestellt. Interessanterweise waren es vor allem Kinder und Jugendliche mit Hodgkin-Lymphom, die Osteonekrosen am Humeruskopf entwickelten, im Gegensatz zu Patienten mit einer anderen Diagnose.

Es ist bekannt, dass ein junges Alter ein Hauptrisikofaktor für die Entwicklung von Osteonekrosen ist. Dies wurde auch, wie oben beschrieben, in dieser Studie bestätigt. In der genaueren Betrachtung der Lokalisationen trifft diese Signifikanz für Osteonekrosen an Humeruskopf, Hüfte/Becken oder distalem Femur deutlich zu. Allerdings zeigte in dieser Studie nicht jede Osteonekrose-Lokalisation einen signifikanten Zusammenhang mit höherem Alter bei Erstdiagnose. Kinder mit einer Osteonekrose an Tibia oder Fibula waren nicht signifikant älter und Kinder mit einer Osteonekrose am Fuß waren sogar jünger als Kindern mit Osteonekrosen an anderen Lokalisationen oder ohne Osteonekrosen. Dieses Ergebnis legt nahe, dass es weitere Faktoren geben muss, die die Entstehung von Osteonekrosen bewirken als das Alter alleine.

5.2 Laborparameter

Um weitere prädiktive Marker und Risikofaktoren der Osteonekrose zu identifizieren, wurden in die vorliegende Studie Laborwerte, die Aufschluss über Knochenstoffwechsel und Umbauvorgänge geben, aufgenommen. Nach bestem Wissen der Autorin ist diese Arbeit die erste, die sich damit beschäftigt, alkalische Phosphatase, Calcium und anorganisches Phosphat als prädiktive-

oder Verlaufs-Marker für die Entwicklung von Osteonekrosen bei Kindern herauszuarbeiten.

Alkalische Phosphatase

Glukokortikoide verschieben das Gleichgewicht zwischen Knochenmatrix aufbauenden Osteoblasten und abbauenden Osteoklasten. Sie bewirken, dass Osteoblasten und Osteozyten absterben und zusätzlich in ihrer Neubildung gehemmt werden. Gleichzeitig wird die Osteoklastenbildung gefördert. Dies führt durch verringerten Aufbau von Knochensubstanz in Kombination mit beschleunigtem Knochenumsatz zu einer Osteopenie. Durch zusätzliche Apoptose der Osteoblasten und -zyten kommt es zur Entwicklung von Osteonekrosen [22].

Die Aktivität der Osteoblasten und die Knochenmineralisation kann anhand der alkalischen Phosphatase gemessen werden. Durch eine erniedrigte AP kann also auf eine verringerte Aktivität mit Hemmung der Osteoblasten und eine gestörte Knochenmineralisation zurückgeschlossen werden [9] [30] [31]. Daher kann die Vermutung aufgestellt werden, dass eine erniedrigte alkalische Phosphatase als Verlaufs-Marker herangezogen werden kann, um eine Osteopenie mit möglicher Entwicklung zur Osteonekrose frühzeitig zu identifizieren.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Kinder, die eine Osteonekrose entwickelten, signifikant niedrigere alkalische Phosphatase-Werte im Verlauf hatten als Kinder, die keine Osteonekrose entwickelten. Interessanterweise war die alkalische Phosphatase bei weiblichen Kindern signifikant niedriger als bei männlichen. Da in der Fachliteratur diskutiert wird, dass Mädchen häufiger eine Osteonekrose entwickeln als Jungen [16] [22] [24], lässt dies die Vermutung zu, dass eine niedrige alkalische Phosphatase als Biomarker die Entwicklung hin zu einer Entstehung von Osteonekrosen aufzeigen könnte.

Calcium

Calcium ist einer der Grundbausteine des Knochens und ist ein wichtiger Stabilisator für Knochendichte und Mineralhaushalt. 99 % des Calciumdepots ist im Knochen gespeichert [26] [32]. Durch die Gabe von Steroiden wird die Calciumaufnahme im Darm reduziert und die Calcium-Ausscheidung durch die Nieren erhöht. Dadurch kommt es zum Absinken des Serum-Calciums. Kompensatorisch wird nun Calcium aus dem Knochen mobilisiert. Dies führt unweigerlich zu einem Abbau von Knochensubstanz. Als Folge daraus entstehen kleinste Fettembolien im Knochenmark mit Minderdurchblutung und -versorgung der Knochenmatrix. Die Konsequenz ist die Entstehung von Osteonekrosen [22].

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Kinder, die später eine Osteonekrose entwickelten, signifikant niedrigere Calcium-Werte im Verlauf hatten als Kinder, die keine Osteonekrose entwickelten. Das Serum-Calcium könnte also als Parameter herangezogen werden, den Prozess am Knochen mit möglichen beginnenden Abbauvorgängen sehr frühzeitig zu beobachten, noch bevor es zum Auslösen von Calcium aus dem Knochen kommt.

Anorganisches Phosphat

Der Körper speichert 85 % seines Phosphats im Knochen, um durch Freisetzung aus diesem das Gleichgewicht seines Mineralhaushaltes stabil zu halten [26]. Ist ein Knochen durch nicht ausreichende Mineralisierung z.B. durch Hypophosphatämie geschwächt, kann sich eine Osteopenie entwickeln [9]. Frühere Forschung zeigte, dass Osteopenie Grundlage bzw. Auslöser für die Entwicklung einer Osteonekrose ist [22]. Der Knochen ist dann anfälliger Osteonekrosen zu entwickeln, wenn weitere Knochen-destabilisierende Faktoren, wie eine Chemo-Steroidtherapie, hinzukommen. Ein initial niedriger Phosphat-Wert könnte also ein Risikofaktor sein, später eher eine Osteonekrose zu entwickeln als bei guten Ausgangs-Phosphat-Werten. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Kinder mit Osteonekrosen bereits mit initial niedrigeren anorganischen Phosphat-Werten

auffielen. Das initiale anorganische Phosphat könnte also als Risikofaktor in den Kontext der Entwicklung von Osteonekrosen in Kombination mit Chemo- und Steroidtherapie einbezogen werden.

