

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem
Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
der Medizinischen Hochschule Hannover
und
aus der Kinderklinik III der Universitätsklinik Essen

- Minimale Resterkrankung -
Prognostische Relevanz des Therapieansprechens
nach der Induktionstherapie bei der
akuten myeloischen Leukämie im Kindesalter

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von Johanna Angelika Ohlendorf
aus Henstedt-Ulzburg
2016

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. D. Reinhardt
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. A. Hüttmann
3. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. R. Schroers, Bochum

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Grundlagen der AML	5
1.1.1	Vorkommen und Prognose	5
1.1.2	Ätiologie	6
1.1.3	Pathogenese	7
1.1.4	Klinische Symptomatik	8
1.1.5	Morphologie/FAB-Klassifikation, Immunologie, Zyto- und Molekulargenetik ..	8
1.1.6	Immunologie	10
1.1.7	Therapie	11
1.1.8	Prognose	12
1.2	Minimale Resterkrankung (minimal residual disease, MRD).....	17
2	Fragestellung	20
3	Patienten, Material und Methoden	21
3.1	Patienten	21
3.1.1	Patientenauswahl für die morphologische Untersuchung an Tag 28	21
3.1.2	Patientenauswahl für die durchflusszytometrische Untersuchung an Tag 28 nach Therapiebeginn.....	22
3.2	Proben	22
3.3	Therapiestudie AML-BFM 1998	22
3.3.1	Therapieplan.....	23
3.3.2	Risikoeinteilung	24
3.4	Therapiestudie AML-BFM 2004	24
3.4.1	Therapieplan.....	25
3.4.2	Risikoeinteilung	27
3.5	Knochenmarkpunktionen/Zeitpunkte	27
3.6	Morphologie.....	27
3.7	Durchflusszytometrie	28
3.7.1	Probenaufbereitung	29
3.7.2	Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchung	31
3.8	Definitionen	32
3.9	Statistik.....	33
4	Ergebnisse	34
4.1	Vergleich der morphologischen und immunologischen Auswertung an Tag 28... 34	
4.2	Unterscheidung der Blastenpopulationen in der Immunphänotypisierung	38
4.3	Ereignisfreies Überleben, 5-Jahresüberleben und kumulative Inzidenz für ein Rezidiv in Bezug auf das Vorliegen einer Minimalen Resterkrankung an Tag 28 in der Immunphänotypisierung	38
4.4	Das Therapieansprechen an Tag 28 der Gesamtgruppe in der morphologischen Auswertung in Bezug auf die Höhe der Blastenzahl	42
4.5	Auswertung der Gesamtgruppe in der Morphologie an Tag 28 bzgl. des Therapieansprechens	45
4.5.1	Morphologische und immunologische Auswertung an Tag 28 der Standardrisikogruppe bzgl. des Therapieansprechens	47
4.5.2	Morphologische und immunologische Auswertung an Tag 28 der Hochrisikogruppe bzgl. des Therapieansprechens	47
4.5.3	Morphologische und immunologische Auswertung der Hochrisikogruppe ohne Stammzelltransplantation	50
4.5.4	Morphologische und immunologische Auswertung der Hochrisikogruppe mit Stammzelltransplantation	52
4.6	Beziehung zwischen klinischem Verlauf und Therapieansprechen an Tag 28	54

4.7	Therapieanpassung aufgrund des Therapieansprechens unter Einbeziehung der immunphänotypischen Befunde an Tag 28	55
5	Diskussion	60
5.1	Die Minimale Resterkrankung Ergebnisse der Morphologie vs. Immunphänotypisierung	60
5.2	Beurteilung der MRD durch die Immunphänotypisierung Unterscheidung der Blastenpopulationen an Tag 28	63
5.3	Therapieansprechen, Therapieverlauf und Therapiestratifizierung in Bezug auf das Vorliegen einer minimalen Resterkrankung.....	67
5.4	Schlussfolgerungen und Perspektiven	69
6	Zusammenfassung.....	71
7	Literaturverzeichnis	72
8	Anhang	82
8.1	Abbildungen	82
8.2	Tabellen.....	88
8.3	Abkürzungen	89
9	Danksagung.....	92
10	Lebenslauf	93

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der AML

1.1.1 Vorkommen und Prognose

Eine akute myeloische Leukämie ist definiert als die klonale Ausbreitung myeloischer leukämischer Blasten in einem Anteil von $\geq 20\%$ im Knochenmark oder Blut (Downing & Shannon, 2002).

In Deutschland erkranken zirka 1.700 bis 2.000 Kinder und Jugendliche unter 18 Jahren pro Jahr an einer Krebserkrankung (Kaatsch, 2015). Etwa 34% dieser Kinder erkranken an einer akuten Leukämie, welche die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter darstellt (Kaatsch, 2013). Bei 20 % der leukämischen Erkrankungen im Kindesalter handelt es sich um akute myeloische Leukämien (AML) (Kaatsch, 2013), dennoch sind sie für 30 – 40% der leukämieassoziierten Todesfälle ursächlich (Margolin, 2011). In Deutschland wurden im Zeitraum von 2003 bis 2012 beim deutschen Kinderkrebsregister in Mainz 782 Kinder und Jugendliche zwischen 0 und 14 Jahren gemeldet, die zum ersten Mal an einer AML erkrankten (Kaatsch, 2013).

Die Überlebensrate der AML hat sich in den letzten 30 Jahren seit der Einführung klinischer Studien durch die Intensivierung der Chemotherapie und die Fortschritte in der supportiven Therapie deutlich verbessert. Die 5-Jahresüberlebensrate lag 1978 bei 42%, aktuell wird eine 5-Jahresüberlebensrate von ca. 74% erreicht (Reinhardt et al., 2004). In der Gruppe der „Core-Binding“ Faktor Leukämien (CBFB-MYH11) liegt diese sogar bei bis zu 90% (Creutzig et al., 2013). Die Inzidenz der AML bei Kindern und Jugendlichen unter 15 Jahren liegt in Deutschland bei zirka 0,7/100.000 Einwohnern. Insgesamt ist sowohl in Deutschland als auch in Europa eine Zunahme der Inzidenz für Leukämien in allen Altersgruppen zu beobachten, ausgenommen davon sind Säuglinge (Kaatsch und Mergenthaler, 2008). Das Erkrankungsalter für eine akute myeloische Leukämie liegt im Median für Kinder und Jugendliche bei 6,1 Jahren (Kaatsch und Mergenthaler, 2008). Die Altersverteilung zeigt einen geringen Häufigkeitsgipfel in den ersten 2 Lebensjahren (Kaatsch, 2010). Das Verhältnis zwischen Jungen und Mädchen beträgt 1,1:1 (Creutzig et al., 2005).

1.1.2 Ätiologie

Die Ursache der kindlichen AML ist nicht vollständig geklärt. Es werden genetische oder kongenitale prädisponierende Faktoren diskutiert. Bei Zwillingsgeschwistern wurden u.a. in 5 bis 25% übereinstimmende Leukämien beobachtet. Man vermutet, dass beide Kinder Träger einer ersten genetischen Mutation sind. Möglicherweise findet ein Transfer eines prä-leukämischen Klon zwischen den Zwillingen statt und anschließend erfolgt unabhängig voneinander eine zweite genetische Mutation („second hit“ Theorie) (Eden, 2010). Des Weiteren scheinen als Risikofaktoren die Ethnie, das Alter des Vaters zum Zeitpunkt der Konzeption und das Alter der Mutter zum Zeitpunkt der Geburt eine Rolle zu spielen (Deschler und Lubbert, 2006; Podvin et al., 2006).

Zu den schädigenden Umwelteinflüssen gehören sowohl der direkte als auch der indirekte Kontakt (beispielsweise durch Exposition der Eltern) mit Pestiziden (Eden, 2010). Die intrauterine Exposition mit Alkohol erhöht das Risiko an einer AML zu erkranken möglicherweise ebenfalls (Menegaux et al., 2007). Sowohl das väterliche präkonzeptionelle als auch das mütterliche Rauchen vor, während und nach der Schwangerschaft haben einen Einfluss auf die Entstehung von kindlichem Krebs. Ein Einfluss durch berufliche Exposition der Eltern mit gesundheitsschädlichen Chemikalien oder Industrieabgasen wird vermutet (Eden, 2010).

Erwiesene Risikofaktoren sind die vorausgegangene Einnahme von Zytostatika, insbesondere die Einnahme von Alkylantien, Topoisomerase-Hemmstoffen, Anthrazyklinen und Taxanen (Deschler und Lubbert, 2006; Emerenciano et al., 2007). Es wurden Zusammenhänge zwischen einem Anstieg des Risikos, an einer sekundären AML zu erkranken, und vorausgegangener therapeutischer Bestrahlung gefunden (Deschler und Lubbert, 2006).

Die Epidemiologische Studie zu Kinderkrebs in der Umgebung von Kernkraftwerken (KiKK-Studie) zeigte für den Zeitraum 1980 – 2003 eine Erhöhung des relativen Risikos für Leukämien im 5 km-Radius um deutsche Kernkraftwerke für Kinder unter 5 Jahren (Nentwich, 2010). Die Ursache hierfür ist unklar, da zwischen der Höhe der gemessenen Strahlenbelastung im Umkreis von Kernkraftwerken und dem ermittelten Risiko eine Diskrepanz besteht.

Mütterliche virale Infektionen während der Schwangerschaft und vor allem eine vorausgegangene Infektion mit dem Parvovirus B19 stehen ebenfalls im Verdacht, das Risiko zu erhöhen, an einer Leukämie zu erkranken (Eden, 2010; Nentwich, 2010). Für Impfungen ist weder ein protektiver Effekt noch ein erhöhtes Risiko nachweisbar (Eden, 2010; MalloI-Mesnard et al., 2007).

Zu den genetischen Ursachen bei syndromalen Erkrankungen zählen chromosomale Veränderungen bei Kindern mit Down-Syndrom, Klinefelter-, Patau-, Bloom-, Schwachmann-, Kostmann- und Li-Fraumeni-Syndrom sowie die Neurofibromatose oder die Fanconi-Anämie (Barber et al., 2003; Deschler und Lubbert, 2006; Downing und Shannon, 2002; Hall, 2001). Kinder mit Down-Syndrom haben beispielsweise ein 10- bis 20-fach erhöhtes Risiko, an einer AML zu erkranken (Deschler und Lubbert, 2006; Eden, 2010). Bis zum vierten Lebensjahr kommt fast ausschließlich eine GATA1-mutierte akute Megakaryoblastenleukämie vor (Klusmann et al., 2007).

1.1.3 Pathogenese

Die akuten myeloischen Leukämien sind heterogene maligne Erkrankungen der Hämatopoese, die aus der klonalen Proliferation einer transformierten Vorläuferzelle entstehen. Die Blasten verlieren ihre Eigenschaft zur Differenzierung bei anhaltender Proliferationsfähigkeit. Man kann zwei funktionelle Gruppen von veränderten Proteinen in den leukämischen Blasten unterscheiden: die der aktivierten Tyrosinkinase, zu denen BCR-ABL, c-Kit und FLT3 gehören und welche, die Signale zur Proliferation an die Zellen weitergeben (Pui et al., 2011). Des Weiteren liegen Veränderungen von Proteinen vor, die die Regulation der Transkription beeinflussen, wie z.B. der „core binding factor“ CBF (t(8;21), inv16), „retinoic acid receptor alpha“ RAR α , C/EBP- α (CCAAT-enhancer binding protein alpha), MLL-Rearrangements und HOX Proteine, welche die Differenzierung veranlassen (Emerenciano et al., 2007; Marcucci et al., 2011; Marschalek, 2011; Pui et al., 2011). Um eine akute myeloische Leukämie zu induzieren benötigt die Vorläuferzelle sowohl die veränderten Transkriptionsfaktoren als auch die aktivierten Tyrosinkinase (Downing und Shannon, 2002). Bei mehr als einem Drittel der Patienten mit einer AML liegt eine Mutation des Gens, welches für die Fms-like-tyrosine Kinase 3 (FLT3) kodiert, vor (Stubbs und Armstrong, 2007; Takahashi, 2011). Eine aktivierende „internal tandem duplication“ ITD der FLT3 Rezeptor-Kinase weisen etwa 10% der kindlichen akuten myeloischen Leukämien auf.

1.1.4 Klinische Symptomatik

Die anfänglichen klinischen Symptome der AML können Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Gewichtsverlust, Fieber, Infektanfälligkeit, Blutungen und Knochenschmerzen sein. Durch die zunehmende Verdrängung der normalen Hämatopoese mit leukämischen Blasten kommt es im Verlauf zu Zeichen einer Knochenmarkinsuffizienz. Diese äußert sich als Anämie, Granulozytopenie und eine vermehrte Neigung zu Hämatomen, Nasenbluten und Petechien aufgrund der Thrombozytopenie. Bei der AML kann es zudem noch zu extramedullären Manifestationen mit Infiltration der Organe oder der Haut kommen. Weitere Zeichen der lokalen Manifestation können eine indolente, meist einseitige Hodenschwellung sein oder eine Gingivahyperplasie. Eine Beteiligung des zentralen Nervensystems äußert sich durch Kopfschmerzen, Erbrechen, Krampfanfälle, Sehstörungen, Hirnnervenlähmungen oder Meningismus. Zusätzlich zur Lymphadenopathie liegt häufig eine Hepatosplenomegalie vor (Reinhardt et al., 2004). Eine seltene Komplikation ist die initiale Hyperleukozytose (Leukozytenzahl > 100.000/ μ l), welche durch Leukostase zu einem Multiorganversagen führen kann. Initial kann es spontan oder nach Beginn der Therapie zum Tumorlysesyndrom kommen. Die Patienten werden mit einer Hypokalziämie, Hyperkaliämie, Hyperurikämie, erhöhter LDH-Aktivität und Hyperphosphatämie auffällig. Bei Vorliegen einer komplexen Gerinnungsstörung durch die leukämischen Blasten kann es zu bedrohlichen Hämorrhagien kommen, wobei die intrakraniellen Blutungsereignisse als Komplikation am bedeutsamsten sind.

1.1.5 Morphologie/FAB-Klassifikation, Immunologie, Zyto- und Molekulargenetik

Die French-American-British (FAB) Klassifikation der AML, basierend auf der Morphologie und der Zytochemie, wurde 1976 eingeführt und gilt seitdem als Standardklassifikation. Die 1999 eingeführte WHO-Klassifikation beinhaltet neben der Morphologie die Immunologie, Zytogenetik, Molekulargenetik und klinische Aspekte und wird international aufgrund der differenzierteren Einteilung derzeit der Diagnose zugrunde gelegt (siehe Tabelle 1). Gemäß der WHO-Klassifikation ist die Diagnose AML zu stellen, wenn der Anteil pathologischer Myeloblasten im Knochenmark und/oder im peripheren Blut \geq 20% beträgt (Downing und Shannon, 2002; Harris et al., 1999). Ausgenommen von dieser Definition sind folgende drei AML-Entitäten: AML mit t(8;21)(q22;q22), inv16(p13.1q22) oder t(16;16)(p13.1q22) und t(15;17)(q22;q21). Für diese drei Gruppen ist die Diagnose einer AML auch bei unter 20% Blasten im Knochenmark und/oder im peripheren Blut mit dem Vorliegen der zyto- oder molekulargenetischen Veränderungen zu stellen (Downing und Shannon, 2002).

Tabelle 1

WHO Klassifikation 2008 der akuten myeloischen Leukämie (Vardiman et al., 2009)

Akute myeloische Leukämie (AML)	
AML mit typischen genetischen Aberrationen	Fusionsgen
AML mit t(8;21)(q22;q22)	RUNX1-RUNX1T1
AML mit inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13,q22)	CBFB-MYH11
AML mit t(15;17)(q22;q12)	PML/RAR α
AML mit 11q23 Aberration	MLL/ XX-Rearrangements
AML mit t(6;9)	DEK-NUP214
AML mit inv(3)(q21q26.2) oder t(3;3)(q21q26.2)	PRPN1-EVI1
AML mit t(1;22) (p13;q13)	RBM15-MKL1
AML mit Gen-Mutationen	zytogenetische Assoziation
c-kit	t(8;21) / inv(16)
FLT3-ITD / TKD	normaler Karyotyp
MLL-PTD	normaler Karyotyp
CEBPA	normaler Karyotyp
NPM1	normaler Karyotyp
WT1	normaler Karyotyp
AML mit einer Mehrliniendysplasie	
AML ohne vorangegangenes Myelodysplastisches Syndrom (MDS)	
AML nach MDS	
Therapieassoziierte AML und MDS	
AML nach Alkylantien	
AML nach Topoisomeraseinhibitoren	
andere	
AML, die in den o.g. Gruppen nicht kategorisiert werden können	entspricht nach FAB
Minimal differenzierte AML	M 0
AML ohne Reifung	M 1
AML mit Reifung	M 2
Akute myelomonoblastäre Leukämie	M 4
Akute monoblastäre Leukämie	M 5
Akute erythroide Leukämie	M 6
Akute megakaryoblastäre Leukämie	M 7
Akute basophile Leukämie	M 2 baso
Akute Myelofibrose	
Myelosarkom / Extramedulläre Leukämie	
Akute Leukämien mit unklarer Linienzugehörigkeit	
Akute undifferenzierte Leukämie	
Akute bilineale Leukämie	
Akute biphänotypische Leukämie	
Myeloische Leukämie bei Down Syndrom / Down Mosaik	
Myeloische Leukämie bei Down Syndrom	GATA1 Mutation
Transiente Leukämie bei Trisomie 21 (TL)	GATA1 Mutation

1.1.6 Immunologie

Durch die Immunphänotypisierung erfolgt zunächst die Linienzuordnung jeder akuten Leukämie.

Für die Diagnose der AML ist der Nachweis von mindestens zwei myeloischen Antigenen [CD13, CD14, CD15, CD33, CD64, CD65, zytoplasmatische Myeloperoxidase (MPO)] gefordert (siehe Tabelle 2).

Die Abgrenzung der malignen Blasten von Zellen und Progenitoren der normalen Myelopoese beruht auf der asynchronen, atypischen oder linienaberranten Expression von Oberflächen- oder zytoplasmatischen Antigenen der Hämatopoese (Langebrake et al., 2005; Sievers et al., 2003). Die asynchrone Antigenexpression umfasst den gleichzeitigen Nachweis stammzellassoziierter Antigene, z.B. CD34 (Stammzellantigen) oder CD117 (Stammzellfaktorrezeptor-Antigen) mit linienspezifischen Antigenen späterer Differenzierungsstadien. Bei der atypischen Antigenexpression kommt es zu einer Über- oder Unterexpression verschiedener Antigene (Ossenkoppele et al., 2011; Sievers et al., 2003). Die aberrante Expression linienfremder Antigene umfasst den Nachweis von lymphozytären Markern wie z.B. CD2, CD4, CD7, CD19 und CD56 auf primär myeloischen Blasten (Abdelhaleem, 2007).

Tabelle 2

Immunologische Klassifikation der AML (modifiziert nach EGIL) (Creutzig und Reinhardt, 2013) (TdT = Terminale desoxynucleotidyl Transferase, Ly = Lymphoid-Antigen Positivität, MPO = Myeloperoxidase)

Typ	Antigenexpression
Akute myeloische Leukämie	MPO+, CD13+, CD33+, CD15+, CD65+, CD117+(c-kit)- (Minimalkriterien: mind. 2 Marker positiv)
Monozytäre Differenzierung	CD14 (CD11c, CD64, CD4low)
Erythrozytäre Differenzierung	Glykophorin A+ (Kombination CD45neg/CD36/CD71)
Megakaryozytäre Differenzierung	CD61, CD42b, CD41
Undifferenzierte AML	Minimalkriterien, kein Nachweis von CD3, CD19, CD20, CD22 (neg. Zytochemie)
TdT + AML	Minimalkriterien und nur TdT+
Ly + AML	Minimalkriterien und ≤2 Markern: CD10, CD19, CD79a, CD7, CD1, CD2, CD3, (CD5, CD8, CD20); keine ausreichenden Kriterien für BAL

1.1.7 Therapie

Die Therapie der AML bei Kindern erfolgt überwiegend in nationalen und internationalen Studien. In Deutschland werden 99,3 % aller Kinder, die an einer Leukämie, myeloproliferativen oder myelodysplastischen Erkrankung leiden im Alter von 0 bis 14 Jahren in einer Studie behandelt (Kaatsch, 2015). Seit 1978 werden in Deutschland multizentrische Therapiestudien für die AML im Kindesalter durchgeführt (Creutzig et al., 1990). Für die akuten myeloischen Leukämien bei Kindern und Jugendlichen sind in Deutschland, Österreich, Tschechien und im deutschsprachigen Teil der Schweiz die AML-BFM-Studien die fast ausschließlich angewandten Therapiekonzepte. In den AML-BFM-Studien 87, 93 und 98 konnten durch Steigerung der Therapieintensität, durch Stratifizierung in Standard- und Hochrisikogruppen, durch Optimierung der Therapie und der supportiven Therapie die 5-Jahres Überlebenschancen von Kindern mit AML über die Jahre deutlich verbessert werden (Creutzig et al., 2005).

Das Ziel der Therapie ist die Heilung der Patienten und die Senkung des Risikos eines Rückfalls durch Beseitigung der leukämischen Blasten und die nachfolgende Regeneration der normalen Hämatopoese. Sowohl die AML-BFM Studie 2004 als auch die meisten europäischen Studien arbeiten inzwischen mit Risikogruppen- adaptierten Protokollen (ter Bals und Kaspers, 2005).

In der AML-BFM Studie 2004 erfolgt die Therapiestratifizierung in eine der Risikogruppen an Tag 15 der Therapie. Es wird nach den AML Subtypen, dem Therapieansprechen an Tag 15 und dem Nachweis einer FLT-3-ITD stratifiziert. Die Standardrisikogruppe und die Hochrisikogruppe unterscheiden sich hinsichtlich der Therapie (Creutzig et al., 2013).

Zunächst wird mit der intensiven Induktionstherapie (ADx E/AIE und AI/HAM) eine komplette Remission (CR) angestrebt. Darauf erfolgt die Postremissionstherapie bestehend aus Konsolidierungs- und Intensivierungsblöcken (haM oder AI/2-CDA oder AI) sowie (HAE oder haM und HAE) zusammen mit einer ZNS-Prophylaxe. Anschließend erfolgt die Gabe einer weniger intensiven Erhaltungs-/Dauertherapie (Cytarabin und Thioguanin) (Creutzig et al., 2005). Eine allogene Stammzelltransplantation kann in wenigen Fällen, wie zum Beispiel bei fehlendem Therapieansprechen nach der 2. Induktion mit Blastenpersistenz oder anhaltender Aplasie notwendig werden.

Die Therapieprotokolle der verschiedenen Studiengruppen haben als gemeinsame Therapieelemente die Chemotherapeutika Cytarabin und Anthrazyklinderivate. So empfiehlt das St. Jude Hospital in Memphis, USA, im AML-97 Protokoll eine Präinduktion mit Cladribin/Cytarabin, die Induktion mit zwei Kursen Daunorubicin, Cytarabin und Etoposid (DAV) und eine Konsolidierung mit Hochdosis Cytarabin und L-Asparaginase (HDAC/Asp), Mitoxantron und Cytarabin (Ribeiro et al., 2005). Es enthält, wie die meisten

Protokolle, keine an die Konsolidierung anschließende Dauertherapie. Eine allogene SZT von einem verwandten oder eine alternativen Spender wird bei der Intermediär-Risikogruppe und der Hochrisikogruppe geprüft bzw. ist ebenfalls eine Möglichkeit für Patienten der Standardrisikogruppe in zweiter Remission.

Das britische MRC-AML10 Protokoll beginnt die Induktion mit zwei Kursen niedrig dosiertem Cytarabin, Daunorubicin und Thioguanin (DAT) versus Cytarabin, Daunorubicin und Etoposid (ADE). Die Konsolidierung erfolgt mit Amsacrin/Cytarabin/VP16 und Mitoxantron/Cytarabin. Nach der Konsolidierung erfolgt bei passendem Spender eine allogene SZT und bei nicht vorhandenem Spender eine autologe SZT oder keine weitere Therapie (Stevens et al., 1998).

Das skandinavische Protokoll der NOPHO-AML 93 Studie startet die Induktionstherapie mit Thioguanin/araC/VP16/Doxorubicin und Mitoxantron/ Cytarabin. Die Konsolidierung erfolgt mit Hochdosis Cytarabin (HDAC) und Mitoxantron sowie VP16 (Molgaard-Hansen et al., 2011).

Die Indikation zur ZNS-Prophylaxe mittels Bestrahlung und die Dauertherapie treffen nicht auf alle Risikogruppen und Therapieprotokolle zu. Auch ist die AML-BFM Studie eine der wenigen, die eine Dauertherapie als Therapieelement beibehält (ter Bals und Kaspers, 2005).

1.1.8 Prognose

Die Prognose der AML hat sich in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert, aktuell beträgt die 5-Jahresüberlebensrate 74% (Reinhardt et al., 2004). Die Verbesserung der Überlebensrate in den letzten Jahren wurde vor allem durch intensiviertere Chemotherapie und verbesserte supportive Therapie erreicht. Aufgrund besser geschultem Personal und Etablierung eines Therapiestandards in das Therapieprotokoll bei akuten Infektionen während der Therapie, konnte die infektionsassoziierte Mortalität über die Jahre (Untersuchungszeitraum AML-BFM Protokoll 1993 bis AML-BFM Protokoll 2004) signifikant von 5,4% auf 1,5% gesenkt werden (Bochennek et al., 2016). Eine weitere Senkung der Rezidivrate und der therapiebedingten Mortalität ist dementsprechend das Ziel für zukünftige Studien.

Als Hauptprognosefaktoren für die Einschätzung des Krankheitsverlaufes galten in der aktuell abgeschlossenen Studie AML-BFM 2004 die Morphologie in Kombination mit der Zytogenetik und Molekulargenetik sowie das Therapieansprechen.

Patientenbezogene Risikofaktoren stellen ebenfalls wichtige prognostische Kriterien dar. Zu ihnen zählen Alter, Geschlecht, Ethnie und BMI (body mass index). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Kinder mit Unter- als auch mit Übergewicht ein verringertes

Überleben aufweisen (Radhi et al., 2010). Eine ungünstige Prognose ist mit einem schlechten initialen Allgemeinzustand, initialer systemischer Infektion und einer Einschränkung der Nierenfunktion assoziiert. Die Hyperleukozytose ist in verschiedenen internationalen Studien als unabhängiger Prognosefaktor identifiziert worden. Auch in den AML-Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) Studien ist die Hyperleukozytose mit einem hohen Risiko für einen frühen Tod innerhalb der ersten 42 Tage nach Therapiebeginn (ED) assoziiert (Creutzig et al., 1999).

Das Therapieansprechen mit Nachweis der Blastenreduktion im Knochenmark nach dem ersten Induktionsblock ist ein weiterer wichtiger Prognosefaktor. Man weiß inzwischen, dass Patienten mit 5 – 15% Blasten nach der 1.Induktion eine bessere Prognose als Patienten mit 15 – 20% oder sogar über 20% Blasten zu diesem Zeitpunkt haben. Des Weiteren erreichen deutlich mehr Patienten mit 5 – 15% Blasten eine Remission nach der 2. Induktion als die Patienten mit einem Vorliegen von über 15% Blasten. Sogar bei Erreichen einer Remission nach der 2. Induktion war ihre Prognose deutlich schlechter (Meshinchi und Arceci, 2007; Radhi et al., 2010). Somit ist ein schnelles Therapieansprechen nach der Induktion ein unabhängiger Parameter für eine höhere Überlebensrate. Die Persistenz höherer Blastenzahlen nach dem zweiten Induktionsblock ist in der AML-BFM Studie 2004 eine Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation (SZT).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine logarithmische Abnahme der Zellen mit einem positiven Leukämie assoziierten Phänotyp (LAIP-pos.) in der Immunphänotypisierung von Tag 1 bis Tag 16 der Therapie direkt mit der Wahrscheinlichkeit des Erreichens von Remission, dem ereignisfreien Überleben und dem Gesamtüberleben positiv korreliert (Bacher et al., 2009).

1.1.8.1 Immunologische Risikofaktoren

Ein möglicher immunologischer Risikofaktor ist das Integrin VLA-4 (CD49a/CD29). Die Childrens Oncology Group fand heraus, dass für eine Gruppe von Patienten in der Standardrisikogruppe und in der Niedrigrisikogruppe eine hohe VLA-4 Expression zum Zeitpunkt der Diagnosestellung mit einem besseren klinischen Ergebnis assoziiert ist. Des Weiteren zeigte sich, dass eine niedrige VLA-4 Expression einen unabhängigen Vorhersagefaktor darstellt ein Rezidiv zu erleiden. Somit bietet das Integrin VLA-4 (CD49a/CD29) die Möglichkeit, Patienten ohne zyto- oder molekulargenetische Risikofaktoren zu stratifizieren (Walter et al., 2010).

1.1.8.2 Zytogenetische Risikofaktoren

Die vielfältigen genetischen Veränderungen der leukämischen Blasten der AML spiegeln die Diversität der Erkrankung wieder.

Nur bei 20% der Kinder mit AML sind keine strukturellen und/oder numerischen chromosomalen Veränderungen nachweisbar (Radhi et al., 2010).

In der AML-BFM 98 Studie wurden die zytogenetischen Veränderungen in günstige, intermediäre und ungünstige Veränderungen hinsichtlich ihrer prognostischen Bedeutung eingeteilt. Eine günstige prognostische Bedeutung haben folgende Aberrationen in den leukämischen Blasten: Translokation $t(8;21)(q22;q22)$ und/oder der Nachweis des Fusiongens AML1/ETO, Translokation $t(15;17)(p22;q21)$ und/oder der Nachweis des Fusiongens PML/RAR α und Inversion $inv(16)(p13;q22)$ und/oder der Nachweis des Fusiongens CBF β /MYH11. Meshinchi et al. zählt noch die Translokation $t(16;16)$ zu den günstigen Aberrationen (Radhi et al., 2010; von Neuhoff et al., 2010).

Zu den intermediären zytogenetischen Veränderungen zählen: Aberrationen von 7q, Trisomie 8 ohne das Vorliegen weiterer günstigerer zytogenet. Veränderungen, Veränderungen am Chromosom 5 ohne das Vorliegen weiterer günstigerer zytogenet. Veränderungen. MLL assoziierte Veränderungen: $t(9;11)$ ohne zusätzliche Veränderungen und $t(11;19)$ und Patienten mit einem normalen Karyotyp und nicht weiter klassifizierten Veränderungen (von Neuhoff et al., 2010). Grimwade et al. rechneten noch weitere Veränderungen der intermediären Gruppe zu: $t(3;5)(q21\sim25;q31\sim35)$, +8, +21,+22, 11q23 (MLL-)assoziierte Veränderungen, $del(9q)$, $del(7q)$ (Grimwade et al., 1998).

Von einer ungünstigen prognostischen Bedeutung wird bei folgenden Veränderungen ausgegangen: MLL assoziierte Veränderungen: $t(9;11)$ mit zusätzliche Veränderungen, MLL assoziierte Veränderungen die nicht $t(9;11)$ oder $t(11;19)$ betreffen. Monosomie 7, Veränderungen 12p betreffend ohne zusätzliche günstige genetische Veränderungen sowie komplexe Karyotypen. Sehr seltene ungünstige Aberrationen sind: $t(9;22)(q34;q11)$, $t(8;16)(p11;p13)$, $t(6;9)(q23;q34)$, $t(7;11)(p15;p15)$, $t(7;12)(q36;p13)$ (von Neuhoff et al., 2010).

Manola und Grimwade zählen noch die Translokationen $t(4;11)$, $t(5;11)$, $t(6;11)$, $t(10;11)$, $t(6;9)$ zu den ungünstigen Veränderungen (Grimwade et al., 1998; Grimwade, 2012; Grimwade und Hills, 2009; Manola, 2009).

Nicht nur eine prognostische Bedeutung hat der Karyotyp $t(15;17)(q22;q12\sim21)$ bei der akuten Promyelozyten-Leukämie (APL), sondern auch eine wichtige Bedeutung hinsichtlich der Behandlung. Durch die Therapie mit ATRA ist die Heilungsrate bei der APL eine der höchsten aller AML-Subtypen. Ähnliches gilt für Leukämien mit dem

Karyotyp t(8;21, inv(16), t(15/17), t(1;11) bei denen sich die Prognose ebenfalls verbessert hat und das pOS in der AML-BFM 2004 Studie bei $88 \pm 2\%$ lag. Für die Patienten mit normalem Karyotyp oder den Veränderungen t(9;11) lag das pOS bei $64 \pm 2\%$ und für Patienten mit ungünstigen genetischen Veränderungen wie t(4;11), t(5;11), t(6;11), t(10;11), t(6;9), t(7;12), t(9;22) Monosomie 7 oder komplex aberrantem Karyotyp lag das pOS bei $56 \pm 5\%$ (Reinhardt et al., 2012).