Leukozyten

Unter ALL-Therapie gelten Osteonekrosen an Femur oder Knie als Hauptprädispositionsstelle [19] [23]. Kinder mit ALL-Diagnose, die im Verlauf eine Osteonekrose an diesen Stellen entwickelten, zeigten bereits bei Erstdiagnose eine signifikant höhere Leukozytenzahl mit im Mittel 195.452 Leukozyten/ μ l. Kinder mit ALL-Diagnose, die später keine Osteonekrose oder eine Osteonekrose an einer anderen Stelle entwickelten, hatten im Mittel 38.511 Leukozyten/ μ l. Eine hohe Leukozytenzahl bei Erstdiagnose einer ALL könnte also ein weiterer prognostischer Marker für Osteonekrosen an Femur oder Knie sein.

5.3 Zytokine

Die Hauptfrage an die vorliegende Forschungs-Arbeit war, ob ein Einfluss von Zytokinen auf die Entwicklung von Osteonekrosen gezeigt werden kann. Es wurde die These aufgestellt, dass Zytokine durch Beeinflussung des Knochenstoffwechsels und Aufbau eines Entzündungsmilieus die Entstehung von Osteonekrosen begünstigen.

Frühere Forschung zu IL-6

Dem Zytokin IL-6 wird in der Forschung eine Schlüsselrolle innerhalb des Knochenstoffwechsels zugesprochen [38]. Es wird unter anderem für Verlust von Knochenmasse verantwortlich gemacht und steht unter Verdacht, Mitverursacher für Osteopenie und Osteoporose zu sein, die wiederum zu Osteonekrosen führen können. Es ist bekannt, dass IL-6 eine große Rolle bei Entzündungsprozessen spielt, ein starker Aktivator des Akut-Phase-Proteins ist und dadurch über die Bildung von Osteoklasten die Knochenresorption fördert [21] [22] [37].

Frühere Forschung stellt einen Zusammenhang zwischen dem IL-6-Polymorphismus-174 und dem Knochenstoffwechsel her. Eine Meta-Analyse mit 11.957 Personen zeigte konkret den Einfluss von IL-6 auf die Knochenmineraldichte (Bone mineral density: BMD) [37]. Bei Personen mit dem IL-6-174-Polymorphismus, der auch in der vorliegenden Studie untersucht wurde, wies die Knochenmineraldichte signifikante Unterschiede auf. Menschen mit dem Polymorphismus G/G hatten signifikant niedrigere Knochenmineraldichte-Werte an bestimmten Stellen des Skeletts als Menschen mit C-Allel. Dazu zählten der Trochanter, der Femurkopf und das Ward-Dreieck des Femurs. Personen mit dem Polymorphismus C/C hatten signifikant höhere BMD-Werte an Hüfte und hohem distalen Radius als Menschen mit G-Allel.

Auch für den IL-6-Polymorphismus-572 zeigten Studien ähnliche Ergebnisse. Personen mit dem Genotyp C/C hatten signifikant höhere BMD-Werte an bestimmten Stellen als Personen mit G-Allel [21] [37].

Personen mit dem Polymorphismus G/G scheinen demnach anfälliger für negative Veränderungen am Knochen zu sein als Menschen mit dem Genotyp C/C, was in der vorliegenden Arbeit bestätigt wurde.

Ergebnisse dieser Studie zu IL-6

Diese beschriebene These konnte in der vorliegenden Arbeit erhärtet werden. Die Häufigkeitsverteilung der Polymorphismen des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6-174 war signifikant unterschiedlich innerhalb der Gruppen der Kinder mit und ohne Osteonekrosen und passt zu den Erkenntnissen aus früherer Forschung bezüglich der Knochenmineraldichte und der Verteilung der Genotypen [37].

Kinder mit Osteonekrosen hatten am häufigsten den IL-6-Polymorphismus G/G. Dieser Genotyp entspricht einer hohen Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins. Der Polymorphismus G/G war wesentlich häufiger als der Genotyp C/C, der einer geringen Produktion und somit einem geringeren inflammatorischen Milieu entspricht. Diese Tatsache lässt vermuten, dass eine

hohe Produktion eines entzündungsfördernden Zytokins mehr Schäden im Knochen setzt und somit die Osteonekrosenbildung wahrscheinlicher werden lässt.

Auch innerhalb der Gruppe der Kinder ohne Osteonekrose konnte die Vermutung bestätigt werden, dass die Produktion des Zytokins IL-6 Einfluss auf die Entwicklung von Osteonekrosen nimmt. Der Polymorphismus C/C war mit Abstand am häufigsten innerhalb der Gruppe Kinder, die nicht von Osteonekrosen betroffen waren. Wie beschrieben, entspricht dieser einer geringen Produktion des entzündungsfördernden Zytokins IL-6. Der Genotyp G/G mit seiner hohen Produktion trat wesentlich seltener bei Kindern ohne Osteonekrose auf.

Zusammengefasst bekamen Kinder mit dem Genotyp G/G, der für ein stärkeres Entzündungsmilieu steht, häufiger Osteonekrosen, Patienten mit dem Genotyp C/C seltener.

Interessanterweise zeigen Studien [21] [37], dass nicht alle Stellen des Skeletts in gleichem Maße auf den Genotyp G/G des IL-6-174-Polymorphismus reagierten. Auch in der vorliegenden Studie konnten Prädilektionsstellen identifiziert werden. Diese waren an Femur und Hüfte lokalisiert.

Durch das Ergebnis dieser Studie unter Berücksichtigung früherer Forschung lässt sich die These vertreten, dass in einer stärkeren inflammatorischen Umgebung durch den IL-6-Polymorphismus-174 mehr Osteonekrosen bei Kindern und Jugendlichen unter ALL- und Lymphom-Therapie auftreten.

Weitere Zytokine

Auch bei dem pro-inflammatorischen Zytokin IFN-gamma war der Genotyp mit hoher entzündungsfördernder Produktion in der Gruppe der Kinder mit Osteonekrose häufiger als der Genotyp mit einer geringen Produktion. Bezüglich der Zytokine, TNF-alpha, TGF-beta 10, TGF-beta 25, IL-10-1082, IL-10-819, IL-10-592 ergab dieser Vergleich, dass Kinder mit Osteonekrose weder

signifikant seltener noch signifikant häufiger einen bestimmten Polymorphismus aufwiesen als Kinder ohne Osteonekrose.

Inflammations-Score

Bei Bewertung des Inflammations-Score wurden 2 Gruppen getrennt voneinander betrachtet. Die Patienten mit Osteonekrose stellen die eine Gruppe dar und die Patienten, die keine Osteonekrose entwickelten, die andere Gruppe. Ein Trend konnte ausschließlich für die Gruppe der Kinder ohne Osteonekrosen gezeigt werden. Für die Gruppe der Kinder mit Osteonekrose ist die Datenlage in dieser Studie nicht ausreichend, um einen Schluss unter Hinzunahme des Inflammations-Scores ziehen zu können.

In der vorliegenden Arbeit lässt sich erkennen, dass es einen Unterschied zwischen einem hohen und einem niedrigen Inflammations-Score innerhalb der Gruppe der Patienten ohne Osteonekrosen gibt. In dieser Gruppe haben zwei Drittel der Kinder einen niedrigen Inflammations-Score. Nur ca. 5 % der Kinder ohne Osteonekrose hatten den höchsten Inflammations-Score. Der Trend zeigt, dass viele Kinder ohne Osteonekrose einen niedrigen Inflammations-Score aufweisen. Gleichermäßen weisen wenige Kinder ohne Osteonekrose einen hohen Inflammations-Score auf. Dies legt die Vermutung nahe, dass in einem entzündungsarmen Milieu weniger Osteonekrosen auftreten. Ebenso zeigt der Trend bei einem hohen Inflammations-Score, dass die Chance Osteonekrose-frei zu bleiben äußerst gering ist. Es lässt sich die Vermutung aufstellen, einen Zusammenhang zwischen inflammatorischem Milieu und Osteonekrosen sehen zu können.

5.4 Stärken und Limitierungen

Die vorliegende Studie leistet durch ihre Stärken einen wichtigen Beitrag für die Forschung. In der vorliegenden Arbeit konnte das jugendliche Alter als hoch signifikanter Risikofaktor identifiziert werden wie in mehreren Studien zuvor [16]

[17] [18] [22]. Die grundlegende Basis über die Entwicklung von Osteonekrosen, über die sich alle Studien einig sind, ist das jugendliche Alter. Des Weiteren betrachtet die vorliegende Studie nicht nur, wie viele andere Studien, die große Gruppe der ALL-Patienten, sondern schließt auch Kinder mit Lymphomen ein, die mit 12 % ebenfalls eine große Bedeutung in der Kinderheilkunde haben. Die Studie bringt außerdem die Gewichtszunahme im ersten Steroidintensiven Block als Surrogat-Marker für das Ansprechen auf Steroide als neue Idee in das Feld der Forschung. Dies könnte ein einfach und schnell anzuwendender Test sein, der Kinder nicht-invasiv auf das Ansprechen auf Steroide testen könnte. Dies muss in weiteren Studien geprüft werden. Vor allem die kontinuierliche Überwachung der Patienten ob einer drohenden Entwicklung von Osteonekrosen könnte mittels einfacher Laborparameter, wie alkalische Phosphatase, Calcium und anorganisches Phosphat verfolgt werden. Die vorliegende Studie legt dafür den Grundstein, diese Idee weiter zu verfolgen. Die wichtigste Erkenntnis dieser Studie ist jedoch die zum ersten Mal gefundene Tatsache, dass das Zytokin IL-6-174 einen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung von Osteonekrosen bei Kindern und Jugendlichen unter ALL- und Lymphomtherapie nimmt. Da dieser Punkt vorher noch nie in dieser Form beschrieben wurde, ist die vorliegende Forschungs-Arbeit ein wichtiger Schritt für ein besseres Verständnis der Entstehung von Osteonekrosen.

Diese Studie weist auch Limitierungen auf. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Kinder nach Ende der Nachbeobachtungszeit noch eine Osteonekrose entwickelten. Da die Nachbeobachtungszeit dieser Studie mindestens zwei Jahre beträgt und, wie frühere Studien zeigten, die allermeisten Kinder eine Osteonekrose innerhalb der ersten zwei Jahre nach Erstdiagnose der malignen Grunderkrankung entwickeln [19] [56], kann davon ausgegangen werden, dass die Mehrzahl der Kinder mit Osteonekrose erfasst wurden. Weiterhin kann der Einfluss von potentiellen Umweltfaktoren in dieser Studie nicht berücksichtigt werden. Der Inflammations-Score zeigt möglicherweise einen Trend innerhalb der Gruppe der Patienten ohne Osteonekrosen. Die Datenlage in dieser Studie bezüglich der Kinder mit Osteonekrose ist nicht ausreichend, um über diese Gruppe eine Aussage

treffen zu können. Es wäre wünschenswert den möglichen Zusammenhang zwischen Inflammation und Osteonekrose mithilfe des Inflammations-Scores in kommenden Studien weiter zu untersuchen. Es wäre außerdem empfehlenswert, die vorliegenden Ergebnisse in weiterer Forschung noch einmal mit einer größeren Fallzahl an Patienten zu validieren.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, Risikofaktoren für die Entwicklung von Osteonekrosen bei Kinder und Jugendlichen unter ALL- und Lymphomtherapie zu identifizieren. Hierzu wurden sowohl in der Forschung diskutierte klinische Faktoren überprüft, als auch in diesem Kontext bisher nicht berücksichtigte Laborwerte statistisch getestet. Die Hauptfrage der vorliegenden Studie war, ob sich ein Einfluss von Zytokingenpolymorphismen auf die Entwicklung von Osteonekrosen zeigen lässt. Dies wurde, nach bestem Wissen der Autorin, das erste Mal in der Forschung aufgegriffen.