1.1.8.3 Molekulargenetische Risikofaktoren

Molekulargenetische Veränderungen sind zur prognostischen Einschätzung besonders der zirka 20% Patienten mit einem normalen Karyotyp relevant (Marcucci et al., 2011; von Neuhoff et al., 2010). In dieser Patientengruppe konnten einige molekulargenetische Veränderungen mit prognostischer Bedeutung nachgewiesen werden. Das FTL3-Gen (Fms-like tyrosine kinase 3) kodiert für eine Tyrosin-Rezeptorkinase, die vor allem von hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Die prognostische Bedeutung einer Mutation dieses Gens wird noch diskutiert, wobei Studien darauf hindeuten, dass das Vorliegen mit einem höheren Rezidivrisiko bei Kindern und einem schlechteren Gesamtüberleben assoziiert ist (Grimwade und Hills, 2009). Vieles deutet darauf hin, dass die ungünstige prognostische Bedeutung von der Höhe der Expression des FLT3-ITD abhängt (Marcucci et al., 2011; Radhi et al., 2010).

Mutationen des Nukleophosmin-Gens (NPM1) finden sich ebenfalls vor allem bei Patienten mit normalem Karyotyp und kommen wie die *FLT3*-Mutationen sowohl bei Erwachsenen als auch bei Kindern mit einer AML vor (Krstovski et al. 2010). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit einer NPM1-Mutation ohne gleichzeitiges Vorliegen einer *FLT3*- Mutation eine signifikant bessere Prognose und somit ein verbessertes Überleben haben als Patienten, die entweder eine *NPM1*-und *FLT3*-Mutation oder nur eine *FLT3*-Mutation oder keine dieser beiden Mutationen aufweisen (Krstovski et al., 2010; Marcucci et al., 2011; Radhi et al., 2010; Thiede et al., 2006).

Mutationen des CCAAT/enhancer-binding protein-alpha Gens (*CEBPα*) stellen einen prognostisch günstigen Faktor bei Patienten mit normalem Karyotyp, unabhängig vom Alter dar (Radhi et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass *CEBPα*-Doppel-Mutationen sowohl für das Überleben als auch für die kumulative Inzidenz hinsichtlich des Rezidivrisikos einen unabhängigen Prognosefaktor darstellen (Ho et al., 2009).

Die prognostische Relevanz der *MLL-PTD*-Mutationen ist noch nicht eindeutig. In der Mehrzahl war das Vorkommen einer *MLL*-Mutation bei Erwachsenen mit einem schlechteren Endergebnis assoziiert (Whitman et al., 2007).

Für eine niedrige Expression der Mutation des WT1-Gens wird eine günstige Prognose diskutiert. Eine hohe Expression bei normalem Karyotyp scheint mit einer ungünstigen Prognose einherzugehen (Miyagawa et al., 1999; Trka et al., 2002).

Die Mutationen des c-KIT-Rezeptor Gens zeigten bisher keine prognostische Bedeutung für die kindliche AML (Radhi et al., 2010).

Weitere Mutationen sind: *NRAS*, *KRAS*, *PTPN11*, *RUNX1* und *TP53*. Bisher werden diese Mutationen in der Risikostratifizierung nicht verwendet und ihre prognostische Bedeutung ist derzeit noch unklar (Marcucci et al., 2011).

1.1.8.4 Epigenetische Risikofaktoren

Eine weitere Rolle als Risikofaktoren scheinen Aberrationen epigenetisch modifizierender Gene in der DNA-Methylierung und Histon-Modifikation zu spielen. Dazu gehören die Ten-Eleven Translokation 2 (TET2), Isocitratdehydrogenase 1 (IDH1), Isocitratdehydrogenase 2 (IDH2), Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2), DNA (Cytosin-5)-Methyltransferase 3 Alpha (DNMT3A) und Additional Sex Combs-like-1 (ASXL1).

Zum jetzigen Zeitpunkt sind sie aufgrund ihres seltenen Vorkommens in der kindlichen AML in der Routinediagnostik nicht etabliert (Valerio et al., 2014).

1.1.8.5 Krankheitsbezogene Prognosefaktoren

Aufgrund der Heterogenität der AML liegt ein unterschiedliches Therapieansprechen einzelner AML Subtypen vor.

In den AML-BFM Studien 1998/2004 wird zwischen einer Standard- und einer Hochrisikogruppe unterschieden. Der Standardrisikogruppe wird die AML t(15;17)(q22;q12) zugeordnet, welche seit der Einführung der Differenzierungsinduktion mit all-trans-Retinsäure (ATRA) eine sehr günstige Prognose mit einem pOS von über 93% ± 5% hat. Des Weiteren wird die AML bei Down-Syndrom in der Standardrisikogruppe geführt, wobei für diese Form der AML Sonderregeln hinsichtlich der Therapie, Intensität und Durchführung gelten. Die akuten myeloischen Leukämien mit der Zytogenetik t(8;21) und inv(16) begannen ebenfalls im Standardrisikoarm und wurden je nach Therapieansprechen an Tag 15 (Blasten <5%) in diesem weitergeführt oder in die Hochrisikogruppe stratifiziert. Insgesamt liegt das pOS der AML FAB M1 bei 56% ± 4%, wobei Patienten mit Nachweis von Auerstäbchen oder einer t(8;21) und gutem initialen Therapieansprechen eine günstigere Prognose haben (Reinhardt et al., 2004).

Die anderen akuten myeloischen Leukämien wurden in den AML-BFM Studien 98/2004 von Therapiebeginn an im Hochrisikoarm geführt. Die Prognose dieser Gruppe variiert abhängig von der jeweiligen Genetik, extramedullären Leukämiemanifestationen und bei

schlechtem initialen Therapieansprechen deutlich. Daher liegt in dieser Gruppe das pOS bei $54\% \pm 3\%$.

1.2 Minimale Resterkrankung (minimal residual disease, MRD)

Die minimale Resterkrankung ist definiert als das Vorkommen leukämischer Zellen in submikroskopischen Bereichen im Knochenmark von Patienten, bei denen zytomorphologisch zum selben Zeitpunkt keine leukämischen Blasten nachweisbar sind. Man unterscheidet die MRD, die sich im Verlauf des Ansprechens auf die ersten Behandlungszyklen kinetisch nachweisen lässt, von der MRD, die zu einem unbekanntem Zeitpunkt nachweisbar ist, bevor eine offene Rezidivkrankung diagnostiziert werden kann. Die erste Form kann in die zweite übergehen.

Der Nachweis der minimalen Resterkrankung im Verlauf der ersten Behandlungszyklen gilt als wesentlicher prognostischer Faktor bei der AML und entwickelt sich zu einem entscheidenden Parameter für eine optimierte risikoadaptierte Therapiestratifizierung (Campana, 2010; Kern et al., 2008; Ossenkoppele et al., 2011; Rizzari et al., 2011; van Rhenen et al., 2007; Varma und Naseem, 2011; Xu et al., 2013). Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass das Vorhandensein residueller leukämischer Zellen im Verlauf der Induktionstherapie mit einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit und einer schlechteren Prognose einhergeht (Kern und Haferlach, 2005; Mandrell und Pritchard, 2006; Sievers et al., 2003; van der Velden et al., 2010). Dies betrifft nicht nur den Zeitpunkt nach der Induktionstherapie, sondern den gesamten Therapieverlauf einschließlich vor einer geplanten Stammzelltransplantation (SZT). Patienten mit einer MRD vor SZT haben somit gleichfalls eine höhere Rezidivwahrscheinlichkeit und eine schlechtere Prognose (Walter et al., 2011; Walter et al., 2014). Nichtsdestotrotz wird die MRD vermehrt zur Indikationsstellung einer SZT im Verlauf herangezogen (Hasle, 2014). Sievers et al. beschreiben den Nachweis von leukämischen Blasten nach der Induktionstherapie mittels der Durchflusszytometrie als den stärksten unabhängigen prognostischen Faktor hinsichtlich eines schlechten Verlaufes. Die Ergebnisse der Studien legen nahe, dass eine Reduzierung der minimalen Resterkrankung durch eine frühzeitige Therapieintensivierung die ungünstige Prognose der minimalen Resterkrankung verringert (Campana, 2010). Aufgrund der Heterogenität der AML konnten bislang noch keine allgemein gültigen und anwendbaren Grenzwerte definiert werden (Xu et al., 2013). In der Studie der Children's cancer group von 2003 wird die Nachweisgrenze bei 0,5% Blasten mit aberranten Oberflächenantigenen festgelegt. Des Weiteren variieren die Zeitpunkte während der Therapie, an denen die Untersuchungen des Knochenmarks und des peripheren Blutes durchgeführt werden. Am häufigsten wird eine Untersuchung des MRD-Levels nach der

Induktionstherapie durchgeführt. Einige Studiengruppen untersuchen das Knochenmark zusätzlich im weiteren Therapieverlauf nach der Konsolidierung (Buccisano et al., 2009; Langebrake et al., 2006; Mandrell und Pritchard, 2006; Sievers et al., 2003).

Der Nachweis von Blasten während der Induktionstherapie erfolgt mittels der morphologischen Begutachtung, wobei bei dieser Methode die Nachweisgrenze bei 5% Blasten liegt (Mandrell und Pritchard, 2006). Molekularzytogenetische Methoden mit höherer Sensitivität werden ebenfalls häufig eingesetzt (Kern et al., 2010; Reinhardt et al., 2012).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vorrangig mit der Immunphänotypisierung, da trotz einer hohen Sensitivität der PCR-Analyse (Polymerase-Kettenreaktion-Analyse) die AML-spezifischen Marker derzeit bei nur zirka 60% der Patienten vorhanden sind (Grimwade et al., 2016; Ivey et al., 2016; Kern et al., 2010). Demgegenüber wird hinsichtlich der multiparametrischen Immunphänotypisierung ein Vorkommen von leukämieassoziierten Immunphänotypen bei etwa 90-94% der Patienten diskutiert (Al Mawali et al., 2008; Campana, 2010; Mandrell und Pritchard, 2006; Ossenkoppele et al., 2011). Die Sensitivität der Immunphänotypisierung ist mit 10^{-3} - 10^{-5} geringer, was vor allem darauf beruht, dass die Definition leukämischer Blasten aus der asynchronen Antigenexpression oder der Expression aberranter Antigene entsteht und dass nicht bei jeder AML ausreichend viele und eindeutige Parameter verfügbar sind (Al Mawali et al., 2008). Des Weiteren ist die Sensitivität abhängig von der Materialmenge, die bei Kindern häufig sehr beschränkt ist, insbesondere, wenn es sich um einen Punktionszeitpunkt handelt, an dem eine Aplasie des Knochenmarks vorliegt. Eine Einschränkung ergibt sich daraus, dass regenerative myeloische Blasten ebenfalls aberrante Antigenexpressionsmuster in geringer Konzentration aufweisen können (Campana, 2008).

Die Datenlage zur immunphänotypischen MRD-Untersuchung bei Kindern mit AML ist nach wie vor sehr limitiert. Voraussetzungen für die Vergleichbarkeit verschiedener Studienergebnisse sind die Standardisierung und die Vereinheitlichung der Methode sowie Definitionen bezüglich der Anwendbarkeit der Immunphänotypisierung zur frühen Diagnose eines Rezidivs. Ebenfalls beeinflussen unterschiedliche Therapiekonzepte die Ergebnisse der MRD-Analysen. Abhängig von den Studiengruppen wird MRD ab einem Vorkommen von 0,1% Zellen mit einem Leukämie assoziierten Immunphänotyp definiert (Campana 2010; Kern et al., 2008; van der Velden et al., 2010). In der in St. Jude durchgeführten AML02 Studie unterteilt Campana die minimale Resterkrankung in „low level“, was den Bereich 0,1% bis < 1% leukämischen Blasten umfasst und „high level“, bei dem die Grenze bei $\geq 1\%$ liegt (Campana, 2010). Es scheint, als hätten Patienten mit $\geq 1\%$ leukämischer Blasten unter der Therapie ein höheres Risiko, ein Rezidiv zu erleiden

als Patienten mit einer „low level“ MRD (Campana, 2010). Des Weiteren wird diskutiert, ob die frühe Selektion von Patienten, die unter der Therapie detektierbare leukämische Blasten aufweisen, bei denen somit eine minimale Resterkrankung vorliegt, von einer zusätzlichen Therapieintensivierung oder einer Stammzelltransplantation in erster CR profitieren könnten (Mandrell und Pritchard, 2006; Sievers et al., 2003). Aus diesem Grund ist die standardisierte immunphänotypische Detektion der minimalen Resterkrankung in pädiatrischen klinischen Therapiestudien der AML von herausragender Bedeutung für die Stratifizierung (Kern et al., 2008; Miyagawa et al., 1999).

2 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Beantwortung folgender Fragen:

1. Wie verhalten sich die Ergebnisse der morphologischen Untersuchung an Tag 28 in Bezug zu den immunphänotypischen Ergebnissen an Tag 28?
2. Kann hinsichtlich der Blastenpopulationen zwischen regenerativen und leukämischen Blasten an Tag 28 unterschieden werden?
3. Hat die Beurteilung des Therapieansprechens bzw. das Vorliegen einer minimalen Resterkrankung an Tag 28 eine prognostische Relevanz?
4. Welche Bedeutung hat die Therapiestratifizierung an Tag 28 unter Zuhilfenahme der Morphologie und Immunphänotypisierung bei den nach 2006 behandelten Patienten?

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Patienten

In diese Untersuchung wurden insgesamt 952 Patienten aus der Therapiestudie AML-BFM 98 (n=463) und der Therapiestudie AML-BFM 2004 (n=489) aufgenommen. Vom 01.07.1998 bis 31.08.2009 konnten für 699 Patienten die Daten ausgewertet werden. In dem Zeitraum vom 01.01.2006 bis 31.08.2009 wurden 258 Patienten untersucht.

Ausgeschlossen wurden Kinder mit akuter Promyelozytenleukämie (n=41) sowie Kinder mit einer myeloischen Leukämie bei Down Syndrom (n= 120). Des Weiteren Kinder bei denen per Definition ein FrühTod (early death) (n=24) vorlag, d.h. Tod vor möglicher Beurteilung des Ansprechens oder innerhalb von 42 Tagen nach Therapiebeginn, sowie Patienten mit unvollständigen Daten (n=68) wie z.B. fehlende morphologische und immunologische Befunde an Tag 28, fehlende Informationen über den Therapieverlauf und das Resultat der Therapie.

3.1.1 Patientenauswahl für die morphologische Untersuchung an Tag 28

Eingeschlossen wurden 952 Patienten aus Deutschland und Österreich, die die Aufnahmekriterien der Therapiestudien AML-BFM 98 und 2004 erfüllten.

1. Einschlusskriterien der Therapiestudie AML-BFM 98
 - Alter: 0 – 18 Jahre
 - Bestätigte Diagnose einer primären AML durch das Referenzlabor
 - Schriftliches Einverständnis der Patienten und/oder der Sorgeberechtigten
 - Diagnosestellung zwischen dem 1.7.1998 – 30.06.2003
2. Ausschlusskriterien der Therapiestudie AML-BFM 98
 - Zweitmalignom
 - Myelosarkom
 - Eine Begleiterkrankung lässt keine Therapie zu
 - Vorbehandlung >14 Tage oder andere intensive Vorbehandlung
 - Ablehnung der Protokolltherapie durch den Patienten bzw. die Sorgeberechtigten
3. Einschlusskriterien der Therapiestudie AML-BFM 2004
 - Diagnosezeitraum 1.3.2004 – 01.12.2009
 - Alter: 0 – 18 Jahre
 - Bestätigte Diagnose einer primären AML durch das Referenzlabor

- Schriftliches Einverständnis der Patienten und/oder der Sorgeberechtigten
4. Ausschlusskriterien der Therapiestudie AML-BFM 2004
- Zweitmalignom
 - Eine Begleiterkrankung lässt keine Therapie zu
 - Vorbehandlung >14 Tage oder andere intensive Vorbehandlung
 - Ablehnung der Protokolltherapie durch den Patienten bzw. die Sorgeberechtigten
 - Schwangerschaft

3.1.2 Patientenauswahl für die durchflusszytometrische Untersuchung an Tag 28 nach Therapiebeginn

Das Knochenmark von 195 Patienten wurde mittels Immunphänotypisierung untersucht, von denen 3 Proben nicht beurteilbar waren.

3.2 Proben

Für die zytomorphologischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde natives, heparinisiertes Knochenmark verwendet, welches bei der Diagnosestellung und zu den Therapiezeitpunkten Tag 15, Tag 28 und Tag 42 - 56, gewonnen wurde (s. Kapitel 3.3.1, Abbildung 1)

3.3 Therapiestudie AML-BFM 1998

Die Therapiestudie AML-BFM 1998 war eine offene, multizentrische, randomisierte kooperative Studie zur Therapie und Therapieoptimierung der akuten myeloischen Leukämie bei Kindern. Der Therapieplan erstreckte sich auf eine Dauer von 1,5 Jahren und umfasste fünf Chemotherapieblöcke, eine Dauertherapie und eine prophylaktische oder therapeutische Radiotherapie.

Es wurden drei Randomisierungen durchgeführt:

Randomisation I: Gabe von G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)

Randomisation II: 6-wöchige Konsolidierung vs. Blocktherapie

Randomisation III: Schädelbestrahlung 12 Gy vs. 18 Gy

Ausnahmen: Patienten mit FAB M3 erhielten kein G-CSF und Patienten mit M.Down keine Schädelbestrahlung.

3.3.1 Therapieplan

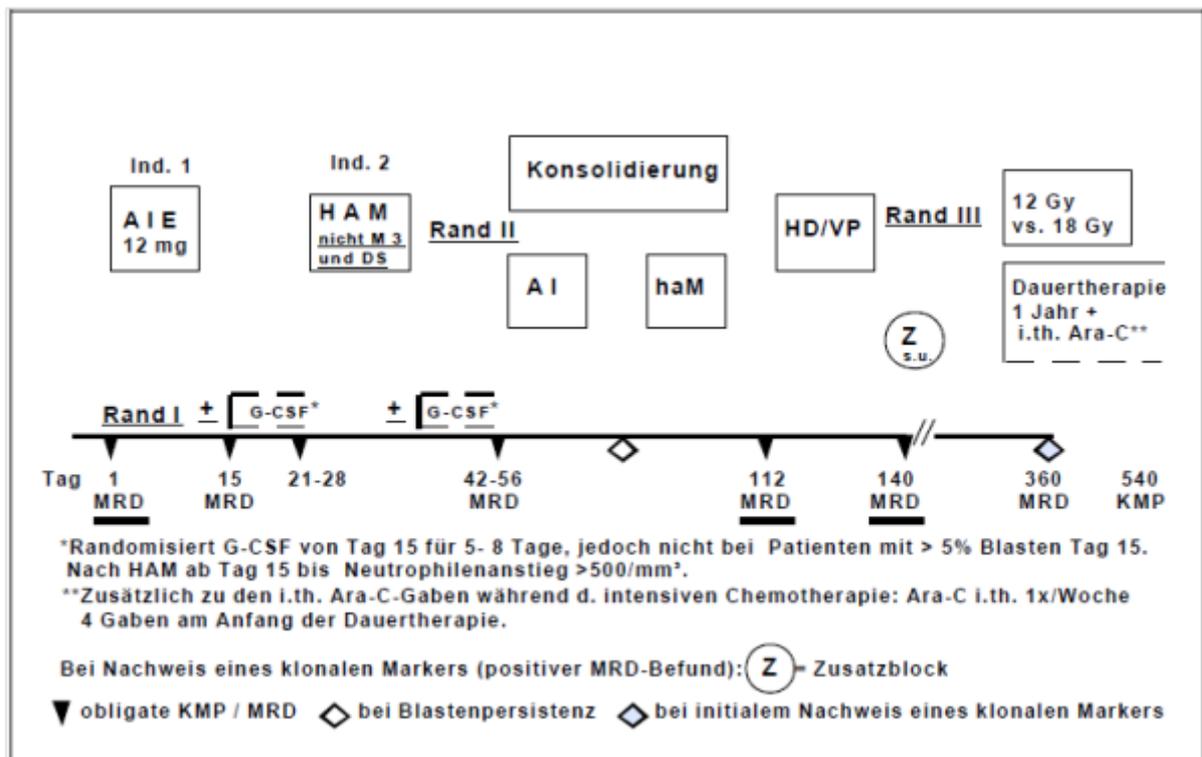


Abbildung 1 Übersicht Therapieplan AML-BFM 98

Die 1. Induktion erfolgte mit Cytarabin (A), Idarubicin (I) und Etoposid-Phosphat (E) zur Reduktion der leukämischen Blasten, siehe Abbildung 1.

Abhängig vom Allgemeinzustand, der Regeneration der Hämatopoese und der Anzahl der Blasten im Knochenmark erhielten die Patienten die Intensivierung mit Hochdosis-Cytarabin (HA) und Mitoxantron (M) ab Tag 15 oder Tag 28.

Die Konsolidierung erfolgte 4 Wochen nach Beginn der 2.Induktion entweder mit der Gabe von Prednisolon, Thioguanin, Vincristin, Idarubicin, Cyclophosphamid und Cytarabin über 6 Wochen oder als Blocktherapie. Als Blöcke wurden Cytarabin (A) und Idarubicin (I) gegeben, gefolgt von Hochdosis-Cytarabin (ha) und Mitoxantron (M). Die Patienten der Standardrisikogruppe erhielten alle 2-4 Wochen nach der Konsolidierung einen Intensivierungsblock mit Hochdosis-Cytarabin (HA) und Etoposid-Phosphat (E). Patienten der Hochrisikogruppe mit >5% Blasten vor der Stammzelltransplantation (SZT) erhielten diesen Intensivierungsblock ebenfalls.

Die prophylaktische Schädelbestrahlung erfolgte nach der Randomisierung mit 12 oder 18 Gy und bei Patienten im Alter von 1-2 Jahren mit 12 oder 15 Gy.

ZNS-negative Patienten erhielten 12x Cytarabin intrathekal zu folgenden Zeitpunkten: initial an Tag 0 und Tag 8 der Induktion, an Tag 6 von Block HAM (Hochdosis Cytarabin und Mitoxantron) und während der Konsolidierung an Tag 1, 15, 19 und 43 sowie im

Block AI an Tag 0 und Tag 6 und während des haM-Blockes (mittelhochdosiertes Cytarabin und Mitoxantron) an Tag 6 und 15. Im Zeitraum der Intensivierung an Tag 6 und in der Bestrahlung an Tag 1, 8, 15 und 22. Patienten mit primärem ZNS-Befall erhielten eine Bestrahlung mit 18 Gy und initial intrathekale Cytarabingaben in wöchentlichen Abständen bis einmal über die Liquorsanierung hinaus (mind. 3-malige Gabe).

Die Dauertherapie begann nach der Regeneration des Knochenmarks nach dem letzten Chemotherapieblock etwa 4 Wochen nach Ende der Intensivtherapie und sah die Gabe von 6-Thioguanin und Cytarabin über 12 Monate vor.

Eine Indikation zur allogenen HLA-identischen Stammzelltransplantation (SZT) bestand bei Patienten der Hochrisikogruppe mit identischem Geschwisterspender. Die SZT erfolgte in 1.CR nach der 6-wöchigen Konsolidierung (AI und haM).

3.3.2 Risikoeinteilung

In die Standardrisikogruppe wurden alle Patienten mit AML FAB M3/t(15;17), AML FAB M1/2 mit Auerstäbchen, AML FAB M4eo sowie AML mit t(8;21) und AML mit inv(16) stratifiziert. Bei einem Nachweis von $\geq 5\%$ Blasten an Tag 15 erfolgte die Umgruppierung in die Hochrisikogruppe (ausgenommen AML FAB M3/t(15;17)).

Alle anderen Patienten wurden der Hochrisikogruppe zugeteilt. Die Risikogruppen unterschieden sich in der Therapieempfehlung hinsichtlich der Indikation zur Stammzelltransplantation (SZT).

3.4 Therapiestudie AML-BFM 2004

Die Therapiestudie AML-BFM 2004 war eine offene, multizentrische, randomisierte, kooperative Studie zur Therapie und Therapieoptimierung der akuten myeloischen Leukämie bei Kindern. Die reguläre Therapie umfasste die Induktion, Konsolidierung, Intensivierung und Dauertherapie sowie eine prophylaktische Radiotherapie.

Abhängig von der Risikostratifizierung sah man für die Patienten in der Standardrisikogruppe etwa 17 Monate und für die Patienten in der Hochrisikogruppe etwa 19 Monate Therapiedauer vor. Es wurden drei Randomisierungen durchgeführt. Der Plan der Studie entsprach einem dreifaktoriellen Parallelgruppendesign.

Die 1. Randomisierung [ARA-C (A), liposomales Daunorubicin (Dx) und Etoposid-Phosphat (E) vs. ARA-C (A), Idarubicin (I) und Etoposid-Phosphat (E)] erfolgte für alle Protokollpatienten. Die 2. Randomisierung [ARA-C (A), Idarubicin (I)/2-Chloro-2-

Desoxyadenosin (2-CDA)vs ARA-C (A), Idarubicin (I)] galt nur für die Patienten der Hochrisikogruppe und erfolgte vor der 2. Induktion. Die 3. Randomisierung erfolgte nach der Konsolidierung und betraf die Schädelbestrahlung zu Beginn der Dauertherapie 12 Gy vs. 18 Gy. Von der dritten Randomisierung waren Patienten mit einer initialen ZNS-Beteiligung ausgeschlossen.

3.4.1 Therapieplan

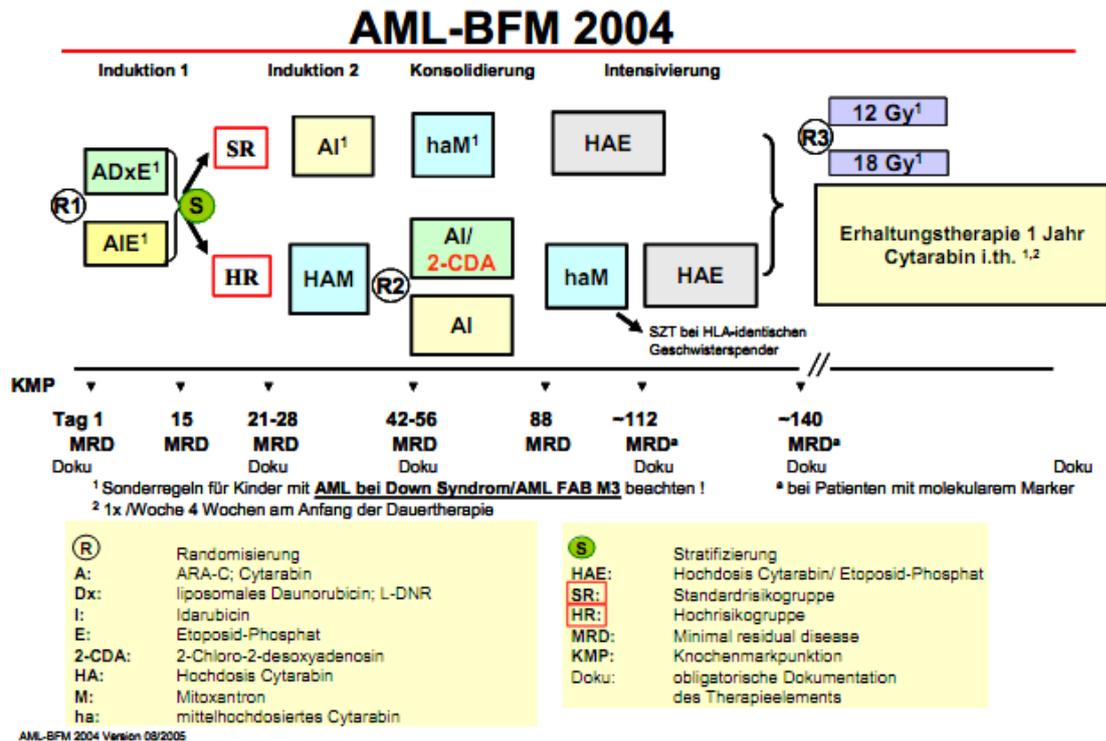


Abbildung 2

Therapieplan AML-BFM Studie 2004

Ausgenommen Patienten mit einer AML bei M.Down oder AML FAB M3

Patienten mit einer primären Leukozytenzahl >50.000/µl oder erheblichen Organvergrößerungen sowie mit schweren Infektionen und eingeschränkter kardialer Funktion erhielten eine Vortherapie mit 6-Thioguanin (40 mg/m²/d p.o.), Cytarabin (40 mg/m²/d s.c. oder i.v.) und optional Hydroxyurea über maximal 7 Tage.

Bei Hyperleukozytose >100.00/µl wurde die Gabe von Rasburicase und eine Austauschtransfusion oder Leukapherese empfohlen. Die initiale Lumbalpunktion wurde erst nach ausreichender Blastenreduktion durchgeführt.

Während der achttägigen Induktion wurden die Wirkstoffe ARA-C (A), liposomales Daunorubicin (Dx) und Etoposid-Phosphat (E) oder ARA-C (A), Idarubicin (I) und Etoposid-Phosphat (E) gegeben.

Nach hämatopoetischer Regeneration (Granulozyten $\geq 1.000/\mu\text{l}$, Thrombozyten $\geq 80.000/\mu\text{l}$ im peripheren Blutbild) und in gutem Allgemeinzustand folgte für die Patienten der Standardrisikogruppe die Intensivierung mit ARA-C (A) und Idarubicin (I). Die Patienten der Hochrisikogruppe erhielten Hochdosis-Cytarabin (HA) und Mitoxantron (M).

In gutem Allgemeinzustand und nach hämatopoetischer Regeneration folgte für die Patienten der Hochrisikogruppe zur Konsolidierung je nach Randomisierung die Gabe von ARA-C (A), Idarubicin (I)/2-Chloro-2-Desoxyadenosin (2-CDA) oder ARA-C (A) und Idarubicin (I). Vier Wochen nach Beginn der Konsolidierung erhielten sowohl die Standard- als auch die Hochrisikogruppe mittelhochdosiertes Cytarabin (ha) und Mitoxantron (M).

Die Patienten ohne Transplantationsindikation erhielten 2 – 4 Wochen nach dem Konsolidierungsblock haM den Intensivierungsblock HAE mit HD-Cytarabin und Etoposid-Phosphat, sobald sie die Voraussetzungen (guter Allgemeinzustand, Infektionsfreiheit und ein peripheres Blutbild mit Granulozyten $> 1.000/\mu\text{l}$, Thrombozyten $> 80.000/\mu\text{l}$) erfüllten.

Patienten ohne Blastennachweis im ZNS erhielten 11 bzw. 12x Cytarabin i.th. in altersabhängiger Dosis zu folgenden Zeitpunkten: Initial an Tag 1 der 1. Induktion, an Tag 1 der 2. Induktion zu Beginn des Blockes HAM, Tag 1 und Tag 6 der Konsolidierung und in der Intensivierung Tag 1 des Blockes HAE sowie während / nach der ZNS-Bestrahlung an den Tagen 1, 8, 15 und 22.

Die prophylaktische ZNS-Bestrahlung erfolgte nach der Randomisierung in die Arme 12 Gy oder 18 Gy bzw. bei Patienten im Alter von 1 $\frac{1}{4}$ bis 2 Jahren in die Arme 12 Gy oder 15 Gy.

Patienten mit Blastennachweis im ZNS im Alter von 1 $\frac{1}{4}$ bis 2 Jahren erhielten eine ZNS-Bestrahlung mit 15 Gy. Patienten im Alter ≥ 2 Jahre erhalten eine ZNS-Bestrahlung mit 18 Gy. Ausgenommen sind Patienten mit geplanter SZT.

Die therapeutische Behandlung bei primärem ZNS-Befall sah die zusätzlichen intrathekalen Gaben von Cytarabin in wöchentlichen Abständen vor. Diese Gaben erfolgten bis einmal über die Liquorsanierung hinaus.

Die 12-monatige Dauertherapie begann bei ausreichenden Leukozyten- und Thrombozytenwerten 4 Wochen nach der Intensivierung mit Thioguanin und HD-Cytarabin/Etoposid-Phosphat parallel zur ZNS-Bestrahlung.

Eine Indikation zur allogenen Stammzelltransplantation bestand bei den Patienten mit einer refraktären AML. Definitionsgemäß Patienten mit de novo AML, bei denen nach der 2. Induktion (HAM) $\geq 5\%$ Blasten im Knochenmark nachweisbar waren oder die 6 Wochen nach Beendigung der 2. Induktion in anhaltender Aplasie blieben. Die Patienten sollten vor

der SZT eine komplette Remission (CR) oder eine partielle Remission (CRp) erreichen. Nur in Einzelfällen wurde eine SZT in Aplasie erwogen.

3.4.2 Risikoeinteilung

Für alle Patienten (ab dem 01.06.2007; ausgenommen Patienten mit Down-Syndrom) galt die erste Randomisierung mit den Therapieblöcken AIE vs. ADxE.

Patienten mit AML bei Down Syndrom wurden bis zum 01.06.2007 im Standardrisikoarm geführt. Nach einem zusätzlichen Amendment der Studie erfolgte keine Randomisierung für die erste Induktion mehr und die betreffenden Patienten wurden mit einer reduzierten Therapie behandelt.

Die Stratifizierung in die Standard- oder Hochrisikogruppe erfolgte erst nach der ersten Induktion. In die Standardrisikogruppe wurden folgende Patienten eingeschlossen: Patienten mit AML FAB M3 oder/und t(15; 17), Patienten mit AML FAB M1/2 mit Auerstäbchen und/oder t(8; 21), Patienten mit AML FAB M4eo oder/und inv(16).