Als besonders deutlicher Risikofaktor wird ein jugendliches Alter in bisherigen Studien gesehen [16] [17] [18] [22]. Diese Studie konnte dies hoch signifikant bestätigen. Viele Studien identifizierten weiterhin die Steroidtherapie als Risikofaktor [16] [17] [18] [22]. Insbesondere das stärker potente Glukokortikoid Dexamethason steht im Verdacht, allgemein mehr Nebenwirkungen mit sich zu bringen als das weniger potente Steroid Prednison [27]. In dieser Studie konnte dies für die Gewichtszunahme bestätigt werden, nicht jedoch für Entwicklung von Osteonekrosen. Dieses Ergebnis wurde in der vorliegenden Studie allerdings durch das signifikant jüngere Alter der Kinder mit Dexamethason-Therapie beeinflusst. Die Frage, ob die Gewichtszunahme im ersten steroidintensiven Therapieblock ein Marker für das Ansprechen auf Steroide und somit ein Parameter sein kann, die Entwicklung von Osteonekrosen frühzeitig abschätzen zu können, konnte nicht belegt werden. Dies sollte allerdings in weiterer Forschung erneut getestet werden, da die Gewichtskontrolle eine einfache und nicht-invasive Methode darstellen könnte, das Ansprechen auf Steroide und möglicherweise die Entwicklung von Osteonekrosen abschätzen zu können.

Nach bestem Wissen der Autorin ist dies die erste Studie, die alkalische Phosphatase, Calcium und anorganisches Phosphat als mögliche prädiktive Marker oder Verlaufsmarker untersucht. Die Ergebnisse legen den Schluss nah, dass es eventuell möglich wäre, die alkalische Phosphatase und das Serum-

Calcium als Verlaufsparemeter heranzuziehen. Diese Laborwerte spiegeln die Abbau- und Umbauvorgänge am Knochen wider und könnten eine beginnende Osteopenie mit Entwicklung zur Osteonekrose frühzeitig demarkieren [30] [31] [32]. Die Studie kam weiterhin zu dem Schluss, dass das Anorganische Phosphat ein möglicher Risikofaktor sein könnte, durch eine initial schlechtere Knochenmineralisation eine Osteonekrose zu entwickeln, wenn weitere Knochenmatrix schädigende Faktoren, wie eine Steroidtherapie, hinzukommen [9] [22] [26]. Eine initial hohe Leukozytenzahl schien in dieser Studie Kinder dafür zu prädisponieren, Osteonekrosen an Femur oder Knie zu entwickeln.

Das Zytokin IL-6 gilt in der Forschung als Schlüsselfigur für den Knochenstoffwechsel [38]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit früherer Forschung, die unter anderem zeigte, dass der Genotyp G/G des Zytokins IL-6-174 die Knochenmineraldichte negativ beeinflusst und ein Entzündungsmilieu aufzubauen scheint, das zum Verlust von Knochenmasse führen kann [21] [37]. In der vorliegenden Studie konnte erstmalig dargestellt werden, dass Kinder mit dem Genotyp G/G des Zytokins IL-6-174, der einer hohen inflammatorischen Produktion entspricht, häufiger Osteonekrosen entwickelten als Kinder mit dem Genotyp C/C. Auch in der Gruppe der Kinder ohne Osteonekrosen war die Verteilung der Genotypen signifikant. Hier trat der Genotyp C/C mit einer geringen inflammatorischen Produktion mit Abstand am häufigsten auf. Auch das Zytokin IFN-gamma stützt die These, dass eine hohe Produktion eines pro-inflammatorischen Zytokins die Entwicklung von Osteonekrosen begünstigen könnte. Die Verteilung der Kinder innerhalb der Gruppen mit und ohne Osteonekrose war signifikant und zeigte, dass Kinder mit einer hohen Produktion von IFN-gamma häufiger und Kinder mit einer niedrigen Produktion seltener Osteonekrosen entwickelten.

Die vorliegenden Ergebnisse entsprechen den Erkenntnissen aus früherer Forschung, die sich mit der Knochenmineraldichte bei nicht-onkologischen Patienten beschäftigten und zu dem Ergebnis kamen, dass der Genotyp G/G anfälliger für negative Veränderungen am Knochen ist als der Genotyp C/C, der über positive Eigenschaften verfügt.

Der Inflammationsscore, der in dieser Studie erstellt wurde, zeigt den klaren Trend, dass Kinder mit einem niedrigen Inflammationsscore sehr selten Osteonekrosen entwickeln. Ein hoher Inflammationsscore macht es dementsprechend äußerst unwahrscheinlich Osteonekrose-frei zu bleiben.

Somit kann diese Studie zeigen, dass in einer stärkeren inflammatorischen Umgebung, ausgelöst durch bestimmte Genotypen des IL-6-Polymorphismus-174, mehr Osteonekrosen bei Kindern und Jugendlichen unter ALL- und Lymphom-Therapie auftreten als bei Kindern mit einem Genotyp, der einer niedrigen inflammatorischen Aktivität entspricht. Diese Erkenntnisse wurden zum ersten Mal in der vorgelegten Arbeit gezeigt. Die Ermittlung dieser Zusammenhänge und Darstellung weiterer Risikofaktoren kann direkte Auswirkungen auf die jungen Patienten und ihre weitere Lebensqualität haben. Wenn Kinder und Jugendliche mit einem Risiko für die Entwicklung von Osteonekrosen unter ALL- und Lymphomtherapie frühzeitig identifiziert werden können, wird es in Zukunft möglich werden, Spätfolgen zu reduzieren. Die vorliegende Forschungsarbeit kann dazu einen wesentlichen Beitrag leisten. Diese wichtigen Ergebnisse dieser Studie sollten in Folgeuntersuchungen an einem größeren Kollektiv validiert werden.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 4.1: Darstellung des Alters der Patienten bei Erstdiagnose für die verschiedenen Erkrankungsgruppen	27
Abbildung 4.2: Rezidivfreie Überlebenswahrscheinlichkeit	31
Abbildung 4.3: Gewichtszunahme nach Art des Steroids	35
Abbildung 4.4: Trend des Inflammations-Scores bezüglich der Wahrscheinlichkeit, keine Osteonekrose zu bekommen.....	51