Bei Nachweis einer FLT-3-ITD Mutation oder $\geq 5\%$ Blasten an Tag 15 erfolgte die Umgruppierung in die Hochrisikogruppe (ausgenommen AML FAB M3 und AML bei Down Syndrom). Die Patienten mit einer AML FAB M0, M1/2 ohne Auerstäbchen, M4, M5, M6 und M7 wurden der Hochrisikogruppe zugeteilt.

3.5 Knochenmarkpunktionen/Zeitpunkte

Die Knochenmarkpunktionen zur Diagnosestellung und Remissionsbeurteilung erfolgten bei den Therapiestudien AML-BFM 1998 und AML-BFM 2004 zu festgelegten Zeitpunkten. Der Zeitpunkt der Diagnosestellung und des Therapiebeginns (Tag 0) fielen in der Regel zusammen. Es folgten KM-Punktionen an Tag 15 nach Therapiebeginn und vor dem Therapieblock AI/HAM (Tag 21 bis 28) zur Beurteilung des Therapieansprechens. Die weiteren KM-Punktionen erfolgten jeweils vor den nachfolgenden Therapieblöcken. Das entsprach Tag 42 bis 56 vor der Konsolidierung und Tag 88 und 112 vor der Intensivierung (vor haM oder HAE) zur Beurteilung und Dokumentation des Remissionsstatus.

Im Falle einer Therapieverzögerung aufgrund des schlechten Allgemeinzustandes eines Patienten erfolgte die Zuordnung der KMP-Zeitpunkte anhand der Therapieblöcke.

3.6 Morphologie

Die morphologische Untersuchung und Befunderhebung erfolgte bis zum 31.08.2005 im Referenzlabor der Universitätsklinik Münster und ab dem 01.09.2005 durch das hämatologische Referenzlabor der Kinderklinik der Medizinischen Hochschule Hannover.

Die Beurteilung von Blut- und Knochenmarkausstrichen erfolgte in der panoptischen Färbung nach Pappenheim (kombinierte May-Grünwald-Färbung) mit Auszählung von mindestens 200 Zellen und Berechnung des Anteils leukämischer Blasten sowie zusätzlich in verschiedenen zytochemischen Färbungen.

Die zytomorphologische Beurteilung erlaubte die Beschreibung und Differenzierung der malignen und der gesunden Zellen.

3.7 Durchflusszytometrie

Die immunologische Untersuchung wurde an einem FACS Cytomics FC 500 5-Farben-Durchflusszytometer (Beckman Coulter) durchgeführt, und mit der CXP Software Version 2.1, einem Programm zur Darstellung und Analyse von im FACS gewonnenen Daten (Becton & Dickinson San Jose CA., USA) bis zum 31.08.2005 im Referenzlabor der Universitätsklinik Münster und ab dem 01.09.2005 durch das hämatologische Referenzlabor der Kinderklinik der Medizinischen Hochschule Hannover analysiert.

Die multidimensionale Durchflusszytometrie ist ein optisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung und molekularen Charakterisierung intakter Zellen. Bei der Probenaufbereitung wird eine definierte Anzahl zu untersuchender suspendierter Zellen mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern versetzt. Diese binden spezifisch an membranständig exprimierte oder intrazelluläre Antigene. Die Nomenklatur der monoklonalen Antikörper beruht auf der Nummerierung jener Antigene (cluster designation/differentiation: CD), die von ihnen erkannt werden. Die gemessene Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur quantitativen Expression des zu bestimmenden Antigens auf der Zelle. Neben diesen biochemischen Parametern werden auch Informationen über die physikalischen Eigenschaften der Zellen erhoben. Die Zellgröße korreliert mit dem Vorwärtsstreulicht (forward scatter: FSC) und die Granularität mit dem Seitwärtsstreulicht (side scatter: SSC).

Somit ist es möglich, anhand der Kombination von Zellgröße, -granularität und Antigenexpression alle Reifungsstadien der im Knochenmark vorhandenen Zellen zu identifizieren. Die durchflusszytometrische Untersuchung einer gesunden KM-Probe zeigt in der FSC/SSC-Darstellung drei Populationen: die homogene Population der ungranulierten und relativ kleinen Lymphozyten, die ebenfalls kleine und homogene Population der gering granulierten und größeren Monozyten und die große Population der stark granulierten und großen bis sehr großen Granulozyten.

Die Anzahl der gemessenen Zellen pro Untersuchung wurde mit 100.000 Zellen eingestellt und betrug durch eine zeitliche Begrenzung der Untersuchung bei einer sehr zellarmen Probe minimal 30.000 Zellen.

3.7.1 Probenaufbereitung

3.7.1.1 Materialien

- Röhrchen 5ml (Sarstedt, Art.-Nr.55.1578, Polypropylen)
- VersaLyse Lysing Solution (BeckmanCoulter, IM3648)
- IO Test 3 Fixative Solution (Beckman Coulter, IM3515)
- IntraPrep™ Permeabilization Reagent (Beckman Coulter, IM2389)
- Flow-Count™ Fluorospheres (Beckman Coulter, 7547053)
- PBS-Puffer (Apotheke)
- Antikörper

Tabelle 3
Zusammenstellung der verwendeten Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller	Klon	Bestell-Nr.
CD2	FITC	Beckman C.	39C1.5	A07743
CD7	PE	Beckman C.	8H8.1	IM1429U
CD13	FITC	Beckman C.	SJ1D1	IM0778U
CD15	FITC	Beckman C.	80H5	IM1423U
CD19	FITC	Beckman C.	J3.119	A07768
CD33	APC	Beckman C.	D3HL60.251	IM2471
CD34	PC7	Beckman C.	581	A21691
CD38	FITC	Beckman C.	T16	A07778
CD56	PE	Beckman C.	N901	A07788
CD117	PE	Beckman C.	104D2D1	IM2732
CLL-1	PE	Aliquot über Rotterdam	CR 2357	-----
CXCR4	PE	Beckman C.	SJ1D1	IM0778U

Tabelle 4
Konsensuenspanel der AML-BFM Studie an Tag 28

Tubes	Vormischung	FITC	PE	APC	PC7
1	Tag 28	CD38	CLL-1	CD33	CD34
2	Tag 28	CD19	CD56	CD33	CD34
3	AML	CD2	CD7	CD33	CD34
4	AML	CD15	CD117	CD33	CD34
5	Tag 28	CD13	CXCR4	CD33	CD34

3.7.1.2 Probenvorbereitung und Messung

Das Ansetzen der Vormischungen erfolgte mit je 100µl FITC, 100µl PE , 50µl APC und 50µl PC7.

Zur Bestimmung von Oberflächenantigenen wurden 15µl der Antikörper-Vormischung zu 50-100µl einer Knochenmarkprobe oder peripheren Blutprobe pipettiert und anschließend mit einem Vortex-Gerät homogen gemischt.

Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur wurden pro Röhrchen 1ml der VersaLyse Lösung und 25µl IO Test 3 Fixative Solution hinzugegeben. Die Flüssigkeiten wurden erneut gemischt, 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend bei 1200U/min für 5 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zellen in 2ml PBS-Puffer (pH 7,4) resuspendiert und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 1ml PBS-Puffer aufgenommen.

Zur Bestimmung intrazellulärer Antigene wurden 50-100µl der Knochenmarkprobe mit 100µl Reagenz 1 versetzt, gemischt und bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss 15 Minuten inkubiert. Nach Zusatz von 4ml PBS-Puffer wurden die Proben bei 1200U/min für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit dekantiert. Zu diesem Zellpellet wurden 100µl Reagenz 2 gegeben und vorsichtig mit der Pipette vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden jeweils 10µl der Antikörper entsprechend dem Panel pipettiert und erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zusatz von 4ml PBS-Puffer wurden die Proben bei 1200U/min für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und 500µl PBS-Puffer hinzugegeben.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 15µl der Antikörper-Vormischung zu 50-100µl einer Knochenmarkprobe oder peripheren Blutprobe pipettiert und anschließend mit einem Vortex-Gerät homogen gemischt.

Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur wurden pro Röhrchen 1ml der VersaLyse Lösung und 25µl IO Test 3 Fixative Solution hinzugegeben. Die Flüssigkeiten wurden erneut gemischt, 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und anschließend das gleiche Volumen an FlowCount Fluorospheres zugegeben wie an Probenvolumen angesetzt wurde. Um Zellverluste zu vermeiden wurden diese Röhrchen nicht gewaschen.

Die immunologische Untersuchung der Knochenmarkproben erfolgte an einem Cytomics FC500 (Fa. Beckman-Coulter). Das beschriebene Antikörperpanel wurde zu dem Untersuchungszeitpunkt Tag 28 bei jedem untersuchten Patienten vollständig angewandt.

3.7.2 Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchung

Die Auswertung der durchflusszytometrischen Untersuchung erfolgte mit Hilfe der CXP Software Version 2.1 für FC 500 Systeme von Beckman-Coulter.

Die Vitalität der verwendeten KM-Probe wurde durch den Anteil an Syto-16-positiven Zellen bestimmt. Die markierten Zellen wurden nun in die Forward Scatter/Side Scatter-Darstellung übertragen. Die als nicht vitale Zellen identifizierten events wurden für die Auswertung der weiteren LAIP ausgeschlossen. In der Forward Scatter/Side Scatter-Darstellung wurden die vitalen CD 33/CD34-positiven Zellen markiert, und als Gate für die weiteren Antikörperkombinationen gesetzt. Abgrenzbare Zellpopulationen wurden wiederum markiert und auf die typische Lage für Blasten, d.h. in ihrer Granularität zwischen Lymphozyten und Granulozyten und in ihrer Größe zwischen Lymphozyten und Monozyten hin überprüft. Bei aberrantem Vorliegen von Stammzellantigenen (CD 34, CD 117) und reifen myeloischen Markern (CD 13, CD 15, CD 15low, CD 33, CD 65w) bzw. aberranten immunologischen Markern (CD 2, CD 4low, CD 7, CD 19, CD 56) wurden die Zellen als leukämische Blasten gewertet (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5
AML Subtypen und ihre Antikörperexpression

Subtypen	Myeloische Antigene	Stammzellantigene	Aberrante lymphatische Antigene	Besonderheiten
AML FAB M0	CD13, CD 33	CD 34	CD 7	
AML FAB M1	CD13, CD 15low, CD 33	CD 34, CD 117	CD 7, CD 56	
AML FAB M2	CD 13, CD 15, CD 33	CD 34, CD 117	CD 56, CD 19	
AML FAB M3	CD 13, CD 15, CD 33	CD 117±		HLA-DR negativ
AML FAB M4	CD 13, CD 14, CD 15, CD33, CD65w	CD 34±, CD 117±	CD 7, CD 56	moAB 7.1
AML FAB M4eo	CD 13, CD 14, CD 15, CD 33, CD 65w	CD 34±, CD 117±	CD 2, CD 56	
AML FAB M5 - monoblastär - monozytär	CD 13, CD 14, CD 15, CD 33, CD 65w	CD 34±	CD 56, CD 4low	moAB 7.1
AML FAB M6	CD 13, CD 15low, CD 33	CD 34±, CD 117±	CD 7, CD 56	CD 36 Glykophorin A
AML FAB M7	CD 13, CD 15low, CD 33	CD 34±, CD 117±	CD 7	CD 36, CD41, CD 42b, CD 61

Bei Fehlen aberranter Antigene, nicht aberrantem Vorliegen der Stammzellantigene CD 117 und CD 34 sowie CD 38 als Antigen für Proliferation und reifer myeloischer Marker und bei Abgrenzung zum initialen Expressionsmuster wurden die Blasten als regenerativ gewertet.

3.8 Definitionen

Tag 28

KM-Punktion vor der 2. Induktion bzw. dem Therapieblock AI/HAM zur Beurteilung des Therapieansprechens.

MRD

Minimale Resterkrankung. MRD positiv bei Vorliegen von > 5% leukämischen Blasten in der Morphologie und/oder einem immunphänotypischen Blastennachweis > 2%. MRD negativ bei \leq 5% Blasten und/oder \leq 2% Blasten in der Immunphänotypisierung.

Leukämische Blasten im FACS

Das Vorliegen von Stammzellantigenen zusätzlich zu mindestens 2 reifen myeloischen bzw. aberranten lymphatischen immunologischen Markern.

Regenerative Blasten im FACS

Nachweis der Stammzellantigenen CD 117, CD 34.

CD 38 Antigen für Proliferation sowie Abgrenzung zum initialen Expressionsmuster. Ein wichtiges weiteres Kriterium ist das Fehlen aberranter lymphatischer Antigene.

Frühtod, ED (early death)

Tod vor möglicher Beurteilung des Ansprechens, innerhalb von 42 Tagen nach Therapiebeginn.

ED vor Tag 15

Todesfall vor Therapiebeginn oder vor Tag 15, wenn noch kein Therapieansprechen bestimmbar ist.

Partielle Remission (PR/CRp)

Regenerierendes oder normozelluläres KM mit \leq 5% Blasten, im peripheren Blut >500 Granulozyten/ μ l und \geq 20.000 Thrombozyten/ μ l und kein Organbefall nachweisbar.

Komplette Remission (CR)

Regenerierendes oder normozelluläres KM mit \leq 5% Blasten, im peripheren Blut \geq 1000 Granulozyten/ μ l und \geq 50.000 Thrombozyten/ μ l bzw. seit 08/2005 \geq 80.000 Thrombozyten/ μ l und kein Organbefall nachweisbar.

Nonresponder (NR)

Nichterreichen der Kriterien für eine CR bis Ende der Intensivierung oder bei Verlassen des Protokolls nach der 2. Induktion.

Rezidiv

Reinfiltration des KM mit >5% Blasten oder eindeutige leukämische Infiltration an anderer Stelle.

ZNS-Befall

≥5 Zellen/μl im Liquor, zirka 50% nachgewiesene Blasten im Zytospinpräparat und/oder intrakraniellen Infiltraten oder Retinabefall, respektive neurologische Ausfälle.

EFS (Event-free survival)

Das ereignisfreie Überleben (Event-free survival, EFS) ist die Zeit vom Datum der Diagnose bis zum ersten Ereignis (Rezidiv, Zweitmalignom, Tod ohne Berücksichtigung der Ursache) oder dem letzten Untersuchungsdatum.

Das pEFS stellt die Wahrscheinlichkeit, also das errechnete ereignisfreie Überleben dar.

OS (Overall survival)

Die Überlebenswahrscheinlichkeit beschreibt in Prozent, wieviele Patienten in einem definierten Zeitraum seit Diagnosedatum überlebt haben.

Das pOS stellt die errechnete Überlebenswahrscheinlichkeit dar.

CI (Cumulative incidence)

Die kumulative Inzidenz beschreibt summierte Häufigkeit für das Auftreten eines Rückfalls. In diesem Fall wird die kumulative Inzidenz für das Auftreten eines Rezidivs in einem festgelegten Zeitraum betrachtet.

3.9 Statistik

Das ereignisfreie Überleben (Event-free survival, EFS) ist die Zeit vom Datum der Diagnose bis zum ersten Ereignis (Rezidiv, Zweitmalignom, Tod ohne Berücksichtigung der Ursache) oder dem letzten Untersuchungsdatum. Nichterreichen der Remission (Nonresponder) bzw. der Tod vor Protokolltag 42 (Early death) wird als Ereignis am Tag 0 gewertet. Überlebenszeiten wurden nach der Kaplan-Meier-Methode berechnet. Mit dem log-rank Test wurden Unterschiede zwischen Patientengruppen geprüft. Kumulative Inzidenzen wurden mit der Methode von Kalbfleisch-Prentice berechnet und mit dem Gray's Test verglichen.

Multivariate Analysen von Überlebenszeiten wurden mittels Cox-Regression, univariate Analysen von qualitativen Variablen mit Chi-Quadrat oder Fisher's Test und die von quantitativen Variablen mit dem Test nach Wilcoxon durchgeführt.

Stichtag für die Auswertung war der 01.01.2013.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleich der morphologischen und immunologischen Auswertung an Tag 28

Es wurden 952 Kinder und Jugendliche in den deutschen AML-BFM Studien 1998 (n=463) und 2004 (n=489) eingeschlossen. Für den Zeitraum vom 01.07.1998 bis 31.08.2009 konnten für 791 Patienten die Daten hinsichtlich des Therapieansprechens an Tag 28 ausgewertet werden. Bei 92 Patienten waren die Daten unvollständig oder die Patienten starben vor Therapiebeginn (Early death), so dass für 699 Patienten morphologische Daten und für 192 Patienten immunologische Daten zu dem Tag 28 vorlagen. Somit konnte eine Gruppe von 192 Patienten hinsichtlich der Morphologie und Immunologie direkt verglichen werden (siehe Abbildung 3).

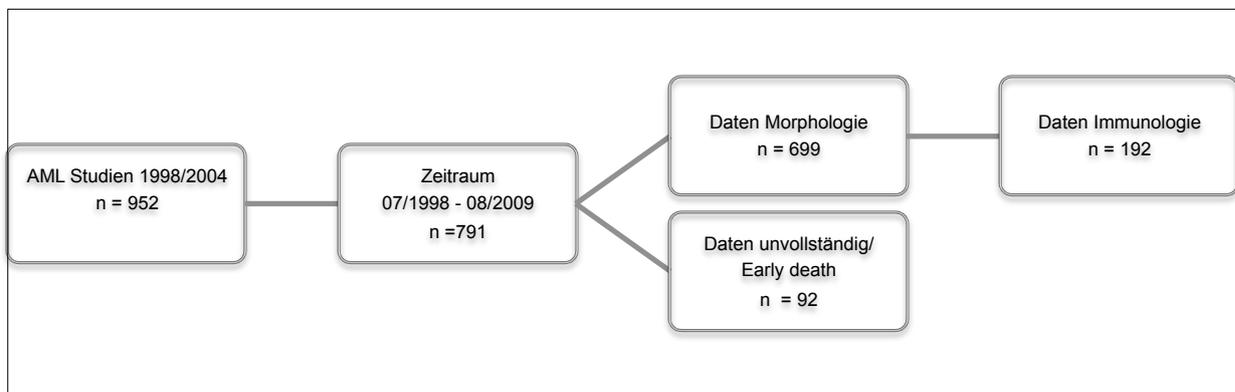


Abbildung 3

Flussdiagramm mit den Patientenzahlen der AML-BFM Studien 1998/2004

Bei der Gruppe der 192 Kinder der AML-BFM-Studien 1998 und 2004, bei der sowohl eine immunologische als auch morphologische Bestimmung der minimalen Resterkrankung möglich war, handelt es sich um eine repräsentative Patientengruppe hinsichtlich der Geschlechterverteilung, Alter bei Diagnose, Risikoeinteilung, initialer Leukozytenzahl und der FAB-Klassifizierung (siehe Tabelle 12 Anhang). Ausgenommen wurden Kinder mit Promyelozytenleukämie (FAB AML-M3) und Kinder mit Trisomie 21, die an einer AML erkrankten. Dies ist darin begründet, dass sich sowohl die akute Promyelozytenleukämie als auch die AML bei Trisomie 21 hinsichtlich des Therapieregimes und des Therapieansprechens deutlich von den anderen Subtypen unterscheiden und somit diese beiden Formen gesondert betrachtet werden sollten.

Tabelle 6

Initialdaten der Gesamtgruppe (n = 192) sowie Therapieansprechen an Tag 28 in der morphologischen und immunologischen Auswertung

	Gesamt		Pat. Morpho. + FACS gesamt		p	Tag 28 positiv in Morphologie und Immunologie						Tag 28 regenerativ in der Immunologie und negativ in Morphologie und Immunologie				p
	Alle Patienten		Alle Patienten Morpho. + FACS			Tag 28 Morph. >5%		Tag 28 FACS >2%		Morph.+ FACS positiv		Tag 28 FACS regenerativ		Tag 28 Morph.+ FACS negativ		
	N	%	N	%		N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Total	791	100	192	100		4	100	46	100	37	100	35	100	70	100	
Geschlecht					0,78											
Jungen	405	51,2	100	52,1		3	75,0	20	43,5	20	54,1	18	51,4	39	55,7	
Mädchen	386	48,8	92	47,9	1	25,0	26	56,5	17	45,9	17	48,6	31	44,3		
FAB					0,34											
M0	35	4,4	7	3,6		0	0	2	4,3	3	8,1	0	0	2	2,9	
M1	127	16,0	29	15,1		0	0	5	10,8	7	18,9	5	14,3	12	17,1	
M2	196	24,8	47	24,5		1	25,0	13	28,3	10	27	8	22,9	15	21,5	
M4 Eo-	96	12,1	18	9,4		1	25,0	5	10,9	3	8,1	2	5,7	7	10,0	
M4 Eo+	70	8,8	23	12,0		0	0	3	6,5	3	8,1	7	20,0	10	14,3	
M5	178	22,5	43	22,4		0	0	11	23,9	7	18,9	9	25,7	16	22,9	
M6	22	2,8	6	3,1		0	0	2	4,3	2	5,4	0	0	2	2,9	
M7	63	8,0	16	8,3	1	25,0	5	10,9	1	2,7	3	8,6	6	8,6		
Andere	4	0,5	3	1,6	1	25,0	0	0	1	2,7	1	2,9	0	0		
Initial. ZNS-Befall					0,98											
k.A.	17	2,1	4	2,1		0	0	0	0	2	5,4	1	2,9	1	1,4	
nein	683	86,3	166	86,5		4	100	37	80,4	31	83,8	31	88,6	63	90,0	
ja	91	11,5	22	11,5	0	0	9	19,6	4	10,8	3	8,6	6	8,6		
Organbeteiligung					0,25											
Nein	605	76,5	141	73,4		3	75,0	34	73,9	25	67,6	25	71,4	54	77,1	
ja	186	23,5	51	26,6	1	25,0	12	26,1	12	32,4	10	28,6	16	22,9		

Von den 192 Patienten waren 92 weiblichen und 100 männlichen Geschlechts. Bei 7 Patienten lag der AML Subtyp FAB M0 vor, bei 29 Patienten eine AML FAB M1, bei 47 Patienten eine AML FAB M2. Bei insgesamt 41 Patienten lag eine AML FAB M4 vor, davon hatten 23 eine M4eo. Insgesamt 43 Patienten waren von einer AML FAB M5 betroffen und 6 von einer AML FAB M6 sowie 16 von einer AML FAB M7. Bei 3 Patienten konnte kein Subtyp klassifiziert werden.

Bei 45% (n=87) der 192 Patienten wurden leukämische Blasten an Tag 28 bzw. nach der 1. Induktion mittels FACS und nachgewiesen. Insgesamt 37 Patienten zeigten morphologisch > 5% Blasten und gleichzeitig in der Immunphänotypisierung > 2% Blasten an Tag 28. Morphologie und Immunphänotypisierung zeigen eine sehr hohe positive gute Korrelation (Spearman Korrelationskoeffizient $r = 0,71$, $p < 0,0001$). Die Immunphänotypisierung erwies sich als sensitiver. Immunologisch konnten bei 46 Patienten (24%) > 2 % Blasten nachgewiesen werden, welche sich morphologisch nicht darstellten. Bei 4 Patienten (2%) fanden sich nur in der morphologischen Untersuchung > 5% Blasten ohne Nachweis in der Immunphänotypisierung. Bei 70 Kindern (36%) zeigte

sich weder immunphänotypisch noch morphologisch ein Nachweis von Blasten (siehe Tabelle 6).

Die 192 Patienten, für die sowohl morphologische als auch immunphänotypische Daten vorlagen, wurden mit der Gesamtgruppe (n=791) der Studien AML BFM 1998 und 2004 für den Zeitraum 07/1998 – 08/2009 verglichen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bzgl. des Geschlechtes, der Verteilung der FAB-Subtypen, des ZNS-Befalls oder der Organbeteiligung in den jeweiligen Gruppen (Tag 28 positiv, negativ oder regenerativ) im Vergleich zur Gesamtgruppe.

Innerhalb der untersuchten Gruppen (Tag 28 positiv, negativ oder regenerativ) war die Verteilung in den Risikogruppen signifikant unterschiedlich (siehe Tabelle 7). Dies ist u.a. durch die Stratifizierung zu erklären, die an Tag 15 und 28 vorgenommen wird. Als Konsequenz sind in der Hochrisikogruppe deutlich mehr Patienten mit Blastennachweis an Tag 28 zu finden (SR gegen HR, p=0,00526).

Tabelle 7

Vergleich der untersuchten Patientenkollektive untereinander bzgl. der Aufteilung in die Risikogruppen (SR = Standardrisikogruppe; HR = Hochrisikogruppe)

p = 0,00526	Tag 28 Alle		Tag 28 positiv		Tag 28 regenerativ		Tag 28 negativ	
	N	%	N	%	N	%	N	%
SR	66		20	30,3	18	27,3	28	42,4
HR	126		67	53,2	17	13,5	42	33,3

Des Weiteren fiel ein signifikanter Unterschied in der Molekular- und Zytogenetik auf. Die Verteilung der bei der Prognose als günstig geltenden Translokationen (t(8;21), t(15;17)) oder Inversion (inv16) unterschied sich in den einzelnen Patientengruppen. Dies ist ebenfalls in der Stratifizierung begründet (siehe 3.3.2 und 3.4.2 Risikoeinteilung). Somit ist es nachvollziehbar, dass in der Gruppe der Patienten mit positiven Blasten an Tag 28 weniger Patienten mit einem günstigen Prognosefaktor zu finden sind (siehe Tabelle 8). Ebenfalls erwähnenswert ist, dass die SR-Gruppe und die Patienten mit günstigen Prognosefaktoren prozentual den größten Anteil unter den Patienten mit regenerativen Blasten an Tag 28 aufweisen.

Tabelle 8

Vergleich der untersuchten Patientenkollektive untereinander bzgl. der Zytogenetik/Molekulargenetik.

*es lagen nicht für alle 192 Patienten Daten zur Zytogenetik/Molekulargenetik vor

p = 0,042	Tag 28 Alle*		Tag 28 positiv		Tag 28 regenerativ		Tag 28 negativ	
	N	N	%	N	%	N	%	
t (8;21), inv (16)	49	17	34,7	14	28,6	18	36,7	
other	124	63	50,8	17	13,7	44	35,5	

Die Altersverteilung innerhalb der Patientenkollektive unterscheidet sich nicht signifikant. Lediglich in der Gruppe der Patienten mit regenerativen Blasten an Tag 28 fällt auf, dass das Alter mit 4,8 Jahren im Median am niedrigsten liegt, was darauf hinweist, dass kleinere Kinder eine stärkere Regeneration im Knochenmark zeigen (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9

Vergleich der untersuchten Patientenkollektive bzgl. des Alters

p = 0,0784	Tag 28 Alle	Tag 28 positiv	Tag 28 regenerativ	Tag 28 negativ
	Median (Spannweite)	Median (Spannweite)	Median (Spannweite)	Median (Spannweite)
Alter (Jahre)	7,3 (0 – 18)	6,0 (0 – 18)	4,8 (0,1 – 16,6)	9,4 (0,2 - 17,9)

4.2 Unterscheidung der Blastenpopulationen in der Immunphänotypisierung

Bei insgesamt 81 der 192 Patienten (42%) wurden immunphänotypisch >2% Blasten an Tag 28 nachgewiesen. Bei 35 der 81 Patienten (18%) wurden diese allerdings nicht als leukämische Blasten gewertet, sondern konnten aufgrund ihres Antikörperexpressionsmuster (siehe 3.7.2 Auswertung der Durchflusszytometrie) als regenerative Blasten interpretiert werden. Letztlich waren somit 105 der 192 Patienten (55%) an Tag 28 negativ für leukämische Blasten (siehe Tabelle 10).

Diese Gruppe der 105 Patienten wurde unter Berücksichtigung der Zellregeneration nach den Kriterien der AML-BFM-Studien 1998 und 2004 als in 1. Remission (1.CR) befindlich gewertet. Diejenigen, welche die Kriterien der Zellregeneration noch nicht erreicht hatten, wurden vorerst als in partieller Remission (PR) befindlich eingestuft und im Verlauf erneut beurteilt.

Tabelle 10

Übersicht über Patienten der Studien AML 1998/2004 mit > 2% Blasten in der Immunphänotypisierung und > 5% Blasten in der Morphologie an Tag 28

	nur Morphologie	nur FACS	Morphologie + FACS	Gesamt
Tag 28 positiv Morphologie >5% FACS > 2%	4 (2%)	46 (24%)	37 (19%)	87 (45%)
Tag 28 negativ Morphologie < 5% FACS <2% Blasten Regenerativ >2% Blasten	n.u.	35 (18%)	70 (36%)	105 (55%)

4.3 Ereignisfreies Überleben, 5-Jahresüberleben und kumulative Inzidenz für ein Rezidiv in Bezug auf das Vorliegen einer Minimalen Resterkrankung an Tag 28 in der Immunphänotypisierung

Im globalen Test zeigte sich, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen der Patienten mit immunologisch negativem MRD, positivem MRD, regenerativen Blasten an Tag 28 oder morphologischem Blastennachweis an Tag 28 in Bezug auf das errechnete ereignisfreie Überleben (pEFS), 5-Jahresüberleben (pOS) und kumulative Inzidenz für ein Rezidiv (CI) über 5 Jahre gibt. Die Gruppe der Patienten mit regenerativen Blasten an Tag 28 zeigt mit $67 \pm 8\%$ das höchste pEFS (siehe Abbildung 4).

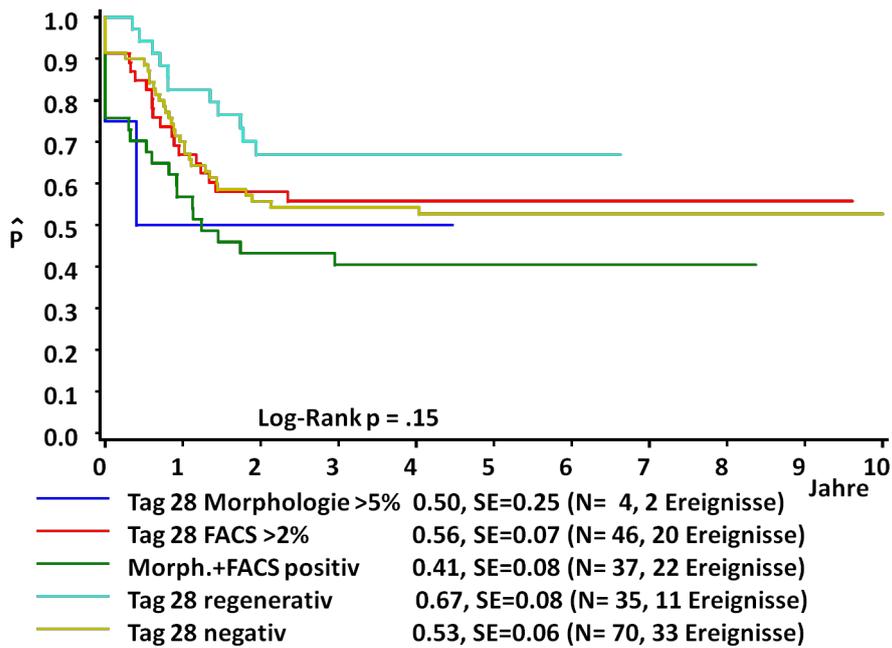


Abbildung 4

AML-BFM Studien 1998/2004 Auswertung an Tag 28 in der Immunphänotypisierung und Morphologie hinsichtlich des Nachweises von keinen (negativ)/regenerativen oder dem positiven Nachweis leukämischer Blasten in Bezug aus das pEFS (5 Jahre)

In dieser Gruppe liegt das pOS ebenfalls mit $88 \pm 6\%$ am höchsten (siehe Abbildung 5).