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte im Labor der Universitäts-Kinderklinik Würzburg.....	12
Tabelle 2.2: Laborbedarf für den experimentellen Teil der Arbeit.....	13
Tabelle 2.3: Reagenzien für die PCR und Gelelektrophorese.....	13
Tabelle 2.4: Vom Hersteller vorpipettierte Reagenzien	14
Tabelle 2.5: Sonstige verwendete Chemikalien im Labor.....	14
Tabelle 3.1: Primer-Schema für die 16 Wells der Microplatte für eine Patientenprobe.....	19
Tabelle 4.1: Diagnosegruppen	28
Tabelle 4.2: Therapieoptimierungsstudien und Einteilung der ALL-Patienten in Risikogruppen.....	29
Tabelle 4.3: Art der Steroidtherapie.....	29
Tabelle 4.4: Gewicht und Gewichtszunahme	30
Tabelle 4.5: Übersicht der 21 Osteonekrosepatienten	33
Tabelle 4.6: Prozentuale Gewichtszunahme nach Diagnose aufgeteilt.....	36
Tabelle 4.7: Vergleich der Steroide bezogen auf das Alter bei ED.....	37
Tabelle 4.8: Alter und maximale Gewichtszunahme.....	38
Tabelle 4.9: Vergleich zwischen Patienten mit und ohne Osteonekrose hinsichtlich Geschlecht, Diagnose, Art des Protokolls und Steroid..	38
Tabelle 4.10: Übersichten zu Diagnose und Lokalisation der Osteonekrose ...	40
Tabelle 4.11: Vergleich zwischen Alter bei Erstdiagnose (ED) und verschiedenen Osteonekrose-Lokalisationen.....	42
Tabelle 4.12: Vergleich zwischen Patienten mit und ohne Osteonekrose hinsichtlich AP, Ca, AnorgPh, Leukozytenzahl.....	44
Tabelle 4.13: Vergleich zwischen ALL-Patienten mit und ohne Osteonekrose an Femur oder Knie bezüglich der absoluten Leukozytenzahl bei Erstdiagnose	44
Tabelle 4.14: Vergleich zwischen Patienten mit und ohne Osteonekrose bezüglich der Zytokingenpolymorphismen von TNF-alpha, TGF-beta, IL-10, IL-6 und IFN-gamma.	46
Tabelle 4.15: Zytokinproduktionen bezogen auf die jeweiligen Genotypen.....	47
Tabelle 4.16: Vergleich zwischen Osteonekrose ja und nein bezüglich der Zytokin-Produktion.....	48
Tabelle 4.17: Vergleich zwischen Osteonekrose ja und nein bezüglich der Inflammation, die die Zytokine hervorrufen.....	50

9 Literaturverzeichnis

- [1] Robert-Koch-Institut, "Krebs in Deutschland 2011/2012", Zentrum für Krebsregisterdaten, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 2015.
- [2] M. Yiallourous und G. Henze, "Akute lymphoblastische Leukämie (ALL): Kurzinformation", Kompetenznetz Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2014.
- [3] M. Yiallourous und C. Mauz-Körholz, "Hodgkin-Lymphom: Kurzinformation", Kompetenznetz Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2014.
- [4] M. Yiallourous, B. Burkhardt und A. Claviez, "Non-Hodgkin-Lymphome (NHL): Kurzinformation", Kompetenznetz Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2014.
- [5] M. Yiallourous und G. Henze, "Akute lymphoblastische Leukämie (ALL)", Kompetenznetz Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2012.
- [6] Kinderkrebsinfo.ALL Kurzinformation für Patienten pdf.S.3,.
- [7] A. Muntau, "Intensivkurs Pädiatrie", Urban & Fischer, ISBN: 978-3-437-43391-7, 2007.
- [8] M. Schrappe, 2011. [Online]. Available: http://www.bfm-international.org/aieop/informationen/informationen_eltern_studie.html. [Zugriff am 11.10.2016].
- [9] G. Herold, "Innere Medizin", Köln: ISBN: 978-3-9814660-3-4, 2014.
- [10] „Das Hodgkin Lymphom: Therapie“, Group German Hodgkin Study, [Online]. Available: www.ghsg.org/therapie. [Zugriff am 11.10.2016].
- [11] V. Engelbrecht, A. Scherer, M. Bruder, D. Körholz und U. Mödder, „Kernspintomographie von aseptischen Osteonekrosen bei Kindern und Jugendlichen mit einer akuten lymphoblastischen Leukämie“, Thieme, [Online]. Available: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2000-335>. [Zugriff am 11.10.2016].
- [12] H. Rössler und W. Rüter, "Orthopädie und Unfallchirurgie", München: Urban & Fischer, ISBN: 3-437-42591-9, 2005.
- [13] Universitätsklinikum Düsseldorf, „OPAL-Studie – Osteonekrosen bei pädiatrischen Patienten mit ALL“, [Online]. Available: <http://www.uniklinik-duesseldorf.de/unternehmen/kliniken/klinik-fuer-kinder-onkologie-haematologie-und-klinische-immunologie/forschungsbereiche/opal-studie-osteonekrosen-bei-paediatrischen-patienten-mit-all/>. [Zugriff am 11.10.2016].
- [14] M. Kuhlen, "Elterninformation OPAL-Studie", Düsseldorf: Universitätsklinikum Düsseldorf, 2012.
- [15] M. Kuhlen, "Osteonekrosen bei pädiatrischen Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie und lymphoblastischem Lymphom", Düsseldorf: WIR: Klinik + Forschung Universitätsklinikum Düsseldorf, 2012.

- [16] M. Aricò, M. Boccalatte, D. Silvestri, E. Barisone, C. Messina, R. Chiesa, N. Santoro, P. Tamaro, A. Lippi, D. Gallisai, G. Basso und G. De Rossi, "Osteonecrosis: an emerging complication of intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia", Pavia, Italien: *Haematologica: Journal of the European Hematology Association*, 2003.
- [17] N. Karas-Kuželički, S. Mencej-Bedrač, J. Jazbec, J. Marc und I. Mlinarič-Raščan, "Risk factors for symptomatic osteonecrosis in childhood ALL: A retrospective study of a Slovenian pediatric ALL population between 1970 and 2004", Athen, Griechenland: *Experimental and Therapeutic Medicine* 12: 840-846, 2016.
- [18] J. Nachman, "Osteonecrosis in childhood ALL", Washington DC: The American Society of Hematology, ISSN: 0006-4971, 2011.
- [19] B. Padhye, L. Dalla-Pozza, D. Little und C. Munns, „Incidence and outcome of ON in children and adolescents after intensive therapy for ALL,“ *Cancer Medicine*, 2015.
- [20] S. Ferrari, P. Garnero, S. Emond, H. Montgomery, S. Humphries und S. Greenspan, "A Functional Polymorphic Variant in the Interleukin-6 Gene Promoter Associated with Low Bone Resorption in Postmenopausal Women", Atlanta, USA: *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol. 44, No. 1, American College of Rheumatology, 2001.
- [21] J. Lee, K. Suh und I. Eun, "Polymorphism in interleukin-6 gene is associated with bone mineral density in patients with adolescent idiopathic scoliosis", London, UK: British Editorial Society of Bone and Joint Surgery, 2010.
- [22] L. Mattano, „The skeletal remains: porosis and necrosis of bone in the marrow transplantation setting,“ *Pediatric Transplantation*, 2003.
- [23] S. Kaste, E. Karimova und D. Neel, „Osteonecrosis in Children After Therapy for Malignancy,“ *AJR Am J Roentgenol.* 2011 May ; 196(5): 1011–1018. doi:10.2214/AJR.10.6073, 2011.
- [24] S. Sharma, S. Yang, R. Rochester, L. Britton, W. Leung, J. Yang, M. Neel, K. Ness und S. Kaste, „Prevalence of osteonecrosis and associated risk factors in children before allogenic bone marrow transplantation,“ *Bone Marrow Transplant.* 2011 June ; 46(6): 813–819. doi:10.1038/bmt.2010.210, 2011.
- [25] M. Dördelmann, A. Reiter, A. Borkhardt, W. Ludwig, N. Götz, S. Viehmann, H. Gadner, H. Riehm und M. Schrappe, "Predinose Response Is The Strongest Predictor of Treatment Outcome in Infant Acute Lymphoblastic Leukemia", Washington DC USA: The American Society of Hematology, *blood* 1999 94: 1209-1217, 1999.
- [26] T. Herdegen, "Kurzlehrbuch Pharmakologie", Stuttgart - New York: Georg Thieme Verlag, ISBN: 978-3-13-142292-7, 2010.
- [27] H. Inaba und C. Pui, „Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukemia: comparison of prednisone and dexamethasone,“ *Lancet Oncol.* 2010 November ; 11(11): 1096–1106. doi:10.1016/S1470-2045(10)70114-5., 2010.

- [28] R. Niinimäki, A. Harila-Saari, A. Jartti, R. Seuri, P. Riikonen, E. Pääkkö, M. Möttönen und M. Lanning, „High Body Mass Index Increases the Risk for Osteonecrosis in Children With Acute Lymphoblastic Leukemia,“ *J Clin Oncol* 25:1498-1504, 2007.
- [29] P. Caramaschi, D. Biasi, D. F. I. und S. Adami, „Osteonecrosis in SLE: An early, frequent, and not always symptomatic complication,“ *Autoimmune Diseases*, 2012.
- [30] C. Beck, M. Stenzel, P. Schneider und H. Girschick, „Hypophosphatasie – aktuelle Diagnostik und Therapie,“ *J Miner Stoffwechs* 2009; 16 (3), 2009.
- [31] E. Mornet, „Hypophosphatasia,“ *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*; Vol. 22, No. 1, pp. 113–127, 2008, 2008.
- [32] R. Lüllmann-Rauch, Histologie, Thieme Verlag, ISBN: 9783131292452, 2015.
- [33] M. Lauten, M. Stanulla, M. Zimmermann, K. Welte, H. Riehm und M. Schrappe, "Clinical Outcome of Patients with Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia and an Initial Leukaemic Blood Blast Count of Less than 1000 per Microliter", Stuttgart New York: Gerog Thiema Verlag, Klin Padiatr 2001; 213(4): 169-174, 2001.
- [34] H. Peter, "Klinische Immunologie", München: Elsevier, ISBN: 978-3-437-23256-5, 2012.
- [35] K. Possinger, "Facharzt Hämtologie Onkologie", München: Elsevier, ISBN-13: 978-3-437-23770-6, 2007.
- [36] O. Schmetzer, "Immunologie Basics", München: Elsevier, ISBN: 978-3-437-42497-7, 2013.
- [37] Z. Wang, Y. Yang, M. He, R. Wang, J. Ma, Y. Zhang, L. Zhao und K. Yu, Association Between Interleukin-6 Gene Polymorphisms and Bone Mineral Density: A Meta-Analysis, New Rochelle, NY, USA: Genetic Testing and Molecular Biomarkers, Volume 17, Number 12, Mary Ann Liebert, Inc., 2013.
- [38] A. Bakker und R. Jaspers, „IL-6 and IGF-1 Signaling Within and Between Muscle and Bone: How Important is the mTOR Pathway for Bone Metabolism?,“ *Curr Osteoporos Rep* (2015) 13:131–139, 2015.
- [39] J. Du, W. Liu, T. Jin, Z. Zhao, R. Bai, H. Xue, J. Chen, M. Sun, X. Zhang, G. Wang und J. Wang, "A single-nucleotide polymorphism in MMP9 is associated with decreased risk of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head", Orchard Park, NY, USA: Oncotarget, 2016 Sep 15, doi: 10.18632/oncotarget.12034, 2016.
- [40] Eppendorf AG, "Eppendorf BioPhotometer Bedienungsanleitung", Hamburg, 2014.
- [41] Vivantis, "Vivantis Nucleic acid Extraction Kit Hand Book", Oceanside California USA, 2012.
- [42] T. Dingermann, "Gentechnik, Biotechnik", Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, ISBN: 3-8047-1597-4, 1999.
- [43] [Online]. Available: <http://www.medizinische-genetik.de/index.php?id=sequenz-spezifische-primer-ssp>. [Zugriff am

- 11.10.2016].
- [44] "Cytokine Genotyping Tray", Canoga Park CA USA: One Lambda Inc., 2009.
- [45] „Arne Tiselius - Biographical,“ Nobelprize.org, Nobel Media AB 2014, [Online]. Available: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1948/tiselius-bio.html. [Zugriff am 12.10.2016].
- [46] S. Schröder, "Präzision in der Gelelektrophorese für die pharmazeutische Qualitätskontrolle", TU Braunschweig: Dissertation, 2009.
- [47] R. Bernd, J.-B. Du Prel, D. Wachtlin und M. Blettner, „Studententypen in der medizinischen Forschung,“ *Deutsches Ärzteblatt, Jg. 106, Heft 15*, pp. 262 - 269, 10.04.2009.
- [48] I. Haubitz, „Einsatz der EDV bei statistischen Problemen der Mediziner,“ in *Vorlesungsmanuskript, Universität Würzburg*, 1996.
- [49] L. Müller, „Mikronährstoffstatus mangelernährter Patienten am Katharinenhospital Stuttgart,“ *Dissertation Universität Tübingen*, 2009.
- [50] Kinderkrebsregister, „Deutsches Kinderkrebsregister,“ [Online]. Available: <http://www.kinderkrebsregister.de/dkkr/ergebnisse/wichtigste-ergebnisse.html>. [Zugriff am 15.03.2017].
- [51] Kinderkrebsinformation, „kinderkrebsinfo.de - Informationsportal zu Krebs- und Bluterkrankungen bei Kindern und Jugendlichen,“ [Online]. Available: https://www.kinderkrebsinfo.de/fachinformationen/studienportal/pohkinderkrebsinfotherapiestudien/aieop_bfm_all_2009/index_ger.html. [Zugriff am 15.03.2017].
- [52] Kinderkrebsinformation, „kinderkrebsinfo.de - Informationsportal zu Krebs- und Bluterkrankungen bei Kindern und Jugendlichen,“ [Online]. Available: https://www.kinderkrebsinfo.de/fachinformationen/studienportal/pohkinderkrebsinfotherapiestudien/euronet_phl_lp1/index_ger.html. [Zugriff am 15.03.2017].
- [53] Kompetenznetz Maligne Lymphome e.V., „Kompetenznetz Maligne Lymphome,“ [Online]. Available: http://www.lymphome.de/Gruppen/GPOH-HD/Protokolle/EuroNet-PHL-C1_und_R1/index.jsp. [Zugriff am 15.03.2017].
- [54] Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI), Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, „Deutsches Kinderkrebsregister,“ [Online]. Available: <http://www.kinderkrebsregister.de/dkkr/ergebnisse/wichtigste-ergebnisse.html>. [Zugriff am 26.10.2016].
- [55] S. Sharma, W. Leung, P. Deqing, J. Yang, R. Rochester, L. Britton, M. Neel, K. Ness und S. Kaste, „Osteonecrosis in Children after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Study of Prevalence, Risk Factors, and Longitudinal Changes Using MR Imaging,“ *Bone Marrow Transplant. 2012 August ; 47(8): 1067–1074*, 2012.
- [56] E. Karimova, A. Wozniak, J. Wu, D. Neel und S. Kaste, „How does osteonecrosis progress about the knee in young patients with leukemia,“

The Association of bone and joint surgeons, 2009.

- [57] Y. Liu, W. Jiang, S. Liu, X. Su und S. Zhou, "Combined effect of tnf- α polymorphisms and hypoxia on steroid-induced osteonecrosis of femoral head", *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(3):3215-3219, www.ijcep.com/ISSN:1936-2625/IJCEP0004959, 2015.
- [58] R. Yamaguchi, N. Kamiya, N. Adapala, H. Drissi und H. Kim, "HIF-1-Dependent IL-6 Activation in Articular Chondrocytes Initiating Synovitis in Femoral Head Ischemic Osteonecrosis", Needham, USA: *The Journal Of Bone And Joint Surgery*, Volume 98-A, Number 13, 2016.
- [59] <http://www.bfm-international.org/aieop/downloads%20documents/Patienteninfo%20fuer%20Eltern%20und%20Sorgeberechtigte%20Version%201%203.pdf>.
- [60] J. Taschik, "Zytokingenpolymorphismen bei Kindern mit akuter lymphatischer Leukämie", Universitätsklinikum Würzburg: Dissertation, 2016.