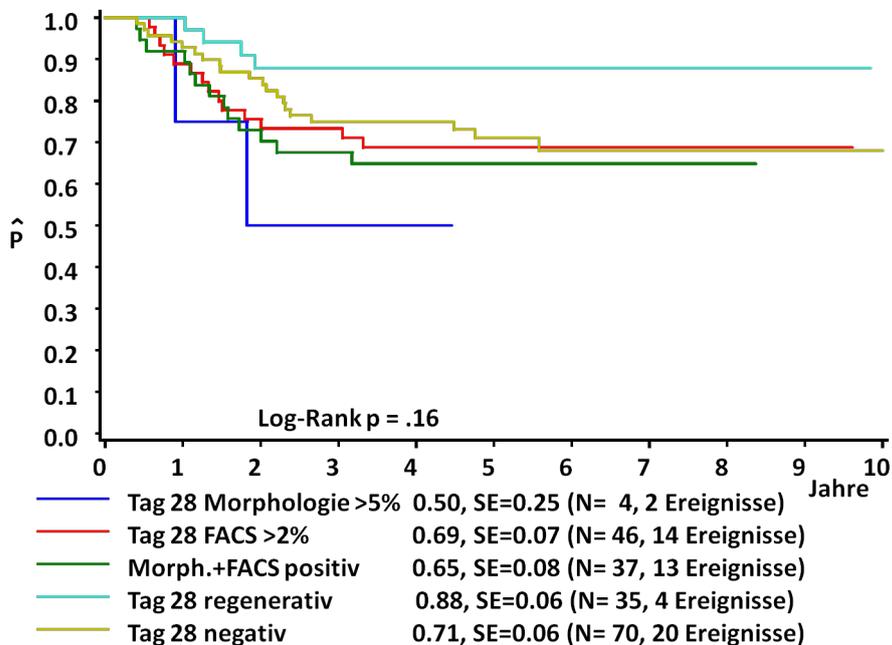


Abbildung 5

AML-BFM Studien 1998/2004 Auswertung an Tag 28 in der Immunphänotypisierung und Morphologie hinsichtlich des Nachweises von keinen (negativ)/regenerativen oder dem positiven Nachweis leukämischer Blasten in Bezug aus das pOS (5 Jahre)

Erwähnenswert ist, dass die CI in den Gruppen der immunologisch negativen/regenerativen/positiven bei $33 \pm 6\%/8\%$ bzw. $36 \pm 7\%$ sehr nah beieinander liegt (siehe Abbildung 6). Diese Beobachtung bedeutet, dass das unterschiedliche Ansprechen möglicherweise durch konsekutive Therapieveränderungen kompensiert werden konnte. Hierzu müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

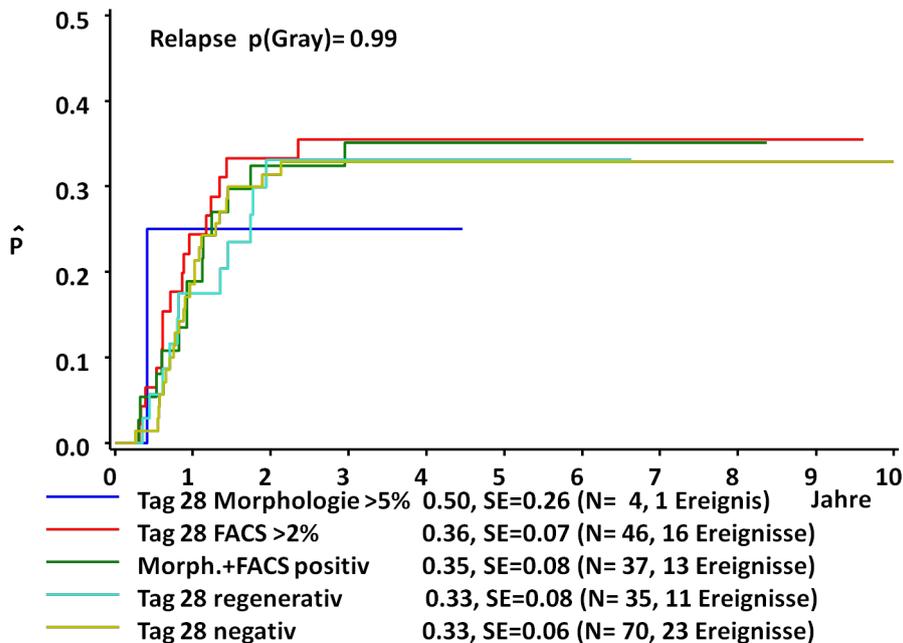


Abbildung 6

AML-BFM Studien 1998/2004 Auswertung an Tag 28 in der Immunphänotypisierung und Morphologie hinsichtlich des Nachweises von keinen (negativ)/regenerative oder dem positiven Nachweis leukämischer Blasten in Bezug auf die CI (5 Jahre)

Betrachtet man die Gruppe der Patienten in Bezug auf die Höhe der Blastenzahl an Tag 28, erhält man folgendes Ergebnis für die immunphänotypische Auswertung: in der Gruppe der Patienten mit $\leq 2\%$ Blasten an Tag 28 beträgt das pEFS über 5 Jahre $59 \pm 6\%$, während in der Gruppe der Patienten mit $> 2\%$ Blasten an Tag 28 das pEFS $50 \pm 7\%$ beträgt ($p=0,19$) (siehe Abb. 7).

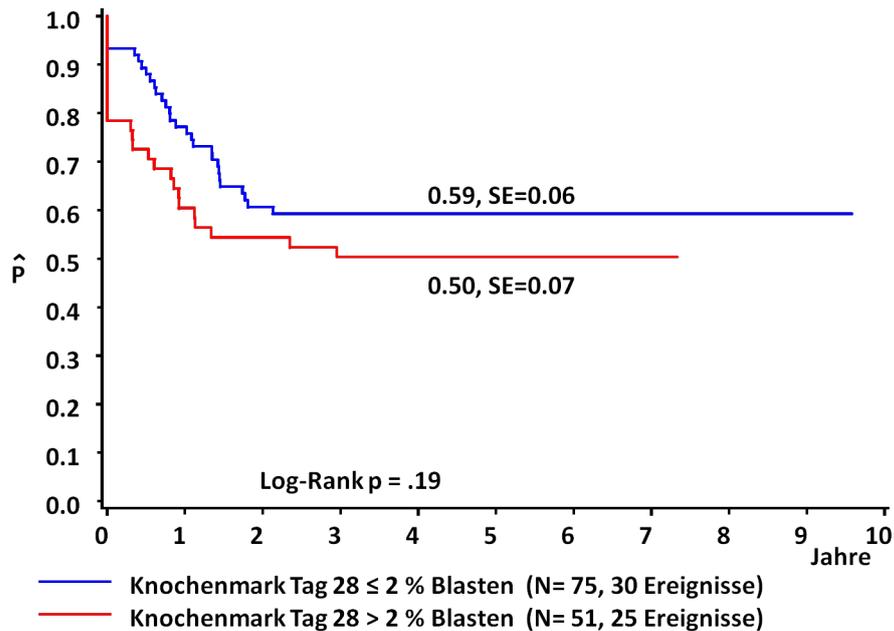


Abbildung 7

pEFS über den Zeitraum von 5 Jahre für die Patienten der Studien AML 98/2004 mit dem Nachweis \leq 2% Blasten bzw. >2% Blasten in der Immunphänotypisierung an Tag 28

Hinsichtlich der pOS über 5 Jahre zeigt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied ($p=0,74$). So beträgt pOS für die Gruppe der Patienten mit \leq 2% Blasten an Tag 79 \pm 5%, während für die Gruppe der Patienten mit > 2% Blasten an Tag 28 eine Wahrscheinlichkeit von 78 \pm 6% vorliegt (siehe Abb. 8 im Anhang).

Die CI für ein Rezidiv liegt nach 5 Jahren bei 38 \pm 6% für die Kinder mit \leq 2% Blasten an Tag 28 vs. 50 \pm 7% für die Kinder mit >2% Blasten an Tag 28 ($p_{(Gray)}=0,114$) (siehe Abbildung 9).

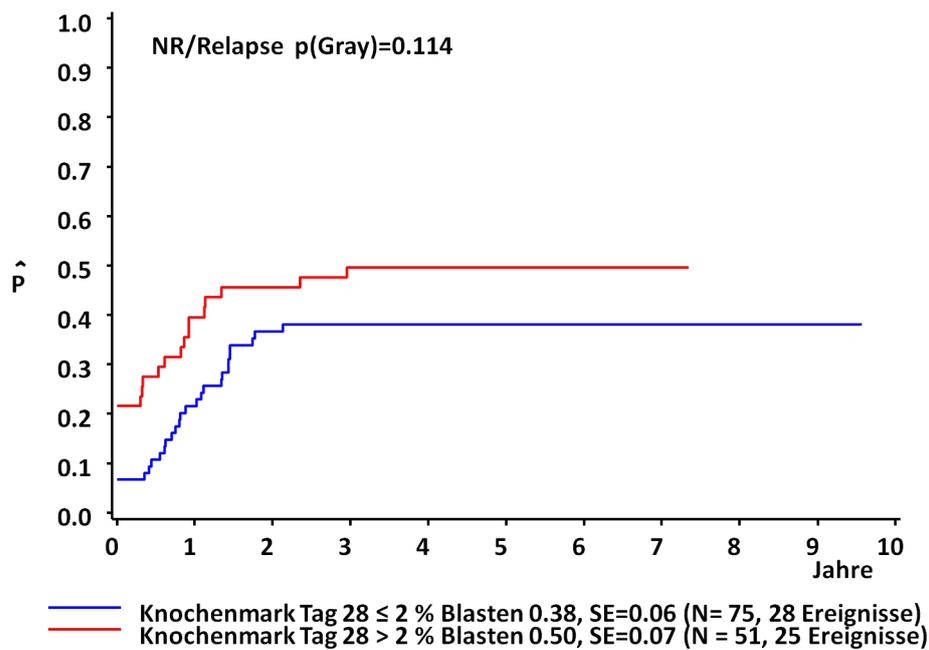


Abbildung 9

CI für ein Rezidiv über 5 Jahre für die Patienten der Studien AML 1998/2004 mit dem Nachweis ≤ 2% Blasten bzw. >2% Blasten in der Immunphänotypisierung an Tag 28

4.4 Das Therapieansprechen an Tag 28 der Gesamtgruppe in der morphologischen Auswertung in Bezug auf die Höhe der Blastenzahl

Betrachtet man die Gesamtgruppe (n=699) bezüglich des prozentualen Blastenvorkommens in der Morphologie und Immunphänotypisierung, so zeigt sich, dass nach der 1. Induktion bei 133 Patienten (19%) über 5% Blasten vorlagen und bei 52 Patienten (7,4%) sogar >20% Blasten (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11

Morphologische Anzahl der Blasten in Prozent an Tag 28 in der Gesamtgruppe

BM Tag 28	Pat. Anzahl =n
0% Blasten	512 (73%)
1-5% Blasten	54 (7,7%)
6-10% Blasten	44 (6,2%)
11-20% Blasten	37 (5,3%)
>20% Blasten	52 (7,4%)

Signifikant unterscheidet sich das 5-Jahres-pEFS für Kinder ohne Blasten an Tag 28 gegenüber den Kindern mit Blastennachweis an Tag 28. Liegen Blasten an Tag 28 vor, ist die Anzahl der Blasten ein weiterer signifikanter Faktor. Das pEFS beträgt bei den Kindern ohne Blasten an Tag 28 $56 \pm 2\%$, während das pEFS bei den Kindern, welche mehr als 20% Blasten an Tag 28 aufweisen, bei $25 \pm 6\%$ liegt ($p=0.0001$) (siehe Abbildung 10).

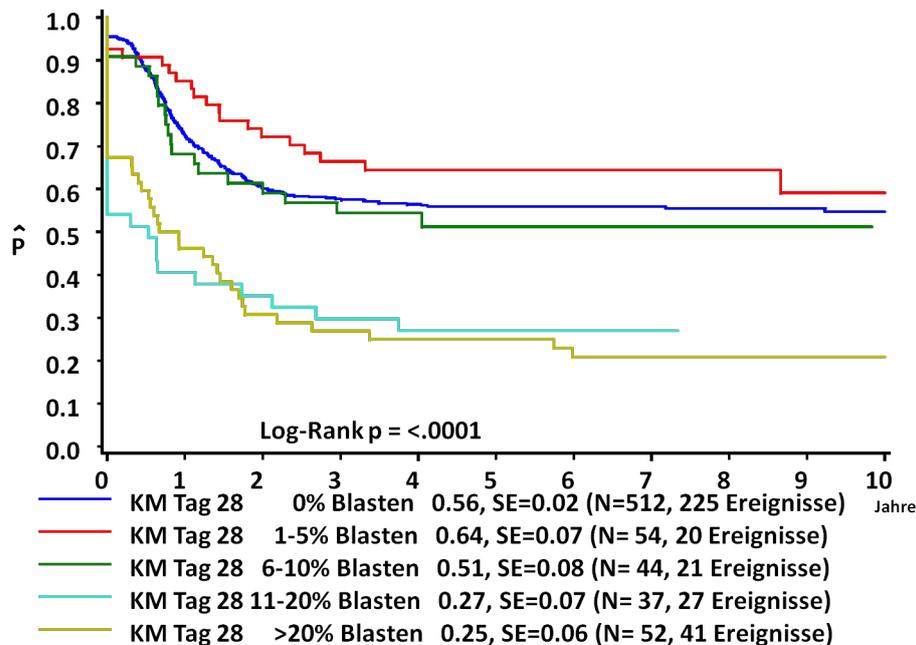


Abbildung 10

AML 1998/2004 pEFS erhoben mittels Morphologie und Immunphänotypisierung an Tag 28 in der Gesamtgruppe ($n=699$)

Die Gruppe der Patienten ohne Blasten an Tag 28 zeigte eine 5-Jahres-pOS von $72 \pm 2\%$, während es bei den Kindern mit über 20% Blasten bei $42 \pm 7\%$ lag ($p=0.0001$) (siehe Abbildung 11).

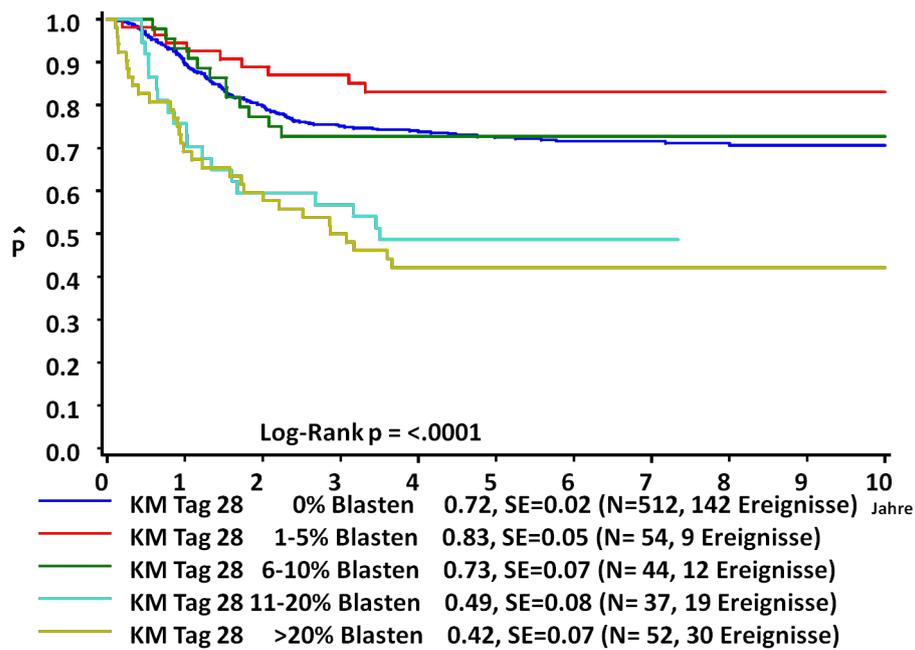


Abbildung 11

AML 1998/2004 pOS erhoben mittels Morphologie und Immunphänotypisierung an Tag 28 in der Gesamtgruppe (n=699)

Die CI unterscheidet sich nicht signifikant. Sie beträgt für die Kinder ohne Blastennachweis $35 \pm 2\%$, während sie für alle Kinder mit $>5\%$ Blasten an Tag 28 bei $37 \pm 8\%$ liegt. In der Gruppe der Patienten mit $>20\%$ Blasten an Tag 28 beträgt diese $40 \pm 7\%$ ($p_{(Gray)}=0,155$) (siehe Abbildung 12 im Anhang).

4.5 Auswertung der Gesamtgruppe in der Morphologie an Tag 28 bzgl. des Therapieansprechens

In den Therapiestudien AML 1998/2004 wurde das Therapieansprechen nach der 1. Induktion beurteilt. Es fand eine Stratifizierung in die jeweilige Risikogruppe statt. Bzgl. der Kriterien für die Stratifizierung siehe Kapitel 3.3.10 und 3.4.10.

Es werden zuerst die Gesamtgruppe und anschließend jeweils die Standard- und Hochrisikogruppe in Bezug auf das Therapieansprechen an Tag 28 betrachtet.

Für 699 Patienten lagen vollständige Daten hinsichtlich der Morphologie für den Zeitraum vom 01.07.1998 bis 31.08.2009 vor. Betrachtet man die Gruppe der Patienten, die eine Komplett Remission (CR) erreichen konnten unabhängig von der Risikostratifizierung und hinsichtlich der Blastenzahl an Tag 28, erhält man folgendes Ergebnis: das pEFS für die Patienten mit $\leq 5\%$ Blasten an Tag 28 beträgt $57 \pm 2\%$, während das pEFS für die Gruppe der Patienten mit $> 5\%$ Blasten an Tag 28 bei $34 \pm 4\%$ liegt ($p=0.0001$) (siehe Abb. 13)

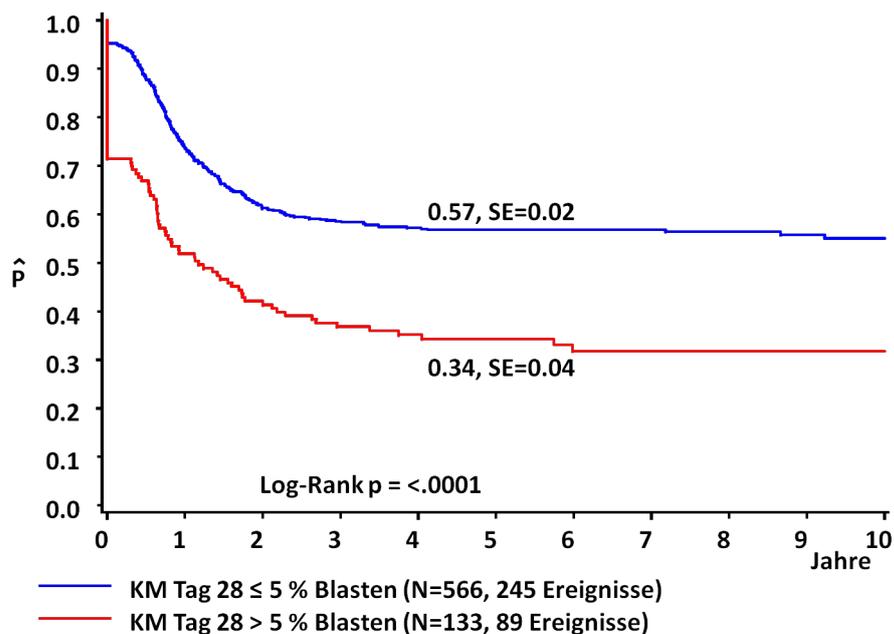


Abbildung 13

AML-BFM Studien 1998/2004 Gesamtgruppe (n= 699) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für das pEFS über den Zeitraum von 5 Jahren

Für die Kinder, bei denen an Tag 28 morphologisch $\leq 5\%$ Blasten nachgewiesen wurden, beträgt die 5-Jahres-pOS $74 \pm 2\%$. Im Gegensatz dazu beträgt es bei den Kindern mit $> 5\%$ Blasten an Tag 28 $54 \pm 4\%$ ($p=0.0001$) (siehe Abb. 14).

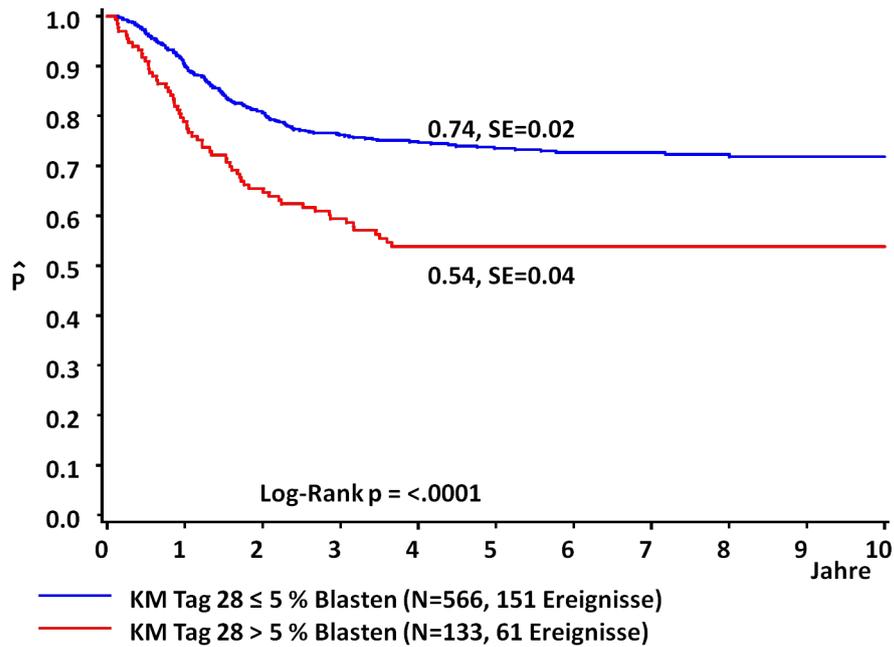


Abbildung 14

AML-BFM Studien 1998/2004 Gesamtgruppe (n= 699) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für das pOS über den Zeitraum von 5 Jahren

Die CI für ein Rezidiv beträgt für Kinder mit $\leq 5\%$ Blasten an Tag 28 $39 \pm 2\%$ versus $64 \pm 4\%$ bei den Kindern mit $>5\%$ Blasten an Tag 28 ($p_{(\text{Gray})}=0,0001$) (siehe Abbildung 15).

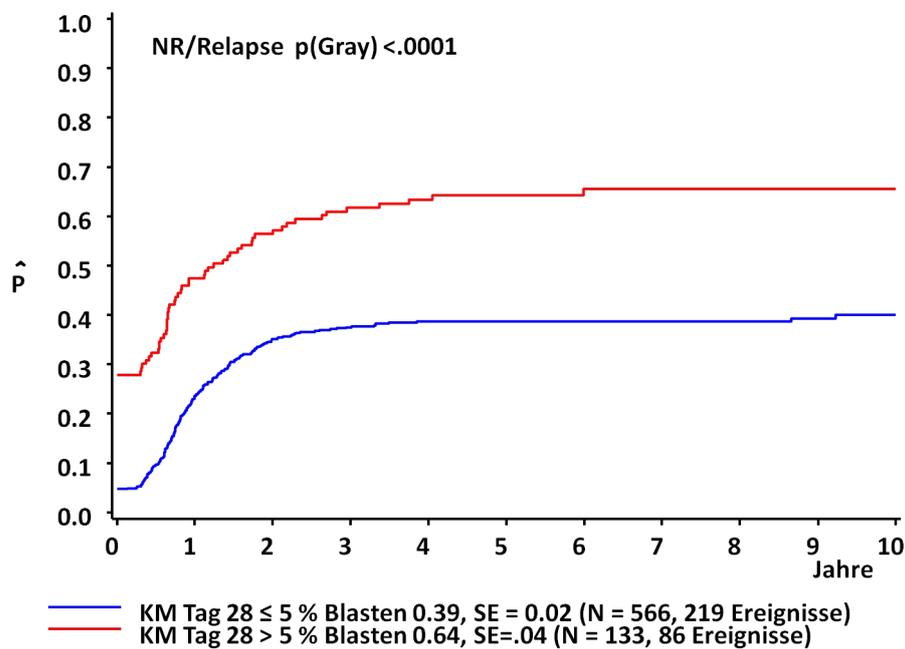


Abbildung 15

AML-BFM Studien 1998/2004 Gesamtgruppe (n= 699) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für die CI für ein Rezidiv über den Zeitraum von 5 Jahren

4.5.1 Morphologische und immunologische Auswertung an Tag 28 der Standardrisikogruppe bzgl. des Therapieansprechens

Betrachtet man das pEFS in der Standard-Risikogruppe (SR) (n= 237), haben die Patienten der SR-Gruppe mit morphologisch $\leq 5\%$ Blasten an Tag 28 (n=215) ein pEFS von $68 \pm 3\%$ und für die Patienten der SR-Gruppe mit $>5\%$ Blasten (n=22) an Tag 28 ein pEFS von $59 \pm 10\%$ ($p=0,25$) (siehe Anhang Abbildung 16).

Das pOS der Kinder beträgt in der SR-Gruppe mit morphologisch $\leq 5\%$ Blasten an Tag 28 $85 \pm 3\%$, bei Kindern der SR-Gruppe mit morphologisch $>5\%$ Blasten an Tag 28 $72 \pm 10\%$ ($p=0,14$) (siehe Anhang Abbildung 17).

Das bedeutet, dass das morphologische Ansprechen in der SR-Gruppe keinen signifikanten Unterschied für das pEFS und pOS der Kinder bedeutet.

Die CI für ein Rezidiv ist bei Kindern der SR-Gruppe mit morphologisch $\leq 5\%$ Blasten nach der ersten Induktion $29 \pm 3\%$, während es für die Patienten mit $>5\%$ Blasten zum gleichen Zeitpunkt bei $41 \pm 11\%$ liegt ($p_{(\text{Gray})}=0,164$) (siehe Anhang Abbildung 18).

Betrachtet man die Standardrisikogruppe in der Immunphänotypisierung, zeigen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich $\leq / > 2\%$ Blasten an Tag 28 für das pEFS ($61 \pm 8\%$ vs. $59 \pm 14\%$), pOS ($83 \pm 7\%$ vs. $92 \pm 8\%$) und die CI ($39 \pm 9\%$ vs. $41 \pm 15\%$).

4.5.2 Morphologische und immunologische Auswertung an Tag 28 der Hochrisikogruppe bzgl. des Therapieansprechens

In der Hochrisikogruppe (n=462) zeigen sich in der morphologischen Auswertung signifikante Unterschiede bezüglich des Vorliegens von Blasten. Das pEFS beträgt bei Patienten mit $\leq 5\%$ Blasten (n=351) an Tag 28 $50 \pm 3\%$ und bei den Kindern mit $>5\%$ Blasten (n=111) zum gleichen Zeitpunkt $29 \pm 4\%$ ($p=0,0001$) (siehe Abb.19).

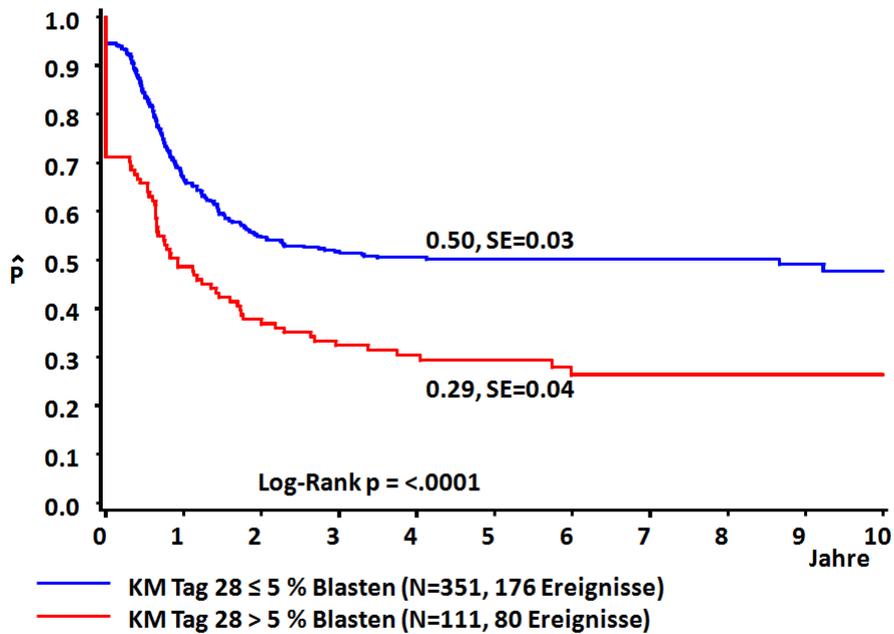


Abbildung 19

AML-BFM Studien 1998/2004 Hochrisikogruppe (n= 462) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für das pEFS über den Zeitraum von 5 Jahren

Das pOS beträgt in der HR-Gruppe der Patienten mit $\leq 5\%$ Blasten an Tag 28 $67 \pm 3\%$ und in bei den Patienten mit $>5\%$ Blasten $50 \pm 5\%$ nach 5 Jahren ($p=0,0018$) (siehe Abb. 20).

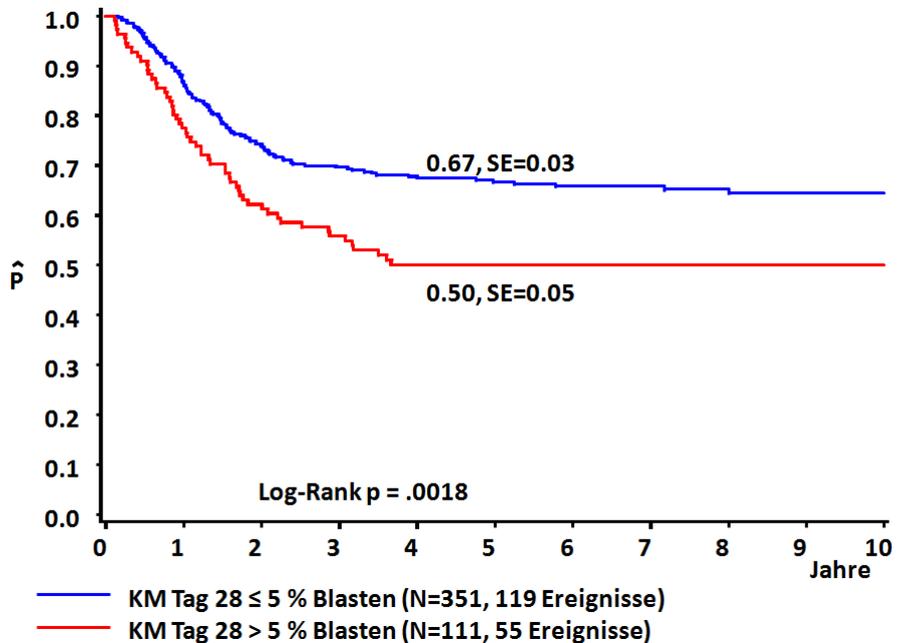


Abbildung 20

AML-BFM Studien 1998/2004 Hochrisikogruppe (n=462) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für das pOS über den Zeitraum von 5 Jahren

Die 5-Jahres-CI für ein Rezidiv beträgt $44 \pm 3\%$ für die Patienten der HR-Gruppe mit $\leq 5\%$ Blasten an Tag 28 vs. $69 \pm 4\%$ für die Patienten mit $>5\%$ Blasten an Tag 28 ($p_{\text{Gray}} < 0,0001$) (siehe Abb. 21).

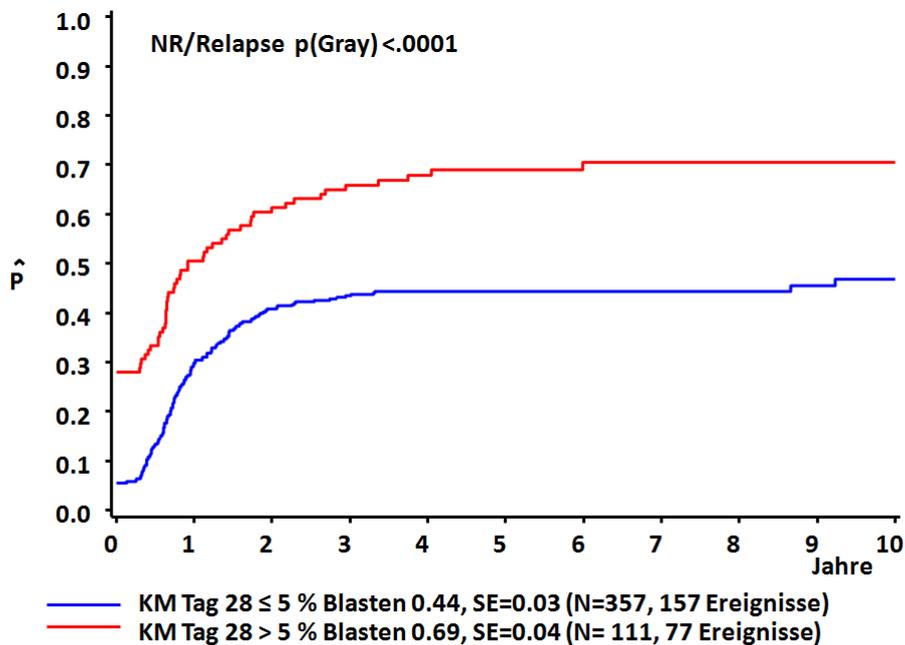


Abbildung 21

AML-BFM Studien 1998/2004 Hochrisikogruppe (n= 462) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für die CI für ein Rezidiv über den Zeitraum von 5 Jahren

In der immunphänotypischen Auswertung haben die Kinder der HR-Gruppe mit $\leq 2\%$ Blasten ein pEFS von $57 \pm 8\%$ vs. $47 \pm 8\%$ bei den Patienten mit $>2\%$ Blasten an Tag 28 ($p=0,28$) (siehe Anhang Abb. 22).

Das pOS beträgt $76 \pm 7\%$ für die Patienten mit $\leq 2\%$ Blasten und $74 \pm 7\%$ für die Patienten mit $>2\%$ Blasten an Tag 28 ($p=0,66$) (siehe Anhang Abb.23).

Die CI für ein Rezidiv für Patienten in der HR-Gruppe mit $\leq 2\%$ Blasten an Tag 28 beträgt $38 \pm 8\%$ vs. $53 \pm 8\%$ für die Patienten mit $>2\%$ Blasten an Tag 28 ($p_{\text{Gray}}=0,138$) (siehe Anhang Abbildung 24).

4.5.3 Morphologische und immunologische Auswertung der Hochrisikogruppe ohne Stammzelltransplantation

Betrachtet man in der HR-Gruppe die Patienten, die keine SZT erhielten bezüglich des Vorkommens von Blasten an Tag 28, so beträgt in der morphologischen Auswertung das pEFS $49 \pm 3\%$ für die Kinder ($n= 304$) mit $\leq 5\%$ Blasten an Tag 28 vs. $22 \pm 4\%$ bei den Kindern ($n=89$) mit $>5\%$ Blasten an Tag 28 liegt ($p=0,0001$) (siehe Abb. 25).

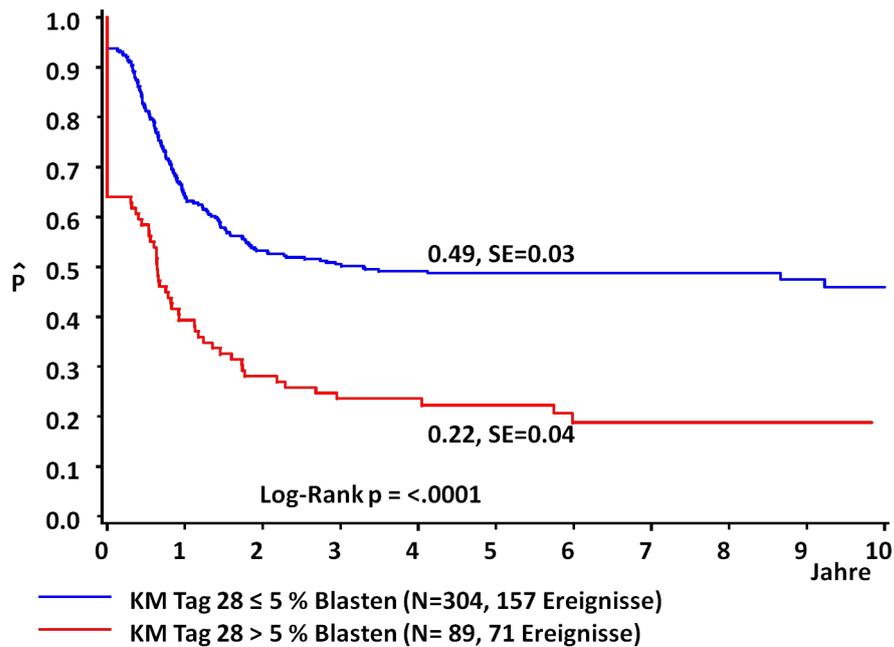


Abbildung 25

AML-BFM Studien 1998/2004 Hochrisikogruppe ohne SZT ($n= 393$) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für das pEFS über den Zeitraum von 5 Jahren

Das pOS bei den Kindern mit $\leq 5\%$ Blasten beträgt $66 \pm 3\%$ und $46 \pm 5\%$ bei den Kindern mit $>5\%$ Blasten an Tag 28 ohne SZT in 1.CR ($p=0,00040$) (siehe Abb. 26).

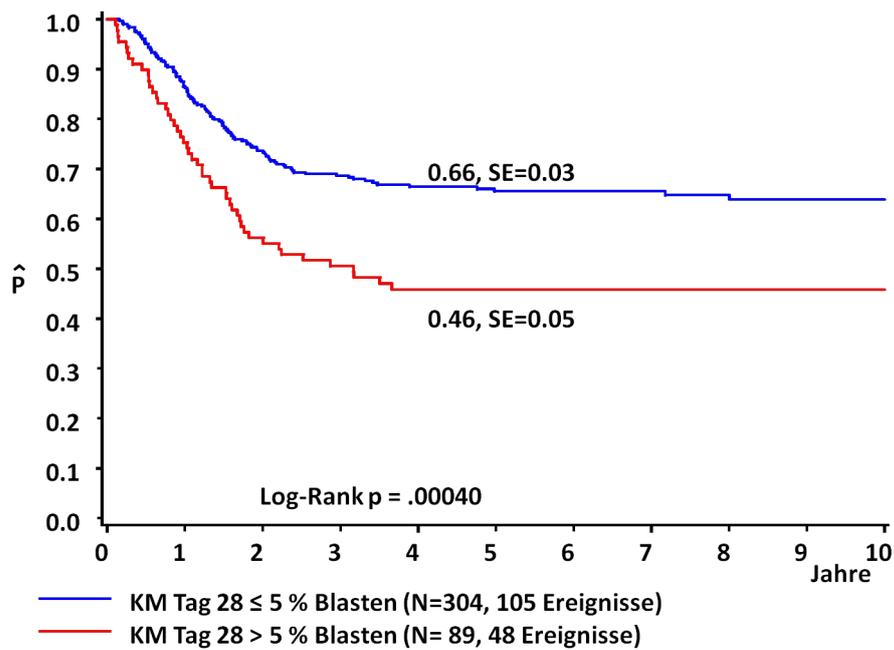


Abbildung 26

AML-BFM Studien 1998/2004 Hochrisikogruppe ohne SZT (n=393) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für das pOS über den Zeitraum von 5 Jahren

Die CI für ein Rezidiv liegt für die morphologische Auswertung in der HR-Gruppe ohne SZT in 1.CR mit $\leq 5\%$ Blasten an Tag 28 bei $47 \pm 3\%$ und in der Gruppe der Patienten mit $>5\%$ Blasten an Tag 28 bei $77 \pm 5\%$ ($p_{(\text{Gray})} < 0,0001$) (siehe Abb. 27).

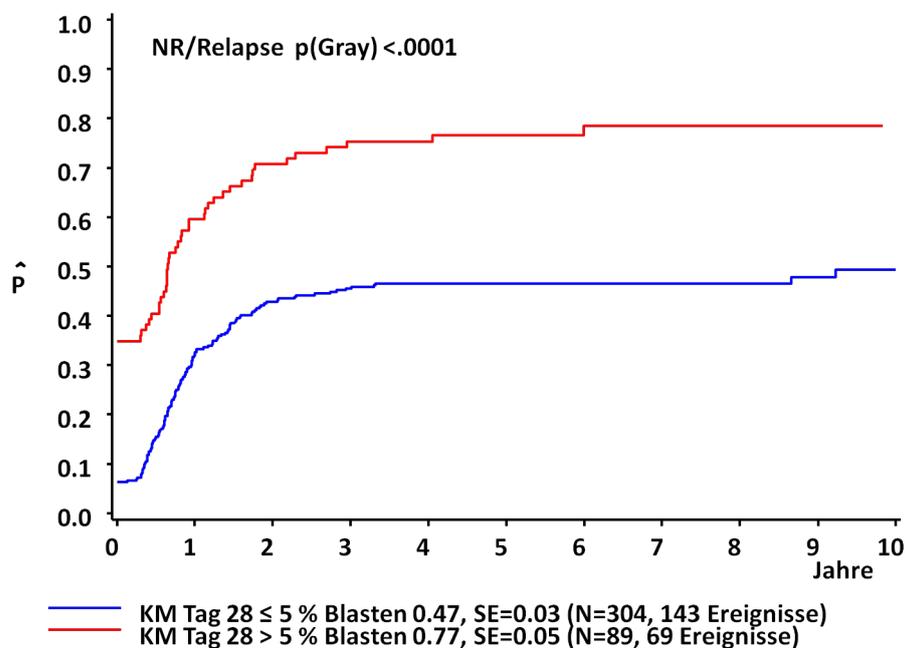


Abbildung 27

AML-BFM Studien 1998/2004 Hochrisikogruppe ohne SZT (n= 393) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für die CI eines Rezidivs über den Zeitraum von 5 Jahren

In der immunphänotypischen Auswertung der Daten von 69 Patienten beträgt das pEFS $54 \pm 8\%$ für die Kinder ($n=35$), die in der HR-Gruppe an Tag 28 $\leq 2\%$ Blasten hatten und keine Stammzelltransplantation (SZT) in erster Remission (1.CR) erhielten. Für die Kinder ($n=34$) mit $>2\%$ Blasten an Tag 28 ohne SZT in 1.CR beträgt das pEFS $44 \pm 9\%$ ($p=0,31$) (siehe Anhang Abb. 28).

Das pOS beträgt $76 \pm 8\%$ für die Kinder mit $\leq 2\%$ Blasten und $74 \pm 8\%$ für die Kinder mit $>2\%$ Blasten an Tag 28 und ohne SZT in 1.CR ($p=0,69$) (siehe Anhang Abb. 29).

Die CI für ein Rezidiv beträgt in der HR-Gruppe ohne SZT in 1.CR mit $\leq 2\%$ Blasten an Tag 28 $43 \pm 9\%$, während es bei den Patienten mit $>2\%$ Blasten an Tag 28 $56 \pm 9\%$ beträgt ($p_{\text{Gray}}=0,224$) (siehe Anhang Abb. 30).

4.5.4 Morphologische und immunologische Auswertung der Hochrisikogruppe mit Stammzelltransplantation

Für die 69 Patienten der HR-Gruppe, die in 1.CR eine SZT erhielten, zeigt sich, dass in der morphologischen Auswertung hinsichtlich des pEFS und des pOS kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit $\leq / > 5\%$ Blasten an Tag 28 besteht ($p=0,84$ und $p=0,84$). Das pEFS beträgt für die Kindern mit $\leq 5\%$ Blasten ($n=47$) an Tag 28 $59 \pm 7\%$ und für die Kindern mit $>5\%$ Blasten ($n=22$) an Tag 28 $58 \pm 11\%$ (siehe Abbildung 31).

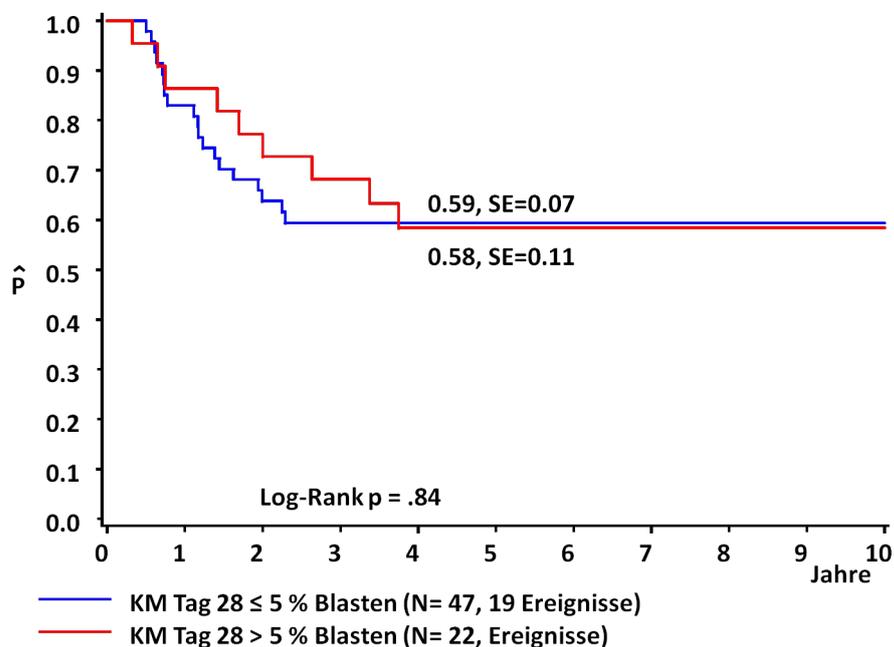


Abbildung 31

AML-BFM Studien 1998/2004 Hochrisikogruppe mit SZT ($n=69$) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für das pEFS über den Zeitraum von 5 Jahren

Das pOS liegt bei $74 \pm 6\%$ für die Kinder mit $\leq 5\%$ Blasten und $68 \pm 10\%$ für die Kinder mit $>5\%$ Blasten an Tag 28 nach SZT in 1.CR (siehe Abb. 32).

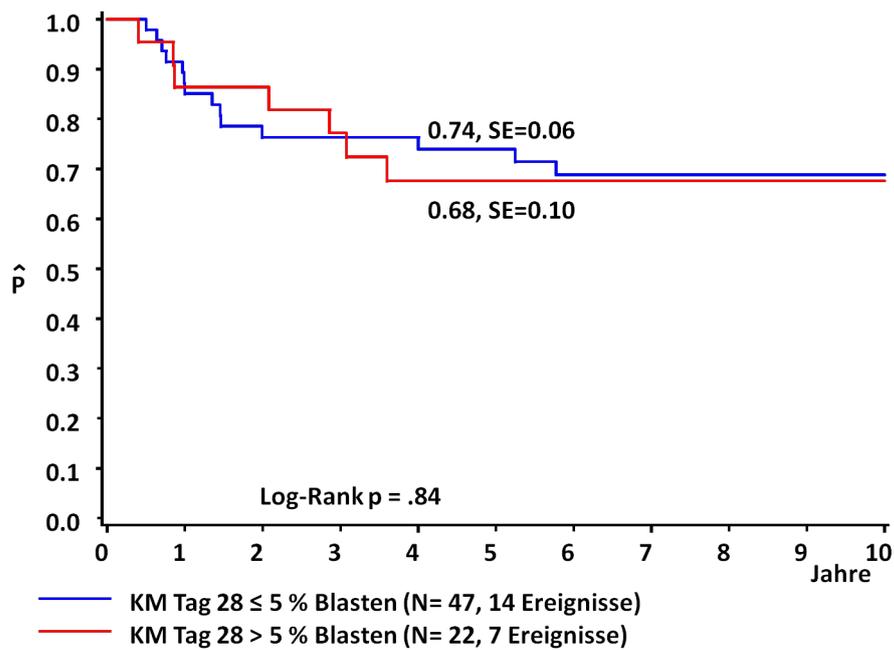


Abbildung 32

AML-BFM Studien 1998/2004 Hochrisikogruppe mit SZT (n=69) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für das pOS über den Zeitraum von 5 Jahren

Die CI für ein Rezidiv beträgt in der HR-Gruppe mit SZT in 1.CR mit $\leq 5\%$ Blasten an Tag 28 $30 \pm 7\%$ und bei den Patienten mit $> 5\%$ Blasten an Tag 28 $37 \pm 11\%$ ($p_{(\text{Gray})}=0,705$) (siehe Abb. 33).

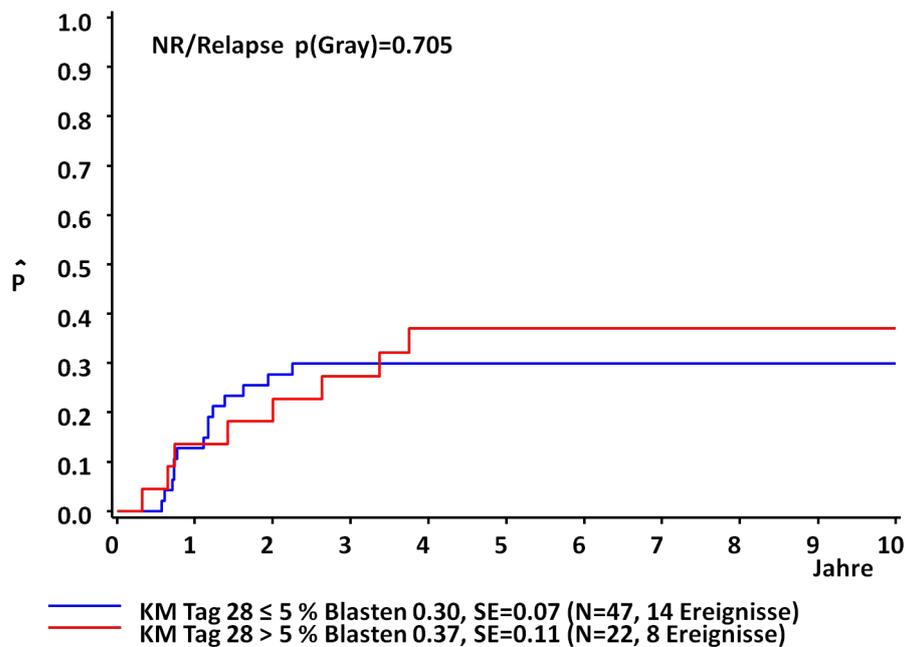


Abbildung 33

AML-BFM Studien 1998/2004 Hochrisikogruppe mit SZT (n= 69) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für die CI eines Rezidivs über den Zeitraum von 5 Jahren

Man kann somit bzgl. der morphologischen Auswertung beobachten, dass sich das pEFS und das pOS der Patienten mit $\leq/ > 5\%$ Blasten an Tag 28 nach erfolgter SZT angleichen und die CI für ein Rezidiv auf die Therapie deutlich abnimmt (von $47 \pm 3\%$ auf $30 \pm 7\%$ bzw. $77 \pm 5\%$ auf $37 \pm 11\%$ (siehe Abb. 27 & 33)). Für 9 Kinder, die in der HR-Gruppe in 1.CR eine SZT erhielten, lagen immunphänotypische Daten für den Tag 28 vor. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied für das pEFS, pOS und die CI zwischen den Patienten mit $\leq/ > 2\%$ Blasten an Tag 28.

4.6 Beziehung zwischen klinischem Verlauf und Therapieansprechen an Tag 28

In der Abbildung 34 sind die Beziehungen zwischen Therapieansprechen an Tag 28 und dem klinischen Verlauf graphisch dargestellt.

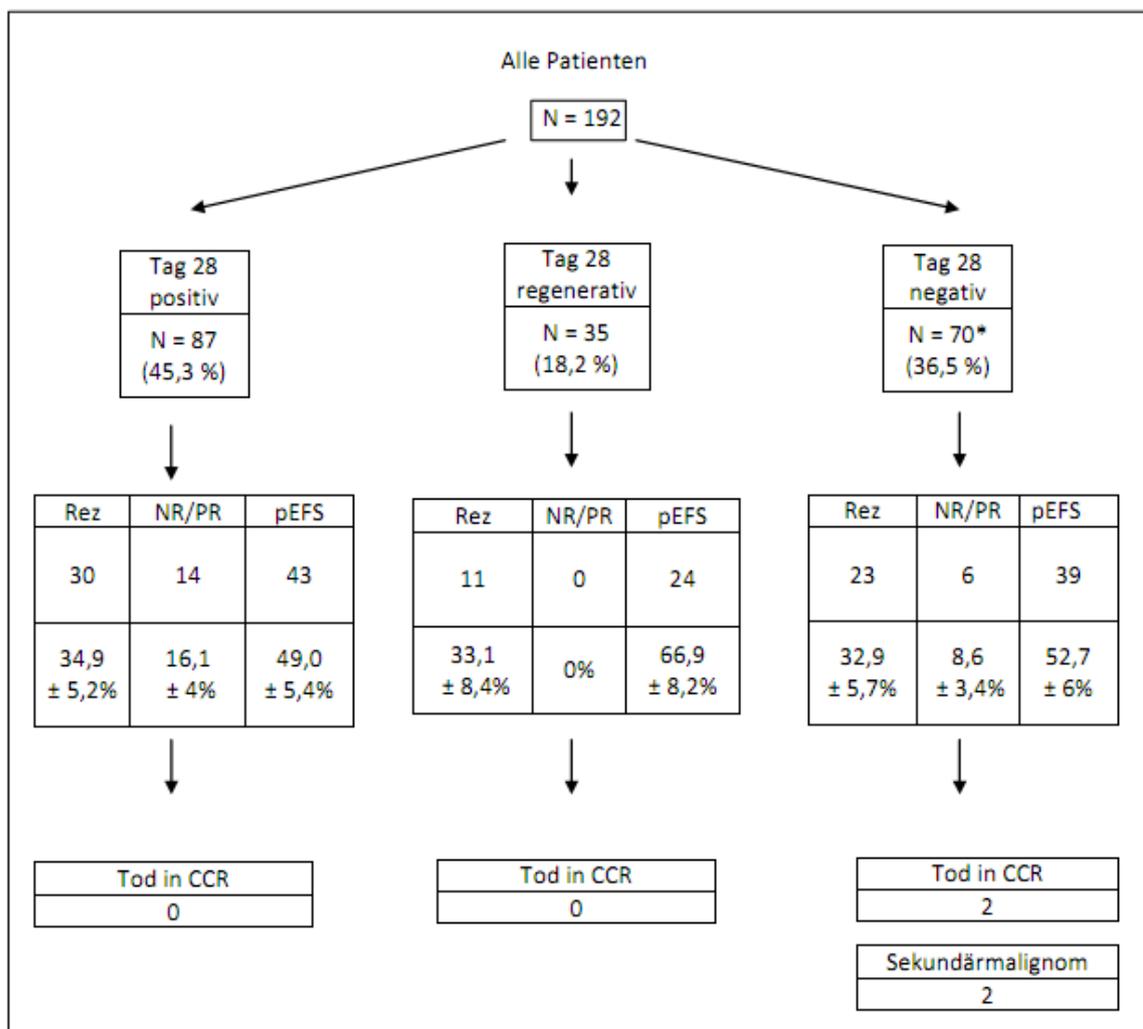


Abbildung 34

Diagramm bzgl. der Beziehung zwischen klinischem Verlauf und Therapieansprechen an Tag 28 für die 192 Patienten, für welche eine morphologische und immunphänotypische Auswertung vorlag

* bei 2 Patienten der Gruppe konnte der Therapieverlauf nicht weiter dokumentiert werden

Von den 192 Patienten, für die sowohl die morphologischen als auch immunologischen Daten von Tag 28 vorlagen, zeigten sich bei 87 Patienten (45,3%) leukämische Blasten an Tag 28. Von diesen 87 Kindern erlitten 30 ($34,9 \pm 5,2\%$) ein Rezidiv, 14 Kinder ($16,1 \pm 4\%$) waren Nonresponder. Bei 35 Patienten (18,2%) lagen an Tag 28 Blasten vor, welche aufgrund der Merkmale ihrer Antikörperexpression als regenerativ eingestuft wurden. Von diesen 35 Kindern erlitten 11 ($33,1 \pm 8,4\%$) ein Rezidiv. Eine Einstufung als Nonresponder schließt sich in dieser Gruppe per Definition aus. Bei 70 Patienten (36,5%) fanden sich an Tag 28 keine leukämischen Blasten. Von diesen 70 Kindern erlitten 23 ($32,9 \pm 5,7\%$) ein Rezidiv und 6 Kinder ($8,6 \pm 3,4\%$) waren Nonresponder.

In kompletter Remission (CCR) verstarben 2 Kinder, 2 weitere Kinder erkrankten im Verlauf an einem Sekundärmalignom und für 2 Patienten liegt keine Verlaufsdokumentation vor („lost in follow up“). Die Rezidiv-Rate ist somit in allen drei Gruppen ähnlich. Allerdings unterscheidet sich das ereignisfreie Überleben der einzelnen Gruppen untereinander. Das pEFS beträgt für die Patienten mit leukämischen Blasten $49 \pm 5,4\%$ vs. $66,9 \pm 8,2\%$ für die Patienten mit regenerativen Blasten an Tag 28 ($p=0,042$). Für die Patienten ohne Blastennachweis an Tag 28 beträgt es $52,7 \pm 6\%$ und unterscheidet sich somit nicht signifikant gegenüber den Patienten mit regenerativen Blasten ($p=0,14$) oder mit Blastennachweis ($p=0,47$).

Somit kommt dem immunologischen Nachweis regenerativer Blasten an Tag 28 eine unmittelbare klinische Bedeutung zu.

4.7 Therapieanpassung aufgrund des Therapieansprechens unter Einbeziehung der immunphänotypischen Befunde an Tag 28

Eine Therapieanpassung erfolgte im Rahmen der AML-BFM Studien 1998 unter Berücksichtigung der Morphologie und 2004 bereits unter Berücksichtigung der Morphologie und dem Nachweis von prognostisch ungünstigen genetischen Aberrationen. Ab dem Jahr 2006 wurde die Therapieanpassung unter Einbeziehung der Immunphänotypisierung an Tag 28 vorgenommen.

In dem Zeitraum 2006 – 2010 wurden 30 Patienten (21% der SR-Gruppe in diesem Zeitraum) aufgrund ihres unzureichenden Therapieansprechens an Tag 15 und Tag 28 von der Standardrisikogruppe ($n = 138$) in die Hochrisikogruppe stratifiziert. Von diesen 30 Patienten erhielten 4 eine Stammzelltransplantation in erster Remission. Von diesen Patienten konnten 25 eine komplette Remission erreichen.

Eine Therapieänderung erhielten 19 Patienten (8%) der Hochrisikogruppe ($n = 266$). Die Stratifizierung erfolgte unter Einbeziehung des Therapieansprechens an Tag 28 und dem

Nachweis von prognostisch ungünstigen genetischen Aberrationen. Weitere 36 Patienten (15%) wurden aufgrund des schlechten Therapieansprechens an Tag 28 und Tag 42 (nach 2. Induktion) einem angepassten Therapieregime zugeführt. 38 dieser Patienten erhielten eine Stammzelltransplantation. Ein Rezidiv erlitten 14 Patienten und 10 Patienten starben. Von diesen umstratifizierten Patienten erreichten 35 eine komplette Remission (siehe Abbildung 35).

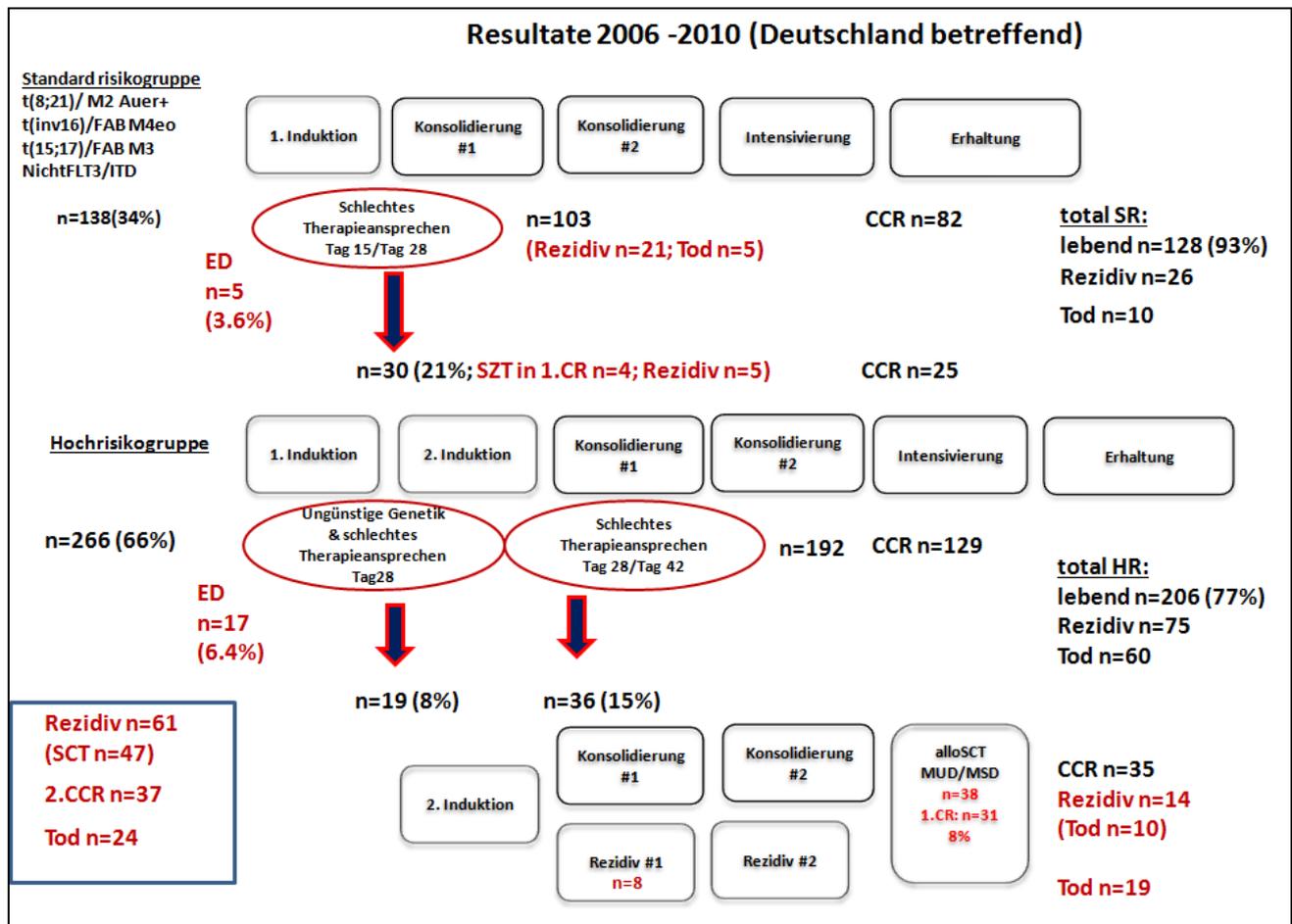


Abbildung 35

Resultate für den Auswertungszeitraum 2006 – 2010 nach Therapieanpassung aufgrund des Therapieansprechens an Tag 28

Betrachtet man das pEFS und pOS in Bezug auf die Patienten im Zeitraum vor 2006 (01.07.1998 – 31.12.2005, n=533) und nach 2006 (01.01.2006 – 31.12.2009, n=258), so zeigen sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Gesamtüberlebenschance zwischen den Patientengruppen. Das pEFS beträgt $49 \pm 2\%$ vs. $53 \pm 3\%$ ($p=0,28$)(siehe Abbildung 36). Das pOS beträgt $63 \pm 2\%$ vs. $76 \pm 3\%$ ($p=0,0004$)(siehe Abbildung 37).

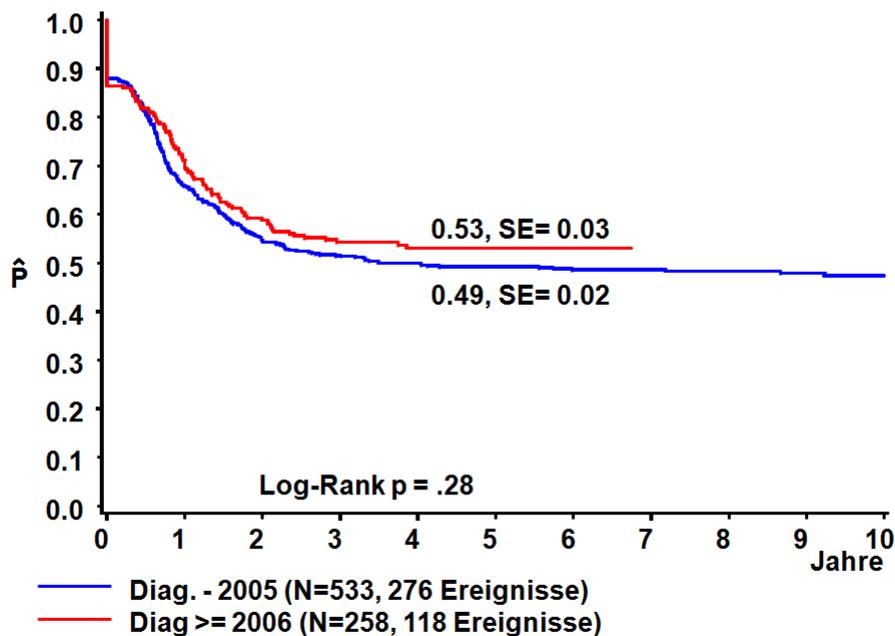


Abbildung 36

AML-BFM Studien 1998/2004 pEFS der Patientengruppen von der Diagnosestellung bis 12/2005 vs. Diagnosestellung ab 01/2006 vor dem Hintergrund der zusätzlichen Therapieanpassung bei positivem Blastennachweis an Tag 28 im FACS

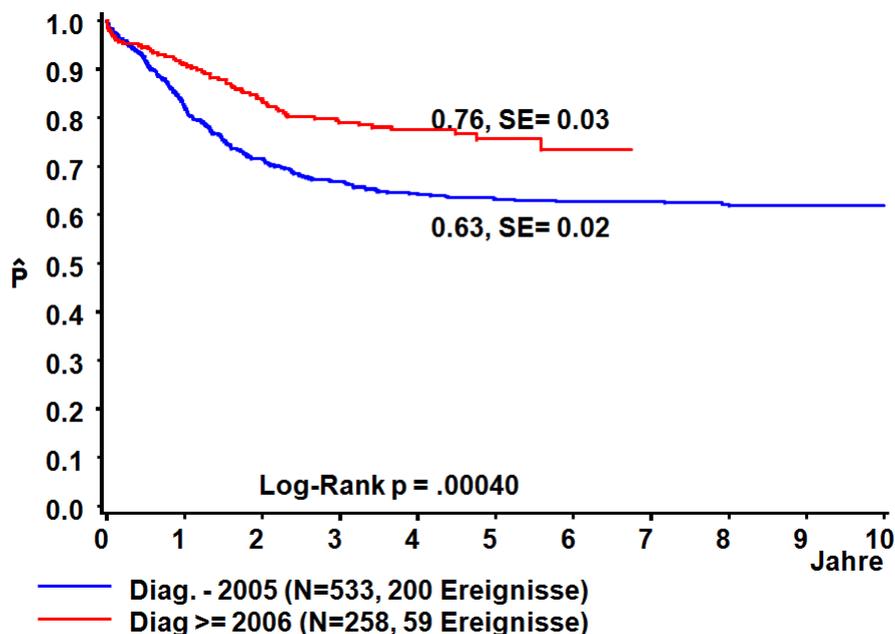


Abbildung 37

AML-BFM Studien 1998/2004 pOS der Patientengruppen von der Diagnosestellung bis 12/2005 vs. Diagnosestellung ab 01/2006 vor dem Hintergrund der zusätzlichen Therapieanpassung bei positivem Blastennachweis an Tag 28 im FACS

Ebenso deutlich unterscheidet sich das Gesamtüberleben der Patienten, die als Nonresponder eingestuft wurden und dementsprechend eine Therapieänderung erfahren haben für die Zeiträume vor und nach 2006. Das pOS beträgt für die Patienten in NR vor 2006 (n=50) 29 ±6% und nach 2006 (n=24) 54 ±10% (p=0,0095) (siehe Abbildung 38).