10 Anhänge

10.1 Cytokine Genotyping Tray or Primer Pack

WORKSHEET
Cytokine Genotyping Tray or Primer Pack, Lot 004

Name _____

Sample I.D. _____

Disease _____

Relationship to Patient _____

TNF- α Results _____

TGF- β 1 Results _____

IL-10 Results _____

IL-6 Results _____

IFN- γ Results _____

D-mix Lot #/Batch # _____

Cat. # CYTGEN, PCYTGEM

Tray Exp. Date _____

Tray Lot # _____

Patient Male

Donor Female

Race _____ Birthdate _____ ABO/Rh _____

POSITIONS	1H/3H/ 5H/7H/ 9H/11H		1G/3G/ 5G/7G/ 9G/11G		1F/3F/ 5F/7F/ 9F/11F		1E/3E/ 5E/7E/ 9E/11E		1D/3D/ 5D/7D/ 9D/11D		1C/3C/ 5C/7C/ 9C/11C		1B/3B/ 5B/7B/ 9B/11B		1A/3A/ 5A/7A/ 9A/11A		2H/4H/ 6H/8H/ 10H/12H		2G/4G/ 6G/8G/ 10G/12G		2F/4F/ 6F/8F/ 10F/12F		2E/4E/ 6E/8E/ 10E/12E		2D/4D/ 6D/8D/ 10D/12D		2C/4C/ 6C/8C/ 10C/12C		2B/4B/ 6B/8B/ 10B/12B		2A/4A/ 6A/8A/ 10A/12A			
	RESULTS	750	125	125	125	175	175	175	175	175	175	125	125	125	125	300	300	300	300	300	300	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	
PRODUCT SIZE (bp)	750	125	125	125	175	175	175	175	175	175	125	125	125	125	300	300	300	300	300	300	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250	250		
SPECIFICITY *	Mag CFI	TNF- α promoter -306A	TNF- α promoter -306G	TNF- α codon 10T	TGF- β 1 codon 25C	TGF- β 1 codon 25C	TGF- β 1 codon 25C	TGF- β 1 codon 10T	TGF- β 1 codon 10C	TGF- β 1 codon 10C	TGF- β 1 codon 25C	TGF- β 1 codon 25C	TGF- β 1 codon 25G	TGF- β 1 codon 25G	IL-10 promoter -1082A-319T	IL-10 promoter -1082A-319T	IL-10 promoter -1082A-319C	IL-10 promoter -1082A-319C	IL-10 promoter -1082A-319T	IL-10 promoter -1082A-319T	IL-10 promoter -819T-892A	IL-10 promoter -819T-892A	IL-10 promoter -819T-892A											
TNF- α	G/G (low)	G/A (high)	A/A (high)	T/T G/G (high)	T/C G/G (high)	T/C G/C (intermediate)	C/C G/G (intermediate)	T/T G/C (intermediate)	C/C G/C (low)	C/C C/C (low)	T/T C/C (low)	T/C C/C (low)	G/C/G/C (high)	G/C/C/C (intermediate)	G/C/C/A (intermediate)	A/C/C/A (low)	A/C/A/T (low)	A/T/A/T (low)	G/G (high)	G/C (high)	G/C (low)	T/T (high)	T/A (intermediate)	A/A (low)										

Photo Documentation

Test Performed by _____ Date _____

Read by _____ Date _____

Reviewed by _____ Date _____

* Note: Low, Intermediate and High refer to gene expression levels.

One Lambda, Inc. 21001 Kittridge St., Canoga Park, CA 91305-2801 Tel: (818) 702-0042 Fax: (818) 702-0904 www.onelambda.com
Tempaa: Temp_CYTGEN_WS_Rev 0

10.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erläuterung
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AnorgPh	Anorganisches Phosphat
AP	Alkalische Phosphatase
bds	beidseits
BMD	Bone mineral density, Knochenmineraldichte
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
CI	Konfidenzintervall
cm	Centimeter
CT	Computertomographie
DNA	Deoxyribonucleic acid
dnTPs	Desoxynukleotid-Triphosphate
EBV	Epstein-Barr-Virus
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
g	Gramm
G/min	Gravitationskonstante pro Minute
HL	Hodgkin-Lymphom
HR	Hochrisiko
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kg	Kilogramm
LK	Lymphknoten
mA	Milliampere
MHC	Major histocompatibility complex
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmol/L	Milli Mol pro Liter
MR	mittleres Risiko
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
nm	Nanometer
ON	Osteonekrose
p	p-Wert

Abkürzung	Erläuterung
PCR	Polymerase chain reaction
PET	Positronenemissionstomographie
r/min	Rotationen pro Minute
SR	Standardrisiko
SSP-PCR	Sequenzspezifische-Primer-Polymerase-chain-reaction
ST	Standardabweichung
TGF	Transforming growth factor
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrose Faktor
V	Volt
W	Watt
WHO	World Health Organisation

11 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Universitäts-Kinderklinik Würzburg unter der Leitung von Herrn Professor Dr. C.P. Speer erstellt, bei dem ich mich für die Möglichkeit bedanken möchte, promovieren zu dürfen.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinem Doktorvater Professor Dr. med. P.-G. Schlegel für die Annahme meiner Doktorarbeit mit der sehr guten fachlichen, sowie ermutigenden Betreuung.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Betreuerin meiner Doktorarbeit Frau PD Dr. med. Beate Winkler. Vielen Dank für die Vergabe dieses wichtigen Themas und kontinuierliche Begleitung der Forschungsarbeit. Herzlichen Dank für die Ermutigungen, die Geduld, die viele Zeit und die guten Diskussionen, die in meine Doktorarbeit und damit in mein weiteres berufliches Leben geflossen sind.

Die Mitarbeiter der Station Leuchtturm haben stets daran gedacht, zeitgerecht Blut für meine Studie mit abzunehmen. Ein großes Dankeschön dafür an das gesamte Team.

Die Einführung in die für mich neue Welt der Laborarbeit wurde mir durch meine Kommilitonen Engelke Rasche und Jens Hachenberg sowie den freundlichen MTAs des Labors der Kinderklinik erleichtert. Für den statistischen Teil habe ich wichtige Unterstützung von Frau Imme Haubitz erhalten. Vielen Dank.

Eine Forschungsarbeit besteht aus vielen Teilen, an denen verschiedene Wegbegleiter an unterschiedlichen Stellen wichtig werden. Nicht nur das Zusammentragen von Daten, Pipettieren im Labor und Diskutieren von Forschungsergebnissen machen eine Doktorarbeit aus und bringen sie letztendlich zum Erfolg. Menschen, die an einen glauben, unterstützen und aufbauen, gehören genauso dazu. Deshalb möchte ich, allen voran, meinem Mann Konrad Henn danken. Er hat meine Entscheidung zu promovieren in allen Konsequenzen liebend mitgetragen. Meiner Freundin Carla Ziebertz möchte ich für die vielen Ermutigungen danken, dass Probleme lösbar sind, Anne Kunz hat

mich immer wieder bestärkt und meine Freundin Tirza Mühlan-Meyer stand mir beratend zur Seite.

Eine Doktorarbeit ist letztendlich kein trockener Forschungsbericht, sondern gefüllt mit eigenem Herzblut und Gedanken, entstanden auch durch die Begleitung eines Netzwerks an fachlichen und emotionalen Mentoren.

Danke.