Ähnlich verhält sich das pOS in der Patientengruppe, welche während der Therapie ein Rezidiv erlitten. In dieser Gruppe beträgt das pOS vor 2006 (n=185) $28 \pm 3\%$ und nach 2006 (n=79) $46 \pm 8\%$ ($p=0,00020$)(siehe Abbildung 39).

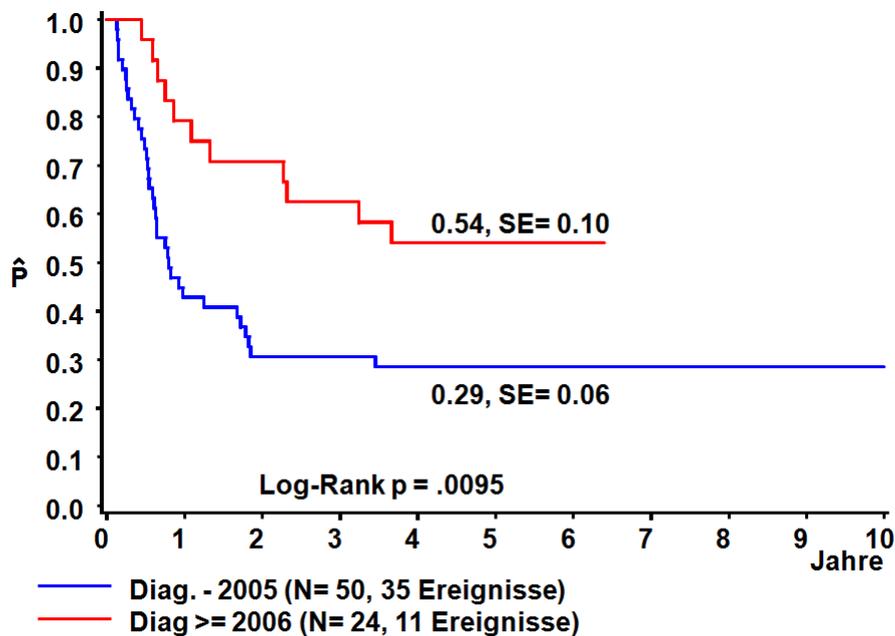


Abbildung 38

AML-BFM Studien 1998/2004 pOS der Patienten, die als NR einstuft wurden von der Diagnosestellung bis 12/2005 vs. Diagnosestellung ab 01/2006 vor dem Hintergrund der zusätzlichen Therapieanpassung bei positivem Blastennachweis an Tag 28 im FACS

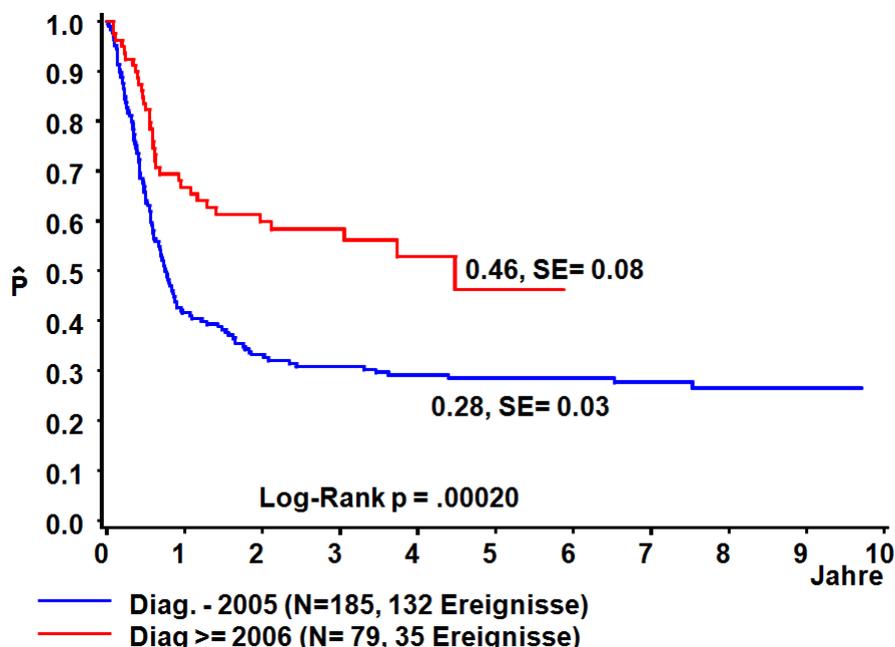


Abbildung 39

AML-BFM Studien 1998/2004 pOS der Patienten, die ein Rezidiv erlitten von der Diagnosestellung bis 12/2005 vs. Diagnosestellung ab 01/2006 vor dem Hintergrund der zusätzlichen Therapieanpassung bei positivem Blastennachweis an Tag 28 im FACS

Durch die zusätzliche Therapieanpassung seit 2006 bei Patienten mit positivem Blastennachweis im FACS an Tag 28 hat sich eine Annäherung der Prognose bei den Patientengruppen vollzogen.

5 Diskussion

5.1 Die Minimale Resterkrankung

Ergebnisse der Morphologie vs. Immunphänotypisierung

Das Therapieansprechen ist in der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie im Kindes- und Jugendalter ein wichtiger unabhängiger prognostischer Faktor (Inaba et al., 2012; Sievers et al., 2003; van der Velden, 2010; Xu et al., 2013). Die Auffassungen über den Stellenwert unterschiedlicher Methoden zur Beurteilung des Therapieansprechens gehen in der Literatur auseinander. Bisher wurde das Therapieansprechen unter Zuhilfenahme der Morphologie des Knochenmarks beurteilt. Da die Morphologie in der Sensitivität begrenzt ist, wird diese durch Methoden wie die multiparametrische Durchflusszytometrie und die Polymerasekettenreaktion, welche deutlich sensitiver sind, zunehmend ergänzt oder abgelöst (Kern et al., 2008; Radhi et al., 2010; van Rhenen et al., 2007; Weir und Borowitz, 2001).

Die Morphologie ist eine Methode, welche über Jahre in der Beurteilung des Therapieansprechens einen festen Stellenwert hatte (Willman, 1999). Inzwischen wird die Relevanz der Morphologie zur Beurteilung der MRD von den Autoren unterschiedlich gewertet.

In den meisten Studien wird das Therapieansprechen morphologisch nach der 1. oder 2. Induktion beurteilt (Gibson et al., 2011; Lange et al., 2008; Loken et al., 2012; Ravindranath et al., 2005; Tsukimoto et al., 2009). Einigkeit besteht ebenfalls hinsichtlich der Höhe der Anzahl der nachgewiesenen Blasten. Bei einem Nachweis von $< 5\%$ Blasten und vorliegender Zellregeneration sind die Kriterien für eine komplette Remission erreicht. Allerdings gelten unterschiedliche Kriterien für die Zellregeneration. In der AML BFM Studie 2004 sowie in der skandinavischen NOPHO-Studiengruppe war eine komplette Remission nur dann erreicht, wenn neben dem regenerierenden Knochenmark mit $< 5\%$ Blasten im peripheren Blutbild ≥ 1.000 Granulozyten/ μl und ≥ 80.000 Thrombozyten/ μl vorlagen und kein Organbefall nachweisbar war. Inaba et al. sowie Rubnitz definierten als Kriterien die Regeneration in allen drei Ziellinien sowie die absoluten Neutrophilenzahlen von $\geq 300/\mu\text{l}$ und Thrombozytenzahlen von $\geq 30.000/\mu\text{l}$ (Inaba et al., 2012; Rubnitz et al., 2010). In der britischen MRC AML 12 Studie war das Hauptkriterium für CR $< 5\%$ Blasten im Knochenmark und die Regeneration der Zellen der Hämatopoese. Die Anzahl der Neutrophilen oder Thrombozyten wurden nicht mit eingeschlossen (Gibson et al., 2011).

Die Morphologie ist als alleinige Methode zur Beurteilung für das Vorliegen einer MRD nicht ausreichend. Dies ist in der starken Abhängigkeit vom Untersuchenden und somit mangelnder Objektivität sowie der Grenze der Beurteilbarkeit von 5% begründet. In unserer Auswertung zeigten die Morphologie und die Immunphänotypisierung an Tag 28 eine hohe Korrelation (Spearman Korrelationskoeffizient $r = 0,71$, $p < 0,0001$). Erwähnenswert ist, dass es sich bei beiden Methoden um die gleichen Untersucher handelte und diese die jeweiligen Ergebnisse kannten. Bei unklarem morphologischem Befund wurde die Immunphänotypisierung als Ergänzung hinzugezogen. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen wiesen Inaba et al. eine schlechte Korrelation der drei Untersuchungsmethoden Morphologie, Immunphänotypisierung und PCR-Amplifizierung nach. Allerdings bleibt unklar, ob die Untersucher der jeweiligen Methoden dieselben Personen waren und ob sie die jeweiligen Untersuchungsergebnisse der einzelnen Methoden kannten. Des Weiteren zeigten in Inabas Auswertung sowohl die Morphologie als auch die Molekulargenetik keinen Einfluss hinsichtlich der Prognose (Inaba et al., 2012). In der St. Jude AML02 Studie waren 17% der morphologischen Proben hinsichtlich ihrer Morphologie nicht zu interpretieren und in 9,5% zeigten sich in der morphologischen Untersuchung keine leukämischen Blasten, während in der Immunphänotypisierung Blasten nachgewiesen werden konnten.

Loken et al. wiesen in ihrer Auswertung der Children's Oncology Group AML Protokoll AAML03P1 ($n=249$) ebenfalls bei 25% der Patienten ($n=46$), die morphologisch eine CR nach der 1.Induktion erreicht hatten, eine MRD von $< 0,1\%$ - $> 5\%$ Blasten nach. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen.

In unserer Untersuchung lagen immunphänotypisch bei 24% ($n=46$) der Patienten $> 2\%$ Blasten an Tag 28 vor, welche in der Morphologie nicht nachgewiesen werden konnten. Bei 2% ($n= 4$) der 192 Patienten konnten an Tag 28 ausschließlich bei der morphologischen Beurteilung $> 5\%$ Blasten festgestellt werden. Dies ist unter anderem mit der Probenqualität zu erklären z.B. durch die Blutverdünnung. Campana stellte die Frage der Relevanz der morphologischen Untersuchung vor allem unter dem Gesichtspunkt der auftretenden Differenzen zwischen dem Fehlen von Blasten in der Morphologie und dem Nachweis in der Immunphänotypisierung. Des Weiteren stellte er dar, dass die Anzahl der Blasten $</> 5\%$, die man morphologisch detektiert, keine signifikante Auswirkung auf das EFS haben, sondern dass das Vorliegen von MRD-Positivität oder MRD-Negativität entscheidend ist (Campana und Coustan-Smith, 2012). Inaba et al. gingen ebenfalls davon aus, dass die Anzahl der Blasten in der Morphologie von $< 5\%$ und $\geq 5\%$ keinen Einfluss in Bezug auf das EFS hat. Sievers et al. hingegen zeigten in der AML Studie 2961 der Children's Oncology Group, dass das Vorliegen von $>15\%$ Blasten morphologisch nach der ersten Induktion in der univariaten Auswertung die

Vorhersage eines Rezidivs anzeigte, während es in der multivariaten Auswertung keine Signifikanz erreichte (Sievers et al., 2003). Auch in unserer morphologischen Untersuchung zeigten sich signifikante Unterschiede bzgl. pEFS, pOS und der CI Rez. für Kinder ohne Blasten an Tag 28 und solchen mit erhöhter Blastenzahl (siehe Kapitel 4.4, Abbildung 10, 11 und 12). Die Abhängigkeit des pEFS von der Höhe der Blastenzahl zu verschiedenen Zeitpunkten im Therapieverlauf beschrieben Langebrake et al. ebenfalls (Langebrake et al., 2006).

Weitere Studiengruppen wie z.B. die skandinavische NOPHO nutzen die Morphologie hauptsächlich für das Therapieansprechen an Tag 15 und zur weiteren Therapiestratifizierung, allerdings ebenfalls unter Zuhilfenahme der Immunphänotypisierung (Abrahamsson et al., 2011).

Walter et al. wiesen in einer retrospektiven Studie mit Patienten aller Altersgruppen (6 Monate bis 69,5 Jahre alt) bei 19,4% bzw. 24,4% der Patienten eine MRD in der Immunphänotypisierung nach, welche morphologisch als frei von leukämischen Blasten bzw. sich in CR befindlich galten. Diese Patienten erhielten alle in CR eine SZT. Das Vorliegen einer MRD vor SZT stellte sich als unabhängiger prognostischer Faktor heraus bzw. war mit einer höheren Rezidivwahrscheinlichkeit und einer schlechteren Prognose assoziiert (Walter et al., 2013; Walter et al., 2014).

Sowohl die holländische DCOG ANLL97 Studie als auch die britische MRC AML12 Studie stuften die Morphologie als zu subjektiv und zu wenig sensitiv ein und nutzten für die MRD Überwachung die Immunphänotypisierung und PCR Diagnostik (Rubnitz et al., 2010). Langebrake et al. hingegen wiesen nach, dass Morphologie und Immunphänotypisierung für die Verlaufsuntersuchung Tag 15 und Tag 28 zusammen mehr Aussagekraft besitzen als jede für sich allein genommen (Langebrake et al., 2006).

Zusammenfassend wird international der Morphologie allein in der Überwachung des Krankheitsverlaufes nicht mehr der gleiche Stellenwert gegeben und immer mehr finden die Immunphänotypisierung und/oder RT-PCR als Ergänzung oder alleiniger Ersatz Anwendung (DiNardo und Luger, 2012; Roug et al., 2014). Eine ähnliche Entwicklung gab es auch in unseren AML-BFM Therapiestudien 1998 und 2004. Nicht nur die Immunphänotypisierung, sondern auch die Zytogenetik und Molekulargenetik dienen neben der Einteilung in die Risikogruppen zusätzlich der Beurteilung des Therapieansprechens im Verlauf. Bei erfahrenen Untersuchern hat jedoch die morphologische Beurteilung weiterhin einen hohen Stellenwert, was sich in unseren Ergebnissen widerspiegelt.

5.2 Beurteilung der MRD durch die Immunphänotypisierung

Unterscheidung der Blastenpopulationen an Tag 28

Die Immunphänotypisierung hat sich u.a. aufgrund ihrer guten Anwendbarkeit als Methode zur Untersuchung der MRD etabliert. Nahezu alle Patienten weisen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung einen leukämie-assoziierten Immunphänotyp auf (Rubnitz et al. 94,9% (Rubnitz et al., 2010); van der Velden 94% (van der Velden et al., 2010), Coustan-Smith 85% (Coustan-Smith et al., 2003).

Daher findet die Immunphänotypisierung sowohl in den pädiatrischen AML-Studien als auch in den Studien zur AML im Erwachsenenalter breite Anwendung (Kern et al., 2008; van Rhenen et al., 2007). Allerdings bestehen hinsichtlich der Durchführung noch deutliche Unterschiede (van der Velden et al., 2010).

Unzureichend ist bislang die Definition eindeutiger Standards in der Diagnostik (Kaspers und Zwaan, 2007). Dies macht sich bei der Verwendung verschiedener Antikörper-Klone, unterschiedlicher Fluoreszenz-Farbstoffe sowie der variablen Messtechnik der einzelnen Geräte bemerkbar.

In unserem Untersuchungsprotokoll betrug die Anzahl der gemessenen Zellen pro Untersuchung 100.000. Eine zeitliche Begrenzung der Untersuchung bei einer sehr zellarmen Probe limitierte die Anzahl der gemessenen Zellen minimal auf 30.000 pro Untersuchung. Dies wiederum begründet den im Vergleich zu anderen Gruppen hohen Grenzwert von >2% Blasten. Campana et al. verwendeten eine Zellzahl von 1 Mio. pro Untersuchung und konnten somit den Grenzwert deutlich niedriger bei 0,1% Blasten festlegen. Bei der Children`s Cancer Group betrug die Anzahl gemessener Zellen pro Untersuchung 200.000. Die Gruppe definierte den Grenzwert für die MRD bei $\geq 0,5\%$ Blasten.

Des Weiteren steht der Zeitpunkt zur Beurteilung des Therapieansprechens im Fokus der Studien. In den meisten Fällen werden die Zeitpunkte nach der Induktion und vor der Konsolidierung untersucht (Abrahamsson et al., 2011; Inaba et al., 2012; Rubnitz et al., 2010; Sievers et al., 2003). Im Rahmen der AML-BFM Studien 1998 und 2004 wurde bisher für das morphologische Ansprechen der Tag 15 nach der 1.Induktion untersucht. Aufgrund der an Tag 15 nur wenig fortgeschrittenen Zellregeneration war eine Beurteilung hinsichtlich einer kompletten Remission (CR) nicht vorgesehen.

In dieser Arbeit lag das Hauptaugenmerk hingegen auf dem Tag 28 nach der 1. und vor der 2. Induktion. Wie von Langebrake 2006 beschrieben, ist es sinnvoll, das Therapieansprechen zu mehreren Zeitpunkten der Therapie zu erheben (Langebrake et al., 2006). Inaba et al wiesen nach, dass das Vorliegen einer minimalen Resterkrankung nach der 2. Induktion mit einem niedrigeren EFS und einer höheren Rezidivrate

einhergeht als nach der 1. Induktion (Inaba et al., 2012). Im Vergleich dazu wurden in der holländischen DCOG ANLL97 Studie und der britischen MRC AML12 Studie 94 Kinder mit einer AML hinsichtlich ihrer MRD untersucht. Untersuchungszeitpunkte waren nach der 1.Induktion (TP2), nach der 2. Induktion (TP3) sowie nach der Intensivierung (TP4) und der Konsolidierung (TP5). Für den zweiten Zeitpunkt (TP2) wurde eine prognostische Signifikanz für das rezidivfreie Überleben (RFS) und das Gesamtüberleben (OS) nachgewiesen, wohingegen sich keine Signifikanz hinsichtlich der späteren 3 Zeitpunkte (TP3, TP4, TP5) zeigte. Die Autoren räumten ein, dass dies durch die kleinere Probenanzahl bedingt sein könne (van der Velden et al., 2010).

Darüber hinaus bietet die Unterscheidung zwischen leukämischen und regenerativen Blasten in der Immunphänotypisierung eine Möglichkeit zu ergründen, warum es Patienten gibt, die nach der Induktionstherapie > 5% Blasten aufweisen und im Verlauf kein Rezidiv bekommen und wiederum Patienten mit gleicher Blastenzahl nach der Induktion ein Frührezidiv erleiden bzw. im Verlauf rezidivieren (Sievers et al., 2003). Bisher hat keine andere Studiengruppe die Differenzierung zwischen regenerativen und leukämischen Blasten beschrieben. Als regenerativ wurden Blasten bei dem Vorliegen von Stammzellantigenen CD 117, CD 34 sowie dem Antigen CD 38 für Proliferation definiert. Weitere Kriterien waren die Abgrenzung zum initialen Expressionsmuster und das Fehlen aberranter Antigene.

In unserer Untersuchung zeigten sich bei 18% (n=35) immunphänotypisch > 2% Blasten an Tag 28, welche aufgrund ihrer Antikörperexpressionsmuster als regenerativ beurteilt wurden. Patienten mit regenerativen Blasten an Tag 28 fanden sich v.a. in der Standardrisikogruppe. Des Weiteren wiesen diese Patienten prozentual den höchsten Anteil positiver Prognosefaktoren in der Molekular-/Zytogenetik auf. Sie sind mit durchschnittlich 4,8 Jahren deutlich jünger als das Durchschnittsalter der Gesamtgruppe mit 7,3 Jahren.

Darum ist es wichtig, diese Patientengruppe zu ermitteln und ihnen eine angepasste Therapie zukommen zu lassen. Bei diesen Patienten ist eher keine intensivere Therapie notwendig und sie können somit von einer nebenwirkungsärmeren Behandlung profitieren.

Insgesamt 19% (n=37) der Patienten zeigten morphologisch >5% Blasten und gleichzeitig in der Immunphänotypisierung > 2% Blasten an Tag 28.

Somit waren 45% (n=87) der 192 Patienten MRD positiv nach der 1.Induktion. In den anderen Studiengruppen waren 13-66% der Patienten MRD positiv, wobei die unterschiedlichen Grenzwerte und Zeitpunkte zu berücksichtigen sind. Inaba et al. wiesen bei 37% der Patienten nach der 1.Induktion $\geq 0,1\%$ Blasten nach. Sie untersuchten als

weiteren Zeitpunkt den MRD Status nach der 2.Induktion. Insgesamt waren zu diesem Zeitpunkt 20% (n=39) MRD positiv. Sievers et al. wiesen bei nur 13% der Patienten nach der 1.Induktion $\geq 0,5\%$ Blasten nach. In der Hochdosis-Cytarabin-Gruppe waren nach der 1.Induktion 34% MRD positiv mit $\geq 0,1\%$ Blasten und in der Niedrigdosis-Cytarabin-Gruppe 42% der Patienten in der AML02 Studie von Rubnitz et al. Van der Velden et al. wiesen bei 66% (n=38) der Patienten $\geq 0,1\%$ Blasten nach der 1.Induktion und somit MRD Positivität nach.

Der Zeitpunkt nach der 1. Induktion entspricht dem von uns gewähltem Tag 28. Dieser Tag ist wie auch die Ergebnisse anderer gezeigt haben gut gewählt, um das Therapieansprechen bzw. das Vorliegen einer minimalen Resterkrankung zu beurteilen. Zu diesem Zeitpunkt ist die Zellregeneration bereits weiter vorangeschritten als z.B am Tag 15 an einem früheren Zeitpunkt nach der 1. Induktion.

Es zeigte sich in unserer immunphänotypischen Untersuchung der 192 Patienten kein signifikanter Unterschied für das pEFS, das pOS und die CI für ein Rezidiv bzgl. des Vorliegens von $\leq 2\%$ Blasten an Tag 28 in der Immunphänotypisierung im Vergleich zu $> 2\%$ Blasten (siehe Kapitel 4.3). Allerdings ist zu beachten, dass in der AML-BFM Studie 2004 seit dem Jahr 2006 für viele Patienten mit dem Vorliegen einer minimalen Resterkrankung an Tag 28 eine Änderung in der Therapie erfolgte (siehe Kapitel 4.7).

Inaba et al. hingegen zeigten in ihrer AML 02 Studie, dass das EFS und OS signifikant vom MRD-Level nach der 1.Induktion in der Immunphänotypisierung abhängig sind (Rubnitz et al., 2010). Es erfolgte eine Unterteilung in $< 0,1\%$ Blasten, $0,1\%-1\%$ Blasten und $>1\%$ Blasten in der Immunphänoypisierung. Ab $> 0,1\%$ Blasten lag eine MRD-Positivität vor. MRD negative Patienten und Patienten mit einem MRD-Level von $0,1-1\%$ nach der 1.Induktion zeigten das gleiche Therapieergebnis, wohingegen sich die CI für eine Rezidiv hinsichtlich der MRD negativen Patienten und Patienten mit einem MRD-Level von $0,1-1\%$ signifikant zu den Patienten mit einem MRD-Level $> 1\%$ unterschied ($49,2\%$ vs. $16,7\%$; $p<0,0001$). Die AML 02 Studiengruppe nahm ähnlich wie in unserem Studienprotokoll Stratifizierungen und Therapieanpassung in Bezug auf die MRD, das MRD-Level und das Therapieansprechen vor (siehe Kapitel 5.3).

Leider finden sich keine Angaben zu der gemessenen Zellzahl im FACS, den verwendeten Antikörpern und ob es sich um ein 4-Farben-Panel gehandelt hat. Somit ist die Vergleichbarkeit der Messmethoden erschwert.

Die Arbeitsgruppe um Van der Velden wies in Bezug auf die DCOGANLL97/MRC AML 12 Studien (n=94) nach, dass MRD negative Patienten (n=20; 34%) nach der 1. Induktion

(TP2) ein signifikant höheres 3-Jahres rezidivfreies Überleben (RFS) und 3-Jahres OS als MRD positive Patienten haben (van der Velden et al., 2010).

Die Studiengruppe verwendete ähnliche LAIPs (CD2, CD7, CD56; CD34+, CD11b+; CD19). In 80% der Fälle konnten 1 Mio. Events ausgezählt werden; bei allen Patienten mind. 100.000 Zellen. Dies begründet die Untergrenze von < 0,01% bzw. 0,1%. Es handelte sich ebenfalls um ein 4-Farben- Panel. Hervorzuheben ist, dass keine Umstratifizierung aufgrund des MRD-Status stattfand.

Sievers et al. fanden in ihrer Untersuchung die CCG2914/2961 Studien (n=252) betreffend heraus, dass in der multivariaten Analyse das relative Risiko für EFS 4,8-fach höher (95% CI = 2,8 – 8,4, p=0,0001) und 3,1-fach höher (95% CI 1,9 – 5,1, p=0,0001) war zu sterben, wenn eine minimale Resterkrankung (MRD) vorlag. Das OS für 3 Jahre unterschied sich ebenfalls signifikant für Patienten ohne MRD gegenüber den Patienten mit MRD nach der Konsolidierungstherapie (p=0,0058) (Sievers et al., 2003). Der Cut off lag bei $\geq 0,5\%$ Blasten und pro Untersuchung wurden 10 000 events gezählt. Es handelte sich um ein 3-Farben-Panel mit einer ähnlichen Antikörperauswahl wie unserer (CD45, HLA-DR, CD5, CD38, CD15, CD16, CD 14, CD7, CD11b, CD19, CD13, CD34, CD33, CD56). Es gab zwei Untersucher, welchen weitere diagnostische und klinische Ergebnisse nicht bekannt waren. Es wurde unabhängig voneinander untersucht. In 2% kam es zu unterschiedlichen Ergebnissen, In diesen Fällen besprachen sich die Untersucher und legten ein gemeinsames Ergebnis fest.

In der aktuelleren Untersuchung der Children's Oncology Group von Loken et al. bzgl. des Therapieprotokolls AAML03P1 (n=249) lag der Cut off bei < 0,1% Blasten, Deutliche Erweiterung und Änderung der Antikörper-Auswahl im 4-Farben-Panel (CD34, CD45, HLA-DR, L243, CD36, FA6.152, M ϕ /P9, 4H9, D12, HB7, L138, P67.6, MY31, CD117, 104D2, CD49d, L25, 2D1, 8G12, CD38, CD15, CD14, CD11b, CD34, CD33, CD56). Die Messung erfolgte mit 200000 events. Die Befundung nahmen zwei unabhängige Untersucher vor, denen keine weiteren Informationen zu den Proben/Patienten vorlagen. In allen drei Therapieprotokollen der Children's Oncology Group wurde keine Stratifizierung aufgrund des MRD-Status durchgeführt.

Es ist anzunehmen, dass der Grund für die signifikanten Ergebnisse für EFS, OS und CI für ein Rezidiv in den Studiengruppen (Childrens Cancer group, AML02 St. Jude, DCOGANLL/97/MRC AML12) gegenüber unseren nicht signifikanten Ergebnissen in den deutlich niedrigeren Cut off Werten für die Immunphänotypisierung sowie der unterschiedlichen Methodik (die Untersucher kennen die Befunde der Morphologie vor

Befundung der Durchflusszytometrie nicht) liegt. Zudem wurde in der multivariaten Analyse das Ergebnis der Morphologie nicht berücksichtigt.

5.3 Therapieansprechen, Therapieverlauf und Therapiestratifizierung in Bezug auf das Vorliegen einer minimalen Resterkrankung

Betrachtet man die Beziehungen zwischen Therapieansprechen an Tag 28 und dem klinischen Verlauf (Abbildung 34, Kapitel 4.6) der 192 Patienten, für die sowohl die morphologischen als auch immunologischen Daten von Tag 28 vorlagen, so zeigt sich, dass sich die drei Patientengruppen (Blasten negativ/regenerativ/positiv an Tag 28) hinsichtlich der Prognose angleichen. So unterscheiden sich weder das pEFS noch die CI für ein Rezidiv signifikant.

In der Auswertung von Langebrake 2002 stellte sich dies noch anders dar (Auswertungszeitraum AML BFM Studie 1998 01.07.1998 – 31.03.2001). Langebrake wies nach, dass die Rezidivrate der MRD-positiven Kinder im Vergleich zu den MRD-negativen Kindern um das 1,8-fache erhöht war. In der aktuellen Auswertung haben sich die Rezidivraten der MRD-pos./MRD-neg. Kinder fast angeglichen: $34,9 \pm 5,2\%$ vs. $32,9 \pm 5,7\%$. Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass im Rahmen der AML-BFM Studie 2004 für den Zeitraum von 2006 - 2010 neben der Stratifizierung nach Prognosegruppen ebenfalls eine Therapiestratifizierung aufgrund des Therapieansprechens an Tag 15 bzw. Tag 28 vorgenommen wurde. Von den Patienten wurden 21% (n=30) bei schlechtem Therapieansprechen an Tag 15 und Tag 28 aus der Standardrisikogruppe in die Hochrisikogruppe umgruppiert und damit intensiver behandelt. Von diesen 30 Patienten erhielten 4 eine SZT in 1.CR. Weitere 45 Patienten aus der HR-Gruppe erhielten bei schlechtem Therapieansprechen an Tag 28 und im weiteren Therapieverlauf eine Therapieanpassung (vorgezogene 2.Induktion/Konsolidierung oder Therapie nach der Rezidiv-Studie). 38 dieser Patienten erhielten eine SZT, 31 von ihnen in 1.CR.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich das Gesamtüberleben für die Patienten mit gutem Therapieansprechen und günstiger/intermediärer genetischer Prognosegruppe bei Vergleich der Zeiträume 1998 - 2005 und 2006 - 2010 signifikant verbessert hat ($p=0,0002$). So überlebten in dieser Patientengruppe von 1998 - 2005 $57 \pm 5\%$ und 2006 - 2010 $86 \pm 3\%$. Noch deutlicher fällt das Ergebnis für die Patientengruppe mit ungünstiger Genetik und/oder schlechtem Therapieansprechen aus. So verbessert sich in dieser Patientengruppe das Gesamtüberleben signifikant. Es überleben von 1998 - 2005 $57 \pm 5\%$ der Patienten und 2006 - 2010 $77 \pm 4\%$ ($p=0,00003$).

Die NOPHO Studiengruppe führte ebenfalls eine Therapiestratifizierung nach dem Therapieansprechen gemessen an der Morphologie $< 5\%$ Blasten oder $\geq 5\%$ Blasten an Tag 15 nach der 1. Induktion durch. Unterstützend zur Morphologie wurde die Durchflusszytometrie verwendet, v.a. zur Remissionsbeurteilung (Details über die Methodik und Durchführung wurden nicht veröffentlicht). Es zeigten sich signifikante Unterschiede im pEFS hinsichtlich des Therapieansprechens. Die Patienten mit mittlerem Therapieansprechen hatten ein signifikant schlechteres Endergebnis als jene mit einem guten oder schlechten Therapieansprechen. Dies liegt möglicherweise daran, dass Patienten mit schlechtem Therapieansprechen häufiger eine Therapieänderung sowie eine Stammzelltransplantation erhielten. Bei Vorliegen eines MLL-Rearrangements erfolgte ebenfalls die Indikation zur SZT. Bezüglich des OS über 3 Jahre zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

In der AML02 Studie (St. Jude) wurde ebenfalls eine Therapieanpassung hinsichtlich des Therapieansprechens vorgenommen. Lag nach der 1. Induktion ein MRD $> 1\%$ Blasten vor, wurde die 2. Induktion vorgezogen. Bei MRD $> 0,1\%$ nach der 2. Induktion erfolgte eine Therapieanpassung dahingehend, dass die Patienten einen 3. Induktionsblock erhielten. Während des Beobachtungszeitraumes erfolgte eine Änderung im Therapieprotokoll, so dass kein 3. Induktionsblock mehr gegeben wurde, sondern nur noch bei MRD $> 1\%$ nach der 1. Induktion die 2. Induktion vorgezogen wurde. Patienten mit $> 25\%$ Blasten nach der 1. Induktion oder fortbestehender MRD nach drei Therapieblöcken kamen in die HR-Gruppe und erhielten somit die Indikation zur SZT. Das 3-Jahres OS unterscheidet sich für die Patienten der HR-Gruppe mit MRD $> 1\%$ dahingehend, dass von den Patienten mit SZT 43,5% überlebten gegenüber 23,1% ohne SZT (Rubnitz et al., 2010).

Somit zeigte sich nicht nur in unserer Untersuchung ein Effekt der MRD gesteuerten Therapieanpassung nach der 1. Induktion sowie im weiteren Verlauf.

Die Arbeitsgruppe um Van der Velden (DCOGANLL97/MRC AML 12 Studien) war eine der Arbeitsgruppen (neben der Children's Oncology Group), die keine Umstratifizierung in andere Risikogruppen aufgrund des MRD-Status durchführte. Patienten mit $>20\%$ Blasten nach der kompletten Induktion bzw. mit einem ungünstigen Karyotyp wurden in die „Poor-Risk“-Gruppe unserer Hochrisikogruppe entsprechend stratifiziert. Somit hatte das MRD-Level bzw. der MRD-Status keinen Einfluss auf die Therapieentscheidung.

Grundsätzlich hat es in der jüngeren Studiengeneration einige Weiterentwicklungen der Therapie gegeben (siehe Kapitel 3.3 und 3.4). In der AML-BFM Studie 2004 konnte zum Beispiel durch den Einsatz von liposomalem Daunorubicin eine Dosissteigerung ohne steigende Kardiotoxizität erreicht werden. Ebenso wurde der Erkenntnisgewinn aus der AML-BFM Studie 1998 umgesetzt, dass die Standardrisikogruppe von einer 2. Induktion mit HAM nicht profitiert hat und auf diesen Therapieblock verzichtet.

Zudem hat es in den letzten Jahren im europäischen Raum eine Entwicklung in der pädiatrischen Onkologie hin zu einer standardisierten Therapie in erfahrenen Zentren gegeben. Im Jahr 2006 hat in Deutschland der Gemeinsame Bundesausschuss die gesetzlichen Voraussetzungen für die Zulassung pädiatrisch-onkologischer Zentren festgelegt und zugleich die Behandlung auf diese Zentren beschränkt. Die definierten fachlichen und personellen Anforderungen sowie Anforderungen an die Organisation und Infrastruktur haben in Deutschland dazu geführt, dass derzeit 60 von 364 Kinderkliniken die pädiatrische-onkologische Therapie ausführen. Diese Reduzierung der Behandlungszentren auf erfahrene onkologische Zentren hat zu einer deutlichen Verbesserung der Behandlung geführt. Zusätzlich streben die Therapiestudien eine Optimierung der Supportivtherapie an. Anhand der Therapieprotokolle AML-BFM 1998 und 2004 kann man die zunehmende Standardisierung der Supportivtherapie erkennen. Ein großer Anteil der Therapieprotokolle widmet sich den supportiven Maßnahmen. Diese Einflussfaktoren aus geschultem Personal und Etablierung eines Therapiestandards in das Therapieprotokoll bezüglich einer Prophylaxe oder bei primären Komplikationen und akuten Infektionen während der Therapie, konnten die infektionsassoziierte Mortalität über die Jahre signifikant senken und sind somit hinsichtlich des zunehmenden Therapieerfolges zu berücksichtigen.

5.4 Schlussfolgerungen und Perspektiven

Für die Methode der Immunphänotypisierung besteht das Problem, dass Veränderungen der Antigenexpression der malignen Blasten während der Therapie die eindeutige Bestimmung residualer Blasten erschweren. Durch neuere Antikörper und erweiterte Kombinationen der Antikörper versucht man dies zu verbessern. Auch hängt die Methode von der Expertise des Untersuchers ab, so dass weiter an sicherer Auswertungssoftware und Standardisierung gearbeitet werden muss. Zu steigern ist auch noch die Größe der untersuchten Kollektive; diese liegen bislang zwischen 94 und 203 Patienten. Die AML ist in ihren Subtypen sehr heterogen, so dass eine Aussage hinsichtlich der Bedeutung einzelner Subtypen und weiterer Risikofaktoren wie der Zyto- und Molekulargenetik in Bezug auf die minimale Resterkrankung erschwert ist. Dennoch bietet die

Immunphänotypisierung eine Möglichkeit, das Vorliegen einer MRD festzustellen und so diejenigen Patienten, die eine intensiviertere Therapie brauchen von solchen zu unterscheiden, die eine weniger intensive Behandlung benötigen. Durch die Identifikation dieser Patienten kann die Behandlung individuell angepasst werden und dadurch bei der kumulativen Inzidenz für ein Rezidiv der einen Gruppe die Prognose verbessert werden und bei den anderen Patienten das Risiko therapieinduzierter Schäden zu erleiden verringert werden (Al Mawali et al., 2009; Creutzig et al., 2013; Goulden et al., 2006; van der Velden et al., 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der morphologisch gemessene Blastenanteil eine entscheidende Rolle zur Beurteilung des Therapieansprechens darstellt und diese in der Konsequenz in den meisten Studien eine Therapieanpassung (inkl. SZT) oder die Einteilung in die Risikogruppen nach sich zieht (Abrahamsson et al., 2011; Creutzig et al., 1990; Gibson et al., 2011; Hasle, 2014; Kern et al., 2008; Lange et al., 2008; Ravindranath et al., 2005; Tsukimoto et al., 2009). Die Immunphänotypisierung ist für das MRD-Monitoring die Methode der Wahl durch ihre hohe Anwendbarkeit, Sensitivität und Objektivität. Eine mögliche Zukunftsperspektive ist, zwei oder mehr unabhängige Methoden nebeneinander zum MRD-Monitoring anzuwenden, um so ein Maximum an Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Zudem lässt sich mit der Immunphänotypisierung wertvolle Information hinsichtlich der Prognose ableiten. Die Entwicklung neuer Marker-Kombinationen und Standardisierung der Immunphänotypisierung ist somit vordringlich (Rizzari et al., 2011).

6 Zusammenfassung

Der Nachweis der minimalen Resterkrankung (MRD) im Verlauf der ersten Behandlungszyklen gilt als wesentlicher prognostischer Faktor bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) und als ein entscheidender Parameter für eine optimierte risikoadaptierte Therapiestratifizierung. Diese Arbeit beschäftigt sich vorrangig mit der Immunphänotypisierung, da trotz einer hohen Sensitivität (10^{-5} - 10^{-6}) der PCR-Analyse AML-spezifische Marker bisher bei einem großen Teil der Patienten nicht vorhanden sind oder nicht durchgeführt werden können. Demgegenüber kann man mit Hilfe der multiparametrischen Immunphänotypisierung bei bis zu 90% der Patienten einen leukämieassoziierten Immunphänotyp detektieren. Für den Zeitraum vom 01.07.1998 bis 31.08.2009 konnten für 791 Patienten der AML BFM Studien 1998 und 2004 die Daten hinsichtlich des Therapieansprechens an Tag 28 ausgewertet werden. Bei 92 Patienten waren die Daten unvollständig oder die Patienten starben vor möglicher Beurteilung des Therapieansprechens, so dass für 699 Patienten morphologische Daten und für 192 immunologische Daten zu dem Tag 28 vorlagen. Die Morphologie und die Immunphänotypisierung an Tag 28 zeigten eine sehr gute Korrelation (Spearman Korrelationskoeffizient 0.71, $p < 0.0001$). Der Grenzwert für das Vorliegen einer minimalen Resterkrankung wurde bei $> 2\%$ leukämische Blasten in der Immunphänotypisierung festgelegt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Patienten mit $> 2\%$ Blasten und Patienten mit $\leq 2\%$ Blasten an Tag 28 bzgl. der geschätzten Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben (pEFS), der geschätzten Wahrscheinlichkeit für das Gesamtüberleben (pOS) und der kumulativen Inzidenz für das Erleiden eines Rezidivs (CI Rez.). Bei 18% der Patienten ($n = 35$) ließen sich an Tag 28 in der Immunphänotypisierung regenerative Blasten nachweisen. Eine Therapieanpassung erfolgte im Rahmen der AML-BFM Studie 2004 seit dem Jahr 2006. Aufgrund unzureichenden Therapieansprechens an Tag 15 und/oder an Tag 28 sowie dem Vorliegen einer prognostisch ungünstigen genetischen Aberration wurden in dem Zeitraum 2006-2010 30 Patienten von der Standardrisikogruppe ($n = 138$) in die Hochrisikogruppe stratifiziert. Von diesen Patienten erhielten 4 eine Stammzelltransplantation in erster Remission. Eine Therapieänderung erhielten 19 Patienten (8%) der Hochrisikogruppe ($n = 266$). 38 dieser Patienten erhielten eine Stammzelltransplantation. Durch die Therapieanpassung ab 2006 hat sich nicht nur eine Angleichung des pEFS, pOS und CI Rez. über 5 Jahre der Patienten mit oder ohne Nachweis einer MRD vollzogen, sondern es ist auch eine Annäherung der Standard- und Hochrisikogruppe in Hinblick auf das pEFS und pOS erfolgt. Die angepasste Therapiestratifizierung hat die prognostische Signifikanz der Blastenpersistenz aufgehoben und zur Verbesserung des Überlebens beigetragen.

7 Literaturverzeichnis

1. Abdelhaleem, M. (2007):
Frequent but Nonrandom Expression of Myeloid Markers on De Novo Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia.
Exp.Mol.Pathol. 83(1), 138-41.
2. Abrahamsson, J., Forestier, E., Heldrup, J., Jahnukainen, K., Jonsson, O. G., Lausen, B., Palle, J., Zeller, B., and Hasle, H. (2011):
Response-Guided Induction Therapy in Pediatric Acute Myeloid Leukemia With Excellent Remission Rate.
J.Clin.Oncol. 29(3), 310-5.
3. Al Mawali, A., Gillis, D., Hissaria, P., and Lewis, I. (2008):
Incidence, Sensitivity, and Specificity of Leukemia-Associated Phenotypes in Acute Myeloid Leukemia Using Specific Five-Color Multiparameter Flow Cytometry. *Am.J.Clin.Pathol.* 129(6), 934-45.
4. Al Mawali, A., Gillis, D., and Lewis, I. (2009):
The Use of Receiver Operating Characteristic Analysis for Detection of Minimal Residual Disease Using Five-Color Multiparameter Flow Cytometry in Acute Myeloid Leukemia Identifies Patients With High Risk of Relapse.
Cytometry B Clin.Cytom. 76(2), 91-101.
5. Bacher, U., Haferlach, C., Schnittger, S., Kern, W., Kroeger, N., Zander, A. R., and Haferlach, T.(2009):
Interactive Diagnostics in the Indication to Allogeneic SCT in AML.
Bone Marrow Transplant. 43(10), 745-56.
6. Barber, L. M., McGrath, H. E., Meyer, S., Will, A. M., Birch, J. M., Eden, O. B., and Taylor, G. M. (2003):
Constitutional Sequence Variation in the Fanconi Anaemia Group C (FANCC) Gene in Childhood Acute Myeloid Leukaemia.
Br.J.Haematol. 121(1), 57-62.
7. Bochennek K, Hassler A, Perner C, Gilfert J, Schöning S, Klingebiel T, Reinhardt D, Creutzig U, Lehrnbecher T. (2016):
Infectious complications in children with acute myeloid leukemia: decreased mortality in multicenter trial AML-BFM 2004
Blood Cancer J. 6(1): e382.
8. Buccisano, F., Maurillo, L., Spagnoli, A., Del Principe, M. I., Ceresoli, E., Lo, Coco F., Arcese, W., Amadori, S., and Venditti, A. (2009):
Monitoring of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia.
Curr.Opin.Oncol. 21(6), 582-8.
9. Campana, D. (2010):
Progress of Minimal Residual Disease Studies in Childhood Acute Leukemia.
Curr.Hematol.Malig.Rep 5(3), 169-76.

10. Campana, D. (2008):
Status of Minimal Residual Disease Testing in Childhood Haematological Malignancies.
Br.J.Haematol. 143(4), 481-9.

11. Campana, D. and Coustan-Smith, E. (2012):
Measurements of Treatment Response in Childhood Acute Leukemia.
Korean J.Hematol. 47(4), 245-54.
12. Coustan-Smith, E., Ribeiro, R. C., Rubnitz, J. E., Razzouk, B. I., Pui, C. H., Pounds, S., Andreansky, M., Behm, F. G., Raimondi, S. C., Shurtleff, S. A., Downing, J. R., and Campana, D. (2003):

Clinical Significance of Residual Disease During Treatment in Childhood Acute Myeloid Leukaemia.
Br.J.Haematol. 123(2), 243-52.

13. Creutzig, U., Zimmermann, M., Dworzak, M. N., Ritter, J., Schellong, G., and Reinhardt, D. (2013):
Development of a Curative Treatment Within the AML-BFM Studies.
Klin.Padiatr. 225 Suppl 1, 79-86.

14. Creutzig, U., Zimmermann, M., Ritter, J., Reinhardt, D., Hermann, J., Henze, G., Jurgens, H., Kabisch, H., Reiter, A., Riehm, H., Gadner, H., and Schellong, G.(2005):
Treatment Strategies and Long-Term Results in Paediatric Patients Treated in Four Consecutive AML-BFM Trials.
Leukemia 19(12), 2030-42.

15. Creutzig, U.; Reinhardt, D.(2005):
Multizentrische Therapieoptimierungsstudie AML-BFM 2004 zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie bei Kindern und Jugendlichen.
Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie: Therapieprotokoll; Anhang 61.

16. Creutzig, U., Ritter, J., and Schellong, G. (1990):
Identification of Two Risk Groups in Childhood Acute Myelogenous Leukemia After Therapy Intensification in the Study AML-BFM-83 As Compared With Study AML-BFM-78.
Blood 75, 1932-40.

17. Creutzig, U., Zimmermann, M., Bourquin, J. P., Dworzak, M. N., Fleischhack, G., Graf, N., Klingebiel, T., Kremens, B., Lehrnbecher, T., von Neuhoff, C., Ritter, J., Sander, A., Schrauder, A., von Stackelberg, A., Stary, J., and Reinhardt, D. (2013):
Randomized Trial Comparing Liposomal Daunorubicin With Idarubicin As Induction for Pediatric Acute Myeloid Leukemia: Results From Study AML-BFM 2004.
Blood 122(1), 37-43.

18. Creutzig, U., Zimmermann, M., Ritter, J., Henze, G., Graf, N., Löffler, H., and Schellong, G. (1999):
Definition of a Standard-Risk Group in Children With AML.
Br.J Haematol. 104(3), 630-9.
19. Deschler, B. and Lubbert, M. (2006):
Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology.
Cancer 107(9), 2099-107.
20. DiNardo, C. D. and Luger, S. M. (2012):
Beyond Morphology: Minimal Residual Disease Detection in Acute Myeloid Leukemia.
Curr.Opin.Hematol. 19(2), 82-8.
21. Downing, J. R. and Shannon, K. M. (2002):
Acute leukemia: a pediatric perspective
Cancer Cell. 2(6), 437-45.
22. Eden, T. (2010):
Aetiology of Childhood Leukaemia.
Cancer Treat.Rev. 36(4), 286-97.
23. Emerenciano, M., Koifman, S., and Pombo-de-Oliveira, M. S. (2007):
Acute Leukemia in Early Childhood.
Braz.J.Med.Biol.Res. 40(6), 749-60.
24. Gibson, B. E., Webb, D. K., Howman, A. J., de Graaf, S. S., Harrison, C. J., and Wheatley, K. (2011):
Results of a Randomized Trial in Children With Acute Myeloid Leukaemia: Medical Research Council AML12 Trial.
Br.J.Haematol. 155(3), 366-76.
25. Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A., and Goldstone, A. (1998):
The Importance of Diagnostic Cytogenetics on Outcome in AML: Analysis of 1,612 Patients Entered into the MRC AML 10 Trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties.
Blood 92(7), 2322-33.
26. Grimwade, D. and Hills, R. K. (2009):
Independent Prognostic Factors for AML Outcome.
Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program. 385-95.
27. Grimwade, D. (2012):
The Changing Paradigm of Prognostic Factors in Acute Myeloid Leukaemia.
Best.Pract.Res.Clin.Haematol. 25(4), 419-25.
28. Grimwade, D., Ivey, A., and Huntly, B. J. (2016):
Molecular Landscape of Acute Myeloid Leukemia in Younger Adults and Its Clinical Relevance.
Blood 127(1), 29-41.
29. Goulden, N., Virgo, P., and Grimwade, D. (2006):
Minimal Residual Disease Directed Therapy for Childhood Acute Myeloid

- Leukaemia: the Time Is Now.
Br.J.Haematol. 134(3):273-82.
30. Hall, G. W. (2001):
Childhood Myeloid Leukaemias.
Best.Pract.Res.Clin.Haematol. 14(3), 573-91.
 31. Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K.,
Vardiman, J., Lister, T. A., and Bloomfield, C. D.(1999):
The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of
the Hematopoietic and Lymphoid Tissues.
Annals of Oncology 10(12), 1419-32.
 32. Hasle, H. A (2014):
Critical Review of Which Children With Acute Myeloid Leukaemia Need Stem Cell
Procedures.
Br.J.Haematol. 166(1), 23-33.
 33. Ho, P. A., Alonzo, T. A., Gerbing, R. B., Pollard, J., Stirewalt, D. L., Hurwitz, C.,
Heerema, N. A., Hirsch, B., Raimondi, S. C., Lange, B., Franklin, J. L., Radich, J.
P., and Meshinchi, S. (2009):
Prevalence and Prognostic Implications of CEBPA Mutations in Pediatric Acute
Myeloid Leukemia (AML): a Report From the Children's Oncology Group.
Blood 113(26), 6558-66.
 34. Inaba, H., Coustan-Smith, E., Cao, X., Pounds, S. B., Shurtleff, S. A., Wang, K. Y.,
Raimondi, S. C., Onciu, M., Jacobsen, J., Ribeiro, R. C., Dahl, G. V., Bowman, W.
P., Taub, J. W., Degar, B., Leung, W., Downing, J. R., Pui, C. H., Rubnitz, J. E.,
and Campana, D. (2012):
Comparative Analysis of Different Approaches to Measure Treatment Response in
Acute Myeloid Leukemia.
J.Clin.Oncol. 30(29), 3625-32.
 35. Ivey, A., Hills, R. K., Simpson, M. A., Jovanovic, J. V., Gilkes, A., Grech, A., Patel,
Y., Bhudia, N., Farah, H., Mason, J., Wall, K., Akiki, S., Griffiths, M., Solomon, E.,
McCaughan, F., Linch, D. C., Gale, R. E., Vyas, P., Freeman, S. D., Russell, N.,
Burnett, A. K., and Grimwade, D. (2016):
Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML.
N.Engl.J.Med. 374(5), 422-33.
 36. Kaatsch P, Spix C. (2015):
German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2015 (1980-2014). Institute of
Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University
Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz.
Online publication: [http://www.unimedizin-
mainz.de/fileadmin/kliniken/dkkr/pdf/jb/jb2009/jb09-2-Diagnosen.pdf](http://www.unimedizin-mainz.de/fileadmin/kliniken/dkkr/pdf/jb/jb2009/jb09-2-Diagnosen.pdf)
 37. Kaatsch P, Spix C, (2013):
German Childhood Cancer Registry - Report 2012 (1980-2012). Institute of
Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University
Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz.
Online publication:
[http://www.kinderkrebsregister.de/fileadmin/kliniken/dkkr/pdf/jb/jb2012/jb2012_final
_s.pdf](http://www.kinderkrebsregister.de/fileadmin/kliniken/dkkr/pdf/jb/jb2012/jb2012_final_s.pdf).

38. Kaatsch, P. and Mergenthaler, A. (2008):
Incidence, Time Trends and Regional Variation of Childhood Leukaemia in Germany and Europe.
Radiat.Prot.Dosimetry. 132(2), 107-13.
39. Kaatsch, P.(2010):
Epidemiology of Childhood Cancer.
Cancer Treat.Rev. 36(4), 277-85.
40. Kaspers, G. J. and Zwaan, C. M. (2007):
Pediatric Acute Myeloid Leukemia: Towards High-Quality Cure of All Patients.
Haematologica 92(11), 1519-32.
41. Kern, W., Haferlach, C., Haferlach, T., and Schnittger, S. (2008):
Monitoring of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia.
Cancer 112(1), 4-16.
42. Kern, W., Haferlach, T. (2005):
Quantification of Minimal Residual Disease by Multiparameter Flow Cytometry in Acute Myeloid Leukemia. From Diagnosis to Prognosis.
Med.Klin.(Munich) 100(1), 54-9.
43. Kern, W., Bacher, U., Haferlach, C., Schnittger, S., and Haferlach, T. (2010):
The Role of Multiparameter Flow Cytometry for Disease Monitoring in AML.
Best.Pract.Res.Clin.Haematol. 23(3), 379-90.
44. Klusmann, J. H., Reinhardt, D., Hasle, H., Kaspers, G. J., Creutzig, U., Hahlen, K., van den Heuvel-Eibrink MM, and Zwaan, C. M. (2007):
Janus Kinase Mutations in the Development of Acute Megakaryoblastic Leukemia in Children With and Without Down's Syndrome.
Leukemia 21, 1584-7.
45. Krstovski, N., Tomic, N., Janic, D., Dokmanovic, L., Kuzmanovic, M., Spasovski, V., and Pavlovic, S. (2010):
Incidence of FLT3 and Nucleophosmin Gene Mutations in Childhood Acute Myeloid Leukemia: Serbian Experience and the Review of the Literature.
Med.Oncol. 27(3), 640-5.
46. Lange, B. J., Smith, F. O., Feusner, J., Barnard, D. R., Dinndorf, P., Feig, S., Heerema, N. A., Arndt, C., Arceci, R. J., Seibel, N., Weiman, M., Dusenbery, K., Shannon, K., Luna-Fineman, S., Gerbing, R. B., and Alonzo, T. A. (2008):
Outcomes in CCG-2961, a Children's Oncology Group Phase 3 Trial for Untreated Pediatric Acute Myeloid Leukemia: a Report From the Children's Oncology Group.
Blood 111(3), 1044-53.
47. Langebrake, C., Brinkmann, I., Teigler-Schlegel, A., Creutzig, U., Griesinger, F., Puhlmann, U., and Reinhardt, D.
Immunophenotypic Differences Between Diagnosis and Relapse in Childhood AML: Implications for MRD Monitoring.
Cytometry B Clin.Cytom. 63B(1), 1-9.
48. Langebrake, C., Creutzig, U., Dworzak, M., Hrusak, O., Mejstrikova, E., Griesinger, F., Zimmermann, M., and Reinhardt, D. (2006):
Residual Disease Monitoring in Childhood Acute Myeloid Leukemia by

- Multiparameter Flow Cytometry: the MRD-AML-BFM Study Group.
J.Clin.Oncol. 24(22), 3686-92.
49. Loken, M. R., Alonzo, T. A., Pardo, L., Gerbing, R. B., Raimondi, S. C., Hirsch, B. A., Ho, P. A., Franklin, J., Cooper, T. M., Gamis, A. S., and Meshinchi, S. (2012): Residual Disease Detected by Multidimensional Flow Cytometry Signifies High Relapse Risk in Patients With De Novo Acute Myeloid Leukemia: a Report From Children's Oncology Group.
Blood 120(8), 1581-8.
 50. Mallol-Mesnard, N., Menegaux, F., Auvrignon, A., Auclerc, M. F., Bertrand, Y., Nelken, B., Robert, A., Michel, G., Margueritte, G., Perel, Y., Mechinaud, F., Bordigoni, P., Leverger, G., Baruchel, A., Hemon, D., and Clavel, J. (2007): Vaccination and the Risk of Childhood Acute Leukaemia: the ESCALE Study (SFCE). *Int.J.Epidemiol.* 36(1), 110-6.
 51. Mandrell, B. N., Pritchard, M. (2006): Understanding the Clinical Implications of Minimal Residual Disease in Childhood Leukemia.
J.Pediatr.Oncol.Nurs. 23(1), 38-44.
 52. Manola, K. N. (2009): Cytogenetics of Pediatric Acute Myeloid Leukemia.
Eur.J.Haematol. 83(5), 391-405
 53. Marcucci, G., Haferlach, T., and Dohner, H. (2011): Molecular Genetics of Adult Acute Myeloid Leukemia: Prognostic and Therapeutic Implications.
J.Clin.Oncol. 29(5), 475-86.
 54. Margolin, J. F. (2011): Molecular Diagnosis and Risk-Adjusted Therapy in Pediatric Hematologic Malignancies: a Primer for Pediatricians.
Eur.J.Pediatr. 170(4), 419-25.
 55. Marschalek, R. (2011): Mechanisms of Leukemogenesis by MLL Fusion Proteins.
Br.J.Haematol. 152(2):141-54.
 56. Menegaux, F., Ripert, M., Hemon, D., and Clavel, J. (2007): Maternal Alcohol and Coffee Drinking, Parental Smoking and Childhood Leukaemia: a French Population-Based Case-Control Study.
Paediatr.Perinat.Epidemiol. 21(4), 293-9.
 57. Meshinchi, S. and Arceci, R. J. (2007): Prognostic Factors and Risk-Based Therapy in Pediatric Acute Myeloid Leukemia.
Oncologist. 12(3), 341-55.
 58. Miyagawa, K., Hayashi, Y., Fukuda, T., Mitani, K., Hirai, H., and Kamiya, K. (1999): Mutations of the WT1 Gene in Childhood Nonlymphoid Hematological Malignancies. *Genes Chromosomes. Cancer* 25(2), 176-83.
 59. Molgaard-Hansen, L., Glosli, H., Jahnukainen, K., Jarfelt, M., Jonmundsson, G. K., Malmros-Svennilson, J., Nysom, K., and Hasle, H. (2011):

- Quality of Health in Survivors of Childhood Acute Myeloid Leukemia Treated With Chemotherapy Only: a NOPHO-AML Study.
Pediatr.Blood Cancer 57(7), 1222-9.
60. Nentwich, H. J. (2010):
KiKK Study of the German Childhood Cancer Registry. Statement From the Environmental Commission of the German Academy of Pediatrics.
Monatsschrift Kinderheilkunde 158(1), 57-62.
 61. Ossenkoppele, G. J., van de Loosdrecht, A. A., and Schuurhuis, G. J. (2011):
Review of the Relevance of Aberrant Antigen Expression by Flow Cytometry in Myeloid Neoplasms.
Br.J.Haematol. 153(4), 421-36.
 62. Podvin, D., Kuehn, C. M., Mueller, B. A., and Williams, M. (2006):
Maternal and Birth Characteristics in Relation to Childhood Leukaemia.
Paediatr.Perinat.Epidemiol. 20(4), 312-22.
 63. Pui, C. H., Carroll, W. L., Meshinchi, S., and Arceci, R. J. (2011):
Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: an Update.
J.Clin.Oncol. 29(5), 551-65.
 64. Radhi, M., Meshinchi, S., and Gamis, A. (2010):
Prognostic Factors in Pediatric Acute Myeloid Leukemia.
Curr.Hematol.Malig.Rep. 5(4), 200-6.
 65. Ravindranath, Y., Chang, M., Steuber, C. P., Becton, D., Dahl, G., Civin, C., Camitta, B., Carroll, A., Raimondi, S. C., and Weinstein, H. J. (2005):
Pediatric Oncology Group (POG) Studies of Acute Myeloid Leukemia (AML): a Review of Four Consecutive Childhood AML Trials Conducted Between 1981 and 2000.
Leukemia 19(12), 2101-16.
 66. Reinhardt, D., Kurzknabe, E., Löffler, H., and Creutzig, U. (2004):
Akute Leukämien Im Kindesalter mit besonderer Berücksichtigung der morphologischen Diagnostik.
Pädiatrische Praxis. 64(3), 395-418.
 67. Reinhardt, D., von Neuhoff, C., Sander, A., and Creutzig, U. (2012):
Genetic Prognostic Factors in Childhood Acute Myeloid Leukemia.
Klin.Padiatr. 224(6), 372-6.
 68. Ribeiro, R. C., Razzouk, B. I., Pounds, S., Hijiya, N., Pui, C. H., and Rubnitz, J. E. (2005):
Successive Clinical Trials for Childhood Acute Myeloid Leukemia at St Jude Children's Research Hospital, From 1980 to 2000.
Leukemia 19(12), 2125-9.
 69. Rizzari, C., Cazzaniga, G., Coliva, T., De Angelis, C., and Conter, V. (2011):
Predictive Factors of Relapse and Survival in Childhood Acute Myeloid Leukemia: Role of Minimal Residual Disease.
Expert.Rev.Anticancer Ther. 11(9), 1391-401.
 70. Roug, A. S., Larsen, H. O., Nederby, L., Just, T., Brown, G., Nyvold, C. G., Ommen, H. B., and Hokland, P. (2014):

- HMICL and CD123 in Combination With a CD45/CD34/CD117 Backbone - a Universal Marker Combination for the Detection of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukaemia.
Br.J.Haematol. 164(2), 212-22.
71. Rubnitz, J. E., Inaba, H., Dahl, G., Ribeiro, R. C., Bowman, W. P., Taub, J., Pounds, S., Razzouk, B. I., Lacayo, N. J., Cao, X., Meshinchi, S., Degar, B., Airewele, G., Raimondi, S. C., Onciu, M., Coustan-Smith, E., Downing, J. R., Leung, W., Pui, C. H., and Campana, D. (2010):
Minimal Residual Disease-Directed Therapy for Childhood Acute Myeloid Leukaemia: Results of the AML02 Multicentre Trial.
Lancet Oncol. 11(6), 543-52.
 72. Sievers, E. L., Lange, B. J., Alonzo, T. A., Gerbing, R. B., Bernstein, I. D., Smith, F. O., Arceci, R. J., Woods, W. G., and Loken, M. R. (2003):
Immunophenotypic Evidence of Leukemia After Induction Therapy Predicts Relapse: Results From a Prospective Children's Cancer Group Study of 252 Patients With Acute Myeloid Leukemia.
Blood 101(9), 3398-406.
 73. Stevens, R. F., Hann, I. M., Wheatley, K., and Gray, R. G. (1998):
Marked Improvements in Outcome With Chemotherapy Alone in Paediatric Acute Myeloid Leukemia: Results of the United Kingdom Medical Research Council's 10th AML Trial. MRC Childhood Leukaemia Working Party.
Br.J.Haematol. 101(1), 130-40.
 74. Stubbs, M. C. and Armstrong, S. A. (2007):
FLT3 As a Therapeutic Target in Childhood Acute Leukemia.
Curr.Drug Targets. 8(6), 703-14.
 75. Takahashi, S. (2011):
Downstream Molecular Pathways of FLT3 in the Pathogenesis of Acute Myeloid Leukemia: Biology and Therapeutic Implications.
J.Hematol.Oncol. 4, 13.
 76. ter Bals, E. and Kaspers, G. J. (2005):
Treatment of Childhood Acute Myeloid Leukemia.
Expert.Rev.Anticancer Ther. 5(5), 917-29.
 77. Thiede, C., Koch, S., Creutzig, E., Steudel, C., Illmer, T., Schaich, M., and Ehninger, G. (2006):
Prevalence and Prognostic Impact of NPM1 Mutations in 1485 Adult Patients With Acute Myeloid Leukemia (AML).
Blood 107(10), 4011-20.
 78. Trka, J., Kalinova, M., Hrusak, O., Zuna, J., Krejci, O., Madzo, J., Sedlacek, P., Vavra, V., Michalova, K., Jarosova, M., and Stary, J. (2002):
Real-Time Quantitative PCR Detection of WT1 Gene Expression in Children With AML: Prognostic Significance, Correlation With Disease Status and Residual Disease Detection by Flow Cytometry.
Leukemia 16(7), 1381-9.
 79. Tsukimoto, I., Tawa, A., Horibe, K., Tabuchi, K., Kigasawa, H., Tsuchida, M., Yabe, H., Nakayama, H., Kudo, K., Kobayashi, R., Hamamoto, K., Imaizumi, M., Morimoto, A., Tsuchiya, S., and Hanada, R. (2009):

- Risk-Stratified Therapy and the Intensive Use of Cytarabine Improves the Outcome in Childhood Acute Myeloid Leukemia: the AML99 Trial From the Japanese Childhood AML Cooperative Study Group.
J.Clin.Oncol. 27(24), 4007-13.
80. Valerio, D. G., Katsman-Kuipers, J. E., Jansen, J. H., Verboon, L. J., de Haas, V, Stary, J., Baruchel, A., Zimmermann, M., Pieters, R., Reinhardt, D., van den Heuvel-Eibrink MM, and Zwaan, C. M. (2014):
 Mapping Epigenetic Regulator Gene Mutations in Cytogenetically Normal Pediatric Acute Myeloid Leukemia.
Haematologica 99(8), 130-32.
81. van, der Velden, V, Sluijs-Geling, A., Gibson, B. E., te Marvelde, J. G., Hoogeveen, P. G., Hop, W. C., Wheatley, K., Bierings, M. B., Schuurhuis, G. J., de Graaf, S. S., van Wering, E. R., and van Dongen, J. J. (2010):
 Clinical Significance of Flowcytometric Minimal Residual Disease Detection in Pediatric Acute Myeloid Leukemia Patients Treated According to the DCOG ANLL97/MRC AML12 Protocol.
Leukemia 24(9), 1599-606.
82. van Rhenen, A., Moshaver, B., Ossenkoppele, G. J., and Schuurhuis, G. J. (2007):
 New Approaches for the Detection of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia.
Curr.Hematol.Malig.Rep. 2(2), 111-8.
83. Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., Harris, N. L., Le Beau, M. M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A., and Bloomfield, C. D. (2009):
 The 2008 Revision of the World Health Organization (WHO) Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: Rationale and Important Changes.
Blood 114(5), 937-51.
84. Varma, N., Naseem, S. (2011):
 Application of Flow Cytometry in Pediatric Hematology-Oncology. *Pediatr.Blood Cancer* 57(1), 18-29.
85. von Neuhoff, C., Reinhardt, D., Sander, A., Zimmermann, M., Bradtke, J., Betts, D. R., Zemanova, Z., Stary, J., Bourquin, J. P., Haas, O. A., Dworzak, M. N., and Creutzig, U. (2010):
 Prognostic Impact of Specific Chromosomal Aberrations in a Large Group of Pediatric Patients With Acute Myeloid Leukemia Treated Uniformly According to Trial AML-BFM 98.
J.Clin.Oncol. 28(16), 2682-9.
86. Walter, R. B., Alonzo, T. A., Gerbing, R. B., Ho, P. A., Smith, F. O., Raimondi, S. C., Hirsch, B. A., Gamis, A. S., Franklin, J. L., Hurwitz, C. A., Loken, M. R., and Meshinchi, S. (2010):
 High Expression of the Very Late Antigen-4 Integrin Independently Predicts Reduced Risk of Relapse and Improved Outcome in Pediatric Acute Myeloid Leukemia: a Report From the Children's Oncology Group.
J.Clin.Oncol. 28(17), 2831-8.
87. Walter, R. B., Gyurkocza, B., Storer, B. E., Godwin, C. D., Pagel, J. M., Buckley, S. A., Sorrow, M. L., Wood, B. L., Storb, R., Appelbaum, F. R., and Sandmaier, B. M. (2014):

- Comparison of Minimal Residual Disease As Outcome Predictor for AML Patients in First Complete Remission Undergoing Myeloablative or Nonmyeloablative Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation.
Leukemia 29(1),137-44
88. Walter, R. B., Gooley, T. A., Wood, B. L., Milano, F., Fang, M., Sorrow, M. L., Estey, E. H., Salter, A. I., Lansverk, E., Chien, J. W., Gopal, A. K., Appelbaum, F. R., and Pagel, J. M. (2011):
 Impact of Pretransplantation Minimal Residual Disease, As Detected by Multiparametric Flow Cytometry, on Outcome of Myeloablative Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia.
J.Clin.Oncol. 29(9), 1190-7.
 89. Walter, R. B., Buckley, S. A., Pagel, J. M., Wood, B. L., Storer, B. E., Sandmaier, B. M., Fang, M., Gyurkocza, B., Delaney, C., Radich, J. P., Estey, E. H., and Appelbaum, F. R. (2013):
 Significance of Minimal Residual Disease Before Myeloablative Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for AML in First and Second Complete Remission.
Blood 122(10), 1813-21.
 90. Weir, E. G. and Borowitz, M. J. (2001):
 Flow Cytometry in the Diagnosis of Acute Leukemia.
Semin.Hematol. 38(2), 124-38.
 91. Whitman, S. P., Ruppert, A. S., Marcucci, G., Mrozek, K., Paschka, P., Langer, C., Baldus, C. D., Wen, J., Vukosavljevic, T., Powell, B. L., Carroll, A. J., Kolitz, J. E., Larson, R. A., Caligiuri, M. A., and Bloomfield, C. D. (2007):
 Long-Term Disease-Free Survivors With Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia and MLL Partial Tandem Duplication: a Cancer and Leukemia Group B Study.
Blood 109(12), 5164-7.
 92. Willman, C. L. (1999):
 Molecular Evaluation of Acute Myeloid Leukemias.
Semin.Hematol. 36(4), 390-400.
 93. Xu, X. J., Feng, J. H., Tang, Y. M., Shen, H. Q., Song, H., Yang, S. L., Shi, S. W., and Xu, W. Q. (2013):
 Prognostic Significance of Flow Cytometric Minimal Residual Disease Assessment After the First Induction Course in Chinese Childhood Acute Myeloid Leukemia.
Leuk.Res. 37(2), 134-8.

8 Anhang

8.3 Abbildungen

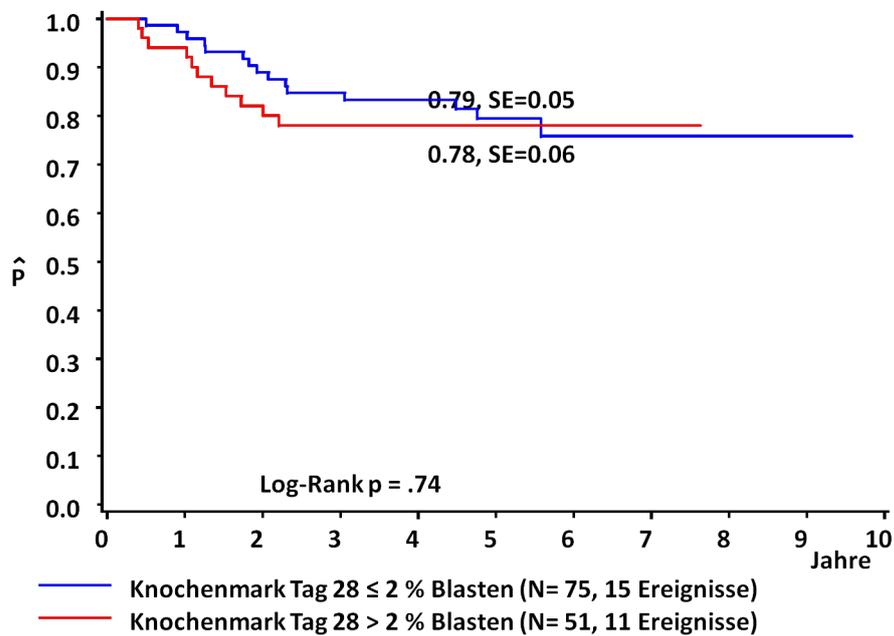


Abbildung 8

Das errechnete Gesamtüberleben (pOS) über den Zeitraum von 5 Jahren für die Patienten der Studien AML 1998/2004 mit dem Nachweis $\leq 2\%$ Blasten bzw. $>2\%$ Blasten in der Immunphänotypisierung an Tag 28

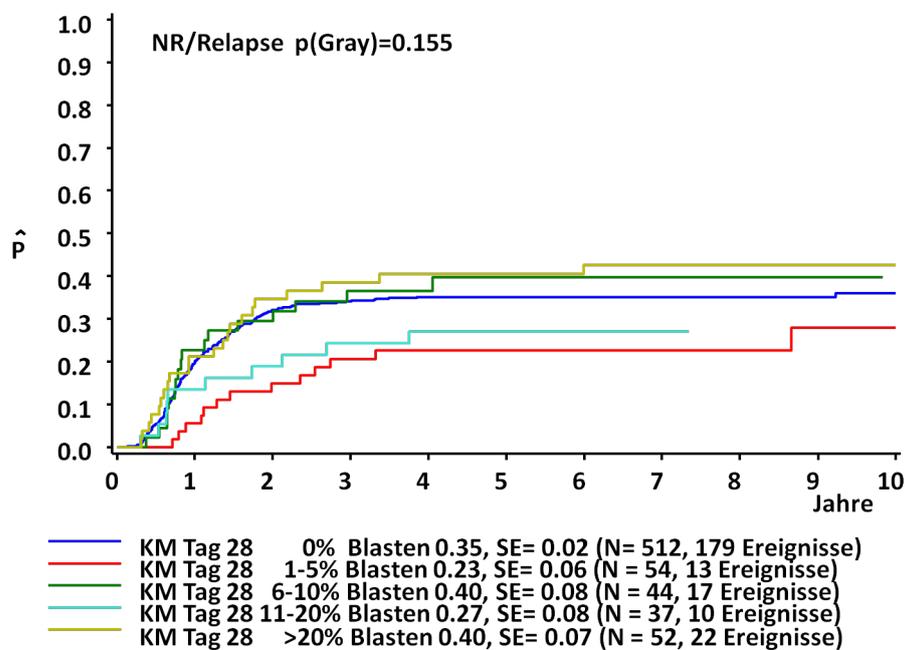


Abbildung 12

AML 1998/2004 die kumulative Inzidenz für ein Rezidiv erhoben mittels Morphologie und Immunphänotypisierung an Tag 28 in der Gesamtgruppe (n=699)

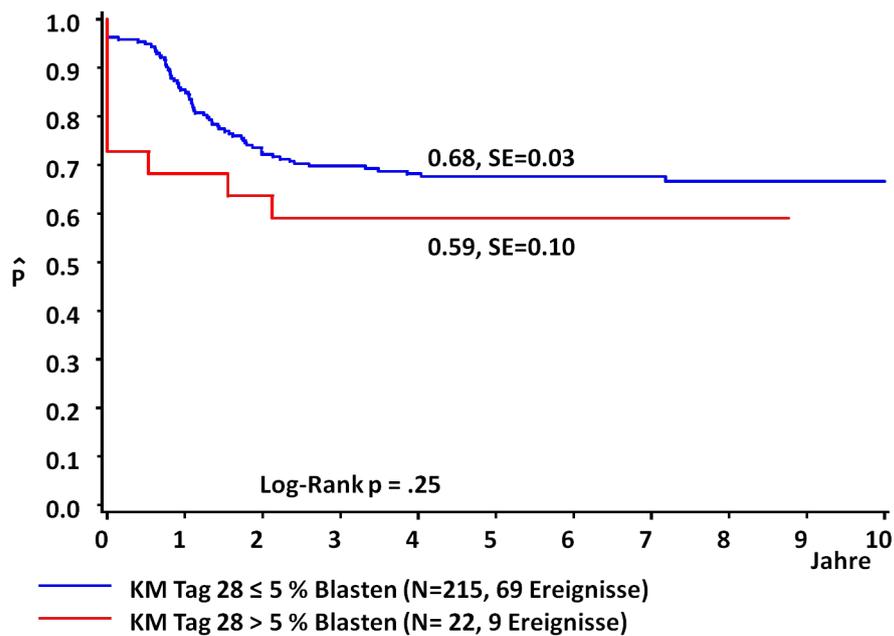


Abbildung 16

AML-BFM Studien 1998/2004 Standardrisikogruppe (n= 237) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für das errechnete Ereignisfreie Überleben (pEFS) für den Zeitraum von 5 Jahren

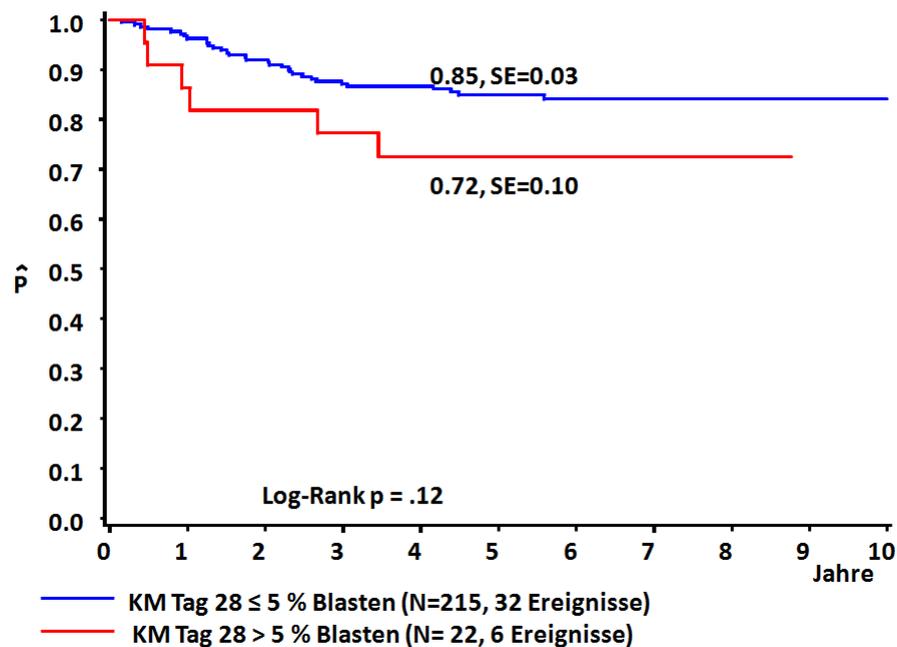


Abbildung 17

AML-BFM Studien 1998/2004 Standardrisikogruppe (n=237) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für das errechnete Gesamtüberleben (pOS) für den Zeitraum von 5 Jahren

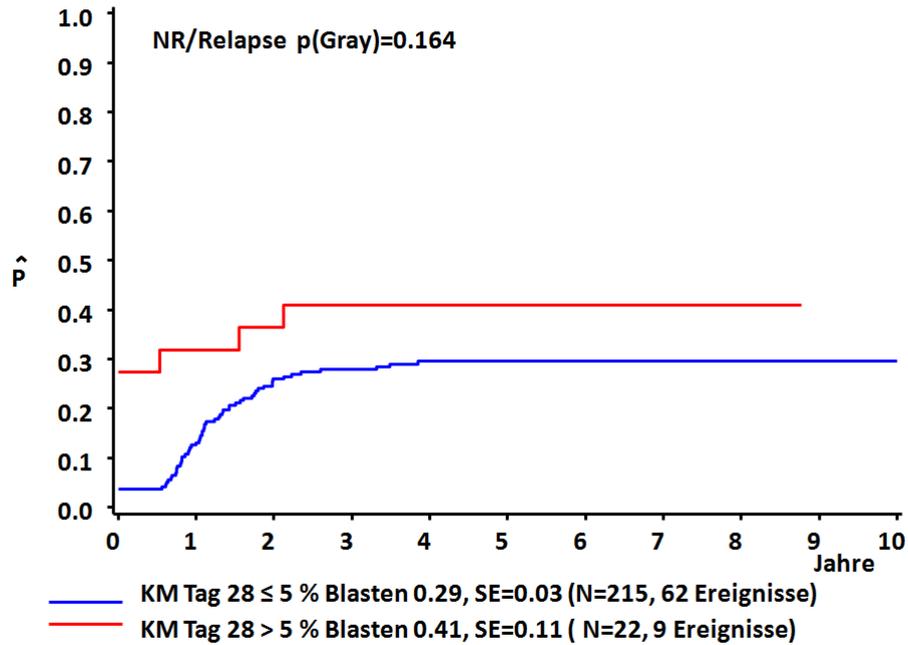


Abbildung 18

AML-BFM Studien 1998/2004 Standardrisikogruppe (n= 237) in der morphologischen Auswertung an Tag 28 für die kumulative Inzidenz für das Nichtansprechen/Erleiden eines Rezidivs (CI für NR/Relapse) über den Zeitraum von 5 Jahren

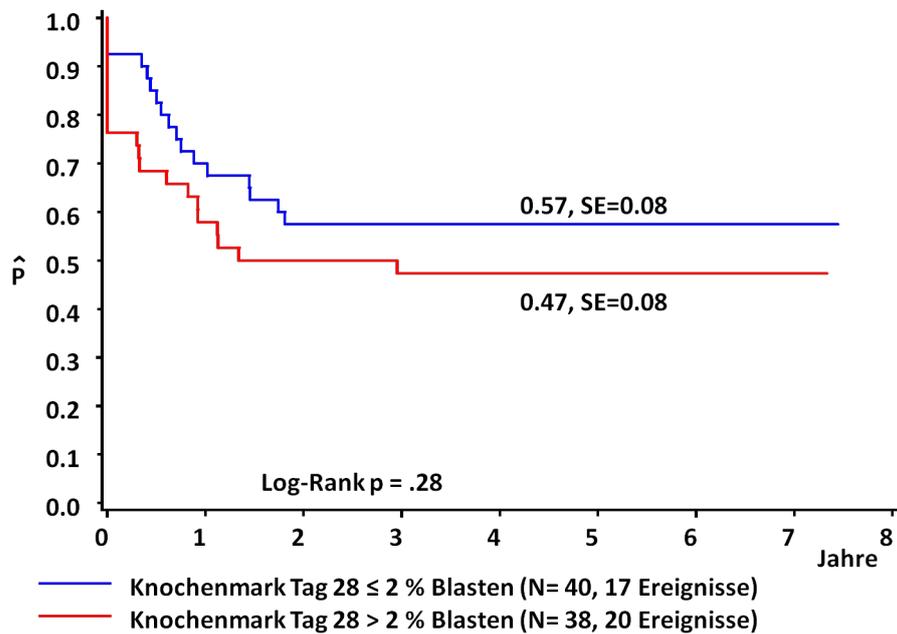


Abbildung 22

AML-BFM Studien 1998/2004 Patienten der Hochrisikogruppe in der immunphänotypischen Auswertung an Tag 28 (n=78) für das errechnete Ereignisfreie Überleben (pEFS) für einen Zeitraum von 5 Jahren

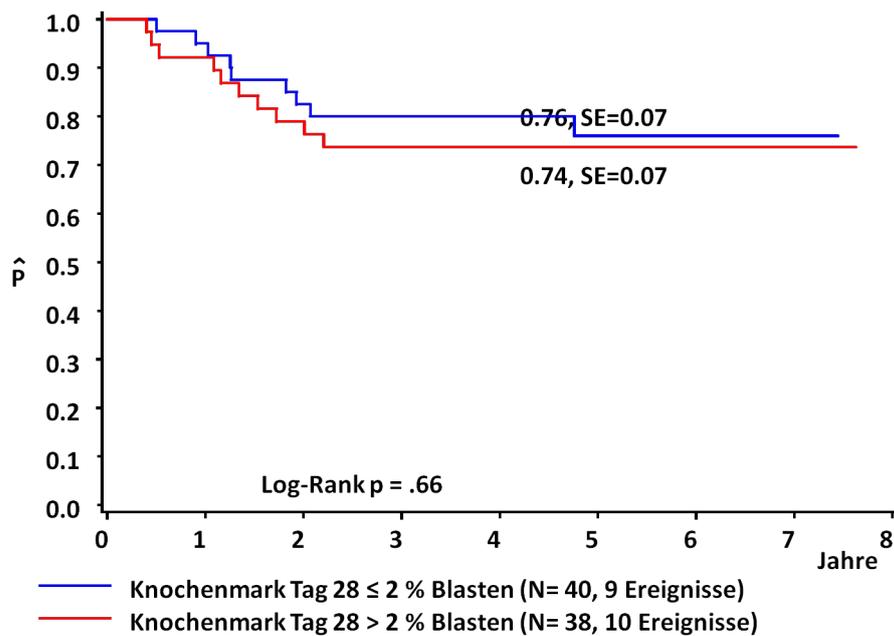


Abbildung 23

AML-BFM Studien 1998/2004 Patienten der Hochrisikogruppe in der immunphänotypischen Auswertung an Tag 28 (n=78) für das errechnete Gesamtüberleben (pOS) für den Zeitraum von 5 Jahren

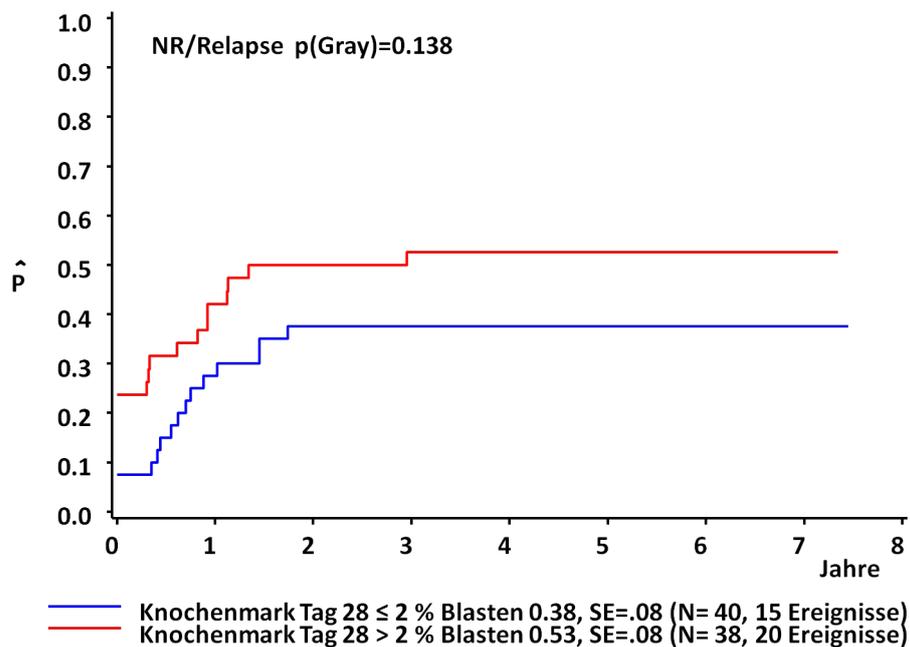


Abbildung 24

AML-BFM Studien 1998/2004 Patienten der Hochrisikogruppe in der immunphänotypischen Auswertung an Tag 28 (n=78) für die kumulative Inzidenz für das Nichtansprechen/Erleiden eines Rezidivs (CI für NR/Relapse) für den Zeitraum von 5 Jahren

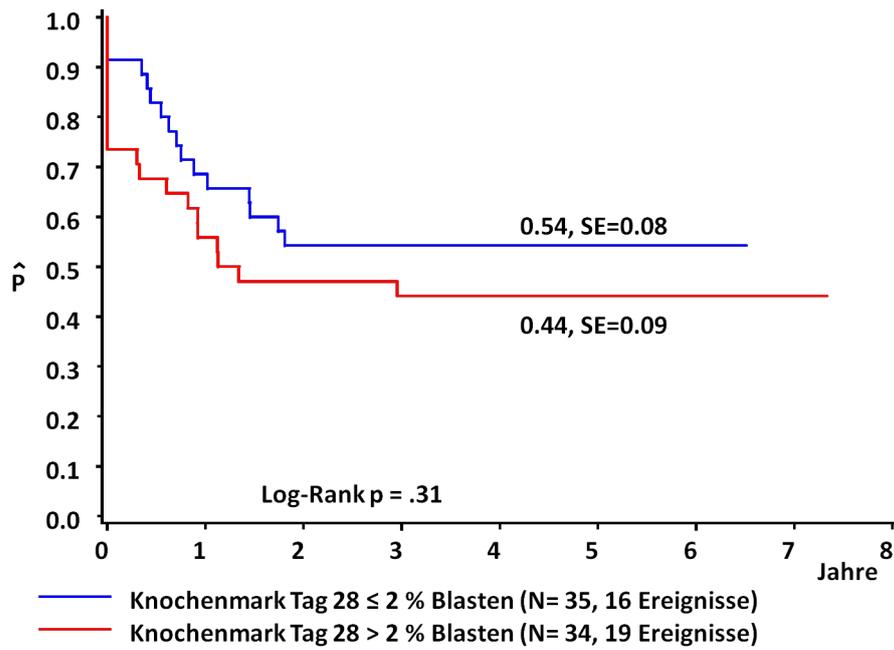


Abbildung 28

AML-BFM Studien 1998/2004 Hochrisikogruppe ohne SZT (n= 69) in der immunphänotypischen Auswertung an Tag 28 für das errechnete Ereignisfreie Überleben (pEFS) für den Zeitraum von 5 Jahren

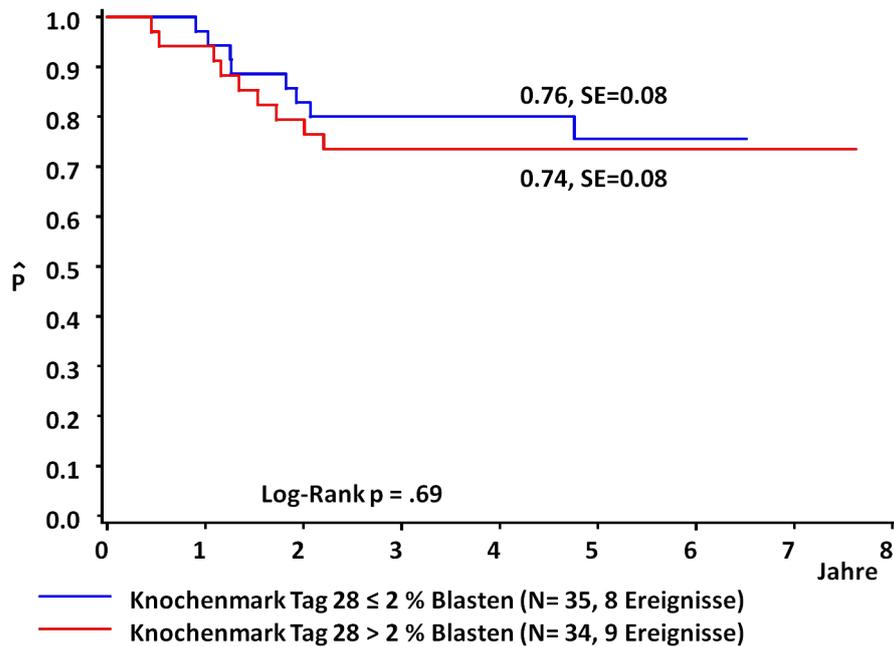


Abbildung 29

AML-BFM Studien 1998/2004 Hochrisikogruppe ohne SZT (n=69) in der immunphänotypischen Auswertung an Tag 28 für das errechnete Gesamtüberleben (pOS) für den Zeitraum von 5 Jahren

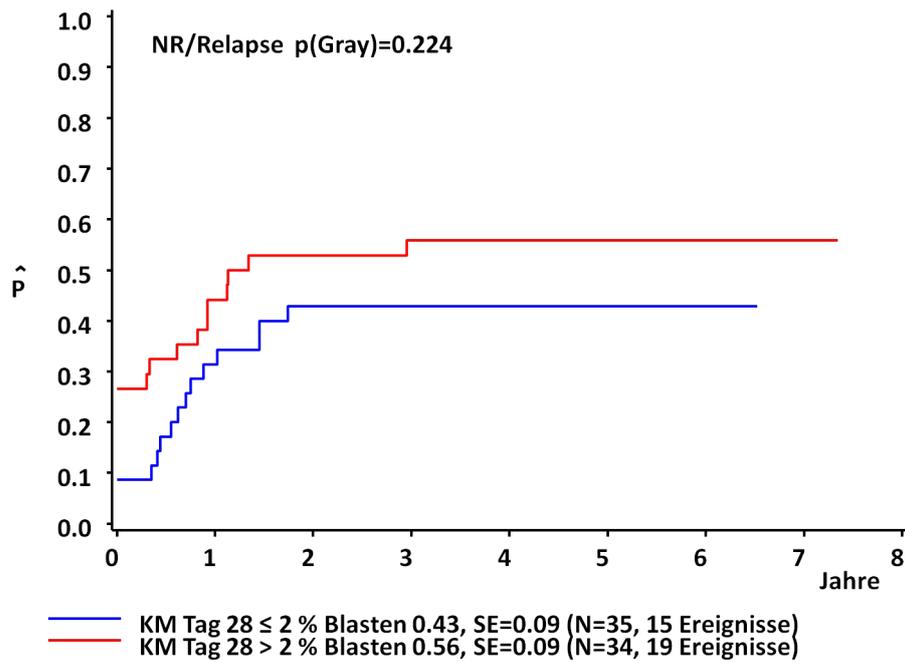


Abbildung 30

AML-BFM Studien 1998/2004 Hochrisikogruppe ohne SZT (n= 69) in der immunphänotypischen Auswertung an Tag 28 für die kumulative Inzidenz für das Nichtansprechen/Erleiden eines Rezidivs (CI für NR/Relapse) für den Zeitraum von 5 Jahren

8.4 Tabellen

Tabelle 12

4-Jahres Gesamtüberleben für die Gruppe untersuchter Patienten im FACS (n=192) und der Gruppe der nicht untersuchten Patienten (n=553)

	Gesamt		Im FACS untersuchte Patienten		Nicht untersuchte Patienten		p
	N	%	N	%	N	%	
Geschlecht							
Jungen	391	52,5	100	52,1	291	52,6	} 0,89
Mädchen	354	47,5	92	47,9	262	47,4	
FAB							
M0	35	4,7	7	3,6	28	5,0	} 0,34
M1	119	16,0	29	15,1	90	16,3	
M2	192	25,8	47	24,5	145	26,2	
M4 Eo-	88	11,8	18	9,4	70	12,7	
M4 Eo+	67	9,0	23	12,0	44	8,0	
M5	162	21,7	43	22,4	119	21,5	
M6	20	2,7	6	3,1	14	2,5	
M7	58	7,8	16	8,3	42	7,6	
Andere	4	0,5	3	1,6	1	0,2	
Initial. ZNS-Befall							
nein	651	88,5	166	88,3	485	88,5	} 0,94
ja	85	11,5	22	11,7	63	11,5	
Organbeteiligung							
Nein	573	76,9	141	73,4	432	78,1	} 0,18
ja	172	23,1	51	26,6	121	21,9	
Risikogruppe							
SR	247	33,2	66	34,4	181	32,7	} 0,67
HR	498	66,8	126	65,6	372	67,3	
Zyto-/Molekulargenetik							
t(8;21), t(15;17), inv(16)	163	31,8	49	28,3	114	22,9	} 0,15
Other	508	68,2	124	71,7	384	77,1	

8.5 Abkürzungen

Leukämieformen

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APL	Akute Promyelozyten-Leukämie (FAB M3)
BAL	Biphänotypische Leukämie
FAB M0	Akute myeloische Leukämie mit minimaler Differenzierung
FAB M1	Akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung
FAB M2	Akute myeloische Leukämie mit Ausreifung
FAB M3	Akute Promyelozyten-Leukämie (APL)
FAB M4	Akute myelomonoblastäre Leukämie
FAB M4eo	Akute myelomonoblastäre Leukämie mit atypischen eosinophilen Granulozyten
FAB M5	Akute MonoblastenLeukämie
FAB M6	Akute Erythroblasten-Leukämie
FAB M7	Akute Megakaryoblasten-Leukämie

Medikamente und Kombinationen

AI	Ara-C/Idarubicin
AIE	Ara-C/Idarubicin/Etoposid-Phosphat
Ara-C	Cytosin-Arabinosid
ATRA	All-Trans-Retinsäure
DAT	Daunorubicin/Cytarabin/Thioguanin
DAV	Daunorubicin/Cytarabin/Etoposid
DNR	Daunorubicin
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
HAM	HD-Ara-C (3g)/Mitoxantron
haM	HD-Ara-C (1g)/Mitoxantron
HD-Ara-C	Hochdosiertes Cytosin-Arabinosid
HDAC	Hochdosiertes Cytosin-Arabinosid
IDR	Idarubicin
i.th.	intrathekal
Konsol. I	Konsolidierung Phase I
Konsol. II	Konsolidierung Phase II
L-DNR	Liposomales DNR
Mitox	Mitoxantron
MTX	Methotrexat

Pred	Prednison
TG	Thioguanin
VCR	Vincristin
VP-16	Etoposid

Patienten-Status und Prognoseparameter

CI	kumulative Inzidenz
CR	komplette Remission (complete remission)
CCR	kontinuierliche komplette Remission (continuous complete remission)
NR	Nichtansprechender/Nonresponder
CRp/PR	partielle Remission (partial remission)
ED	Frühtod (early death)
EFS	ereignisfreies Überleben (event-free survival)
HR	Hochrisiko (high risk)
pEFS	geschätzte Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben (probability of event-free survival)
pOS	geschätzte Wahrscheinlichkeit für das Gesamtüberleben (probability of overall survival)
SR	Standardrisiko (standard risk)
TP	time-point, Zeitpunkt (TP1, TP2, TP3...)

Sonstige

APC	Allophycocyanin
Apo	Apoptose
BCR-ABL	breakpoint cluster region – Abelson
BFM	Berlin-Frankfurt-Münster
BMI	body mass index
CBF	core binding factor
CD	cluster of differentiation
C/EBP- α	CCAAT-enhancer binding protein alpha
c-Kit	cell growth factor kit (Tyrosinkinase)
EGIL	European Group for Immunological Characterization of Leukemias
FAB	French-American-British
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	forward scatter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLT3	fms like tyrosinkinase

GATA-1	globin transcription factor 1
GlyA	Glykophorin A
Gy	Gray
HOX	Homöobox Gene/Proteine
ITD	internal tandem duplication
KMP	Knochenmarkpunktion
KMT/SZT	Knochenmarktransplantation/Stammzelltransplantation
Lac	Lactoferrin
LAIP	Leukämie assoziierter Immunphänotyp (leukemia associated immunphenotype)
LDH	Laktat-Dehydrogenase
Ly	Lymphoid-Antigen Positivität
MLL-Rear	mixed lineage leukemia rearrangement
MPO	Myeloperoxidase
MRD	minimale Resterkrankung (minimal residual disease)
NEC	nicht-erythrozytäre Zellen
PC5	Phycoerythrin-Cyanin-5
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-a Proteinkomplex
POX	Myeloperoxidase
PML-RAR- α	Fusionsprotein
RAR- α	retinoic acid receptor alpha
REAR	Gen-Rearrangement
SSC	side scatter
TdT	terminale Deoxynucleotidyl-Transferase
VLA-4	very late antigen 4 (CD49a/CD29); Integrin
ZNS	zentrales Nervensystem

9 Danksagung

Danken möchte ich Herrn Professor Dr. med. Dirk Reinhardt für die Überlassung des Themas.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Ursula Creutzig, die mich mit vielfältigen Anregungen und Diskussionen unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. med. Christine von Neuhoff, die mir mit zeitlichem und persönlichem Engagement zur Seite gestanden hat.

Danken möchte ich Herrn Jans-Enno Müller und Dr. Martin Zimmermann von der AML-Studienzentrale für die sehr gute Kooperation und vielfältige Unterstützung.

Zu danken ist allen Mitarbeitern der AML- Studie und des Knochenmark-Labors der Medizinischen Hochschule Hannover für ihren Einsatz und die hervorragende Zusammenarbeit.

Zu danken ist allen Mitarbeiter der teilnehmenden Kliniken an der Studie AML-BFM 98/2004, sowie allen Kindern und Eltern, die die Durchführung der MRD-Untersuchungen durch ihr Einverständnis ermöglichten.

Meine Familie und liebe Freunde haben mich während aller Phasen der Arbeit unterstützt. Dafür danke ich ganz herzlich.

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten