

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Schrappe)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**BEDEUTUNG VON KNOCHENMARKREPUNKTIONEN  
AM ENDE DER INDUKTIONSTHERAPIE  
FÜR THERAPIE-STRATIFIZIERUNG UND THERAPIE-ERGEBNIS  
IM RAHMEN DER THERAPIEOPTIMIERUNGSSTUDIE ALL-BFM 2000  
ZUR BEHANDLUNG DER  
AKUTEN LYMPHATISCHEN LEUKÄMIE  
IM KINDES- UND JUGENDALTER**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**MARIANNE ARENS**

aus Heide, Holstein

Kiel 2015

Dekan: Prof. Dr. med. Ulrich Stephani

1. Gutachter: PD Dr. med. Gunnar Cario  
Klinik für Allgemeine Pädiatrie

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Monika Brüggemann  
Klinik für Innere Medizin II  
Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Oktober 2016

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.:

\_\_\_\_\_

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

\_\_\_\_\_

*Für Philine*

## I Inhaltsverzeichnis

## II Abkürzungsverzeichnis

## III Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

1. <u>Einleitung</u> .....	1
1.1 Die akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter .....	1
1.1.1 Definition, Ätiologie, Epidemiologie und Klinik .....	1
1.1.2 Diagnostik und Klassifizierung .....	2
1.1.3 Therapie der akuten lymphatischen Leukämie .....	4
1.1.4 Therapiestratifizierung im Rahmen der ALL-BFM 2000 Studie .....	5
1.2 Minimale Resterkrankung (MRD) .....	7
1.2.1 Methoden zur MRD-Bestimmung .....	7
1.2.2 MRD-Diagnostik im Rahmen der ALL-BFM 2000 Studie .....	8
1.3 Zielsetzung der Arbeit .....	9
2. <u>Patienten und Methoden</u> .....	10
2.1 Auswahl der Patienten .....	10
2.2 Erstellen der Projektdatenbank .....	10
2.2.1 Angaben im Bereich Morphologie .....	10
2.2.2 Angaben im Bereich minimaler Resterkrankung .....	11
2.3 Methodisches Vorgehen zur Erfassung und Bewertung der Knochenmark- Regeneration .....	11
2.3.1 Bearbeitung der Morphologie-Daten .....	11
2.3.1.1 Ergänzungen zum Kriterium der Markbröckelmenge .....	13
2.3.1.2 Ergänzungen zum Kriterium der Regeneration .....	14
2.3.1.3 Ergänzungen zum Kriterium der Repräsentanz .....	15
2.3.2 Bearbeitung und Re-Analyse der MRD-Daten .....	16
2.3.2.1 ESG-Guidelines für die Auswertung der PCR-Analysen .....	17
2.4 Finaler Datenfundus .....	19
2.5 Statistische Methoden .....	20

---

3. <u>Ergebnisse</u> .....	21
3.1 Vergleich der gemessenen MRD zwischen Original- und Repunktion .....	23
3.2 Relevanz der Punktionsverzögerung infolge der Repunktion .....	27
3.3 Relevanz zytomorphologischer Befunde zum Zeitpunkt von Original- und Repunktion .....	28
3.3.1 Bedeutung der Leukozytenzahl .....	28
3.3.2 Bedeutung der Zellularität .....	31
3.3.3 Bedeutung der Markbröckel .....	34
3.3.4 Bedeutung der Megakaryozyten .....	35
3.3.5 Gemeinsame Betrachtung von zytomorphologischen Parametern und Therapieverzögerung .....	38
4. <u>Diskussion</u> .....	39
4.1 Relevanz der Repunktion für MRD, Risikostratifizierung und Therapieergebnis .....	40
4.2 Relevanz der Therapieverzögerung für das Therapieergebnis .....	41
4.3 Relevanz der Knochenmarkregeneration für das Therapieergebnis .....	45
5. <u>Zusammenfassung</u> .....	49
Literaturverzeichnis .....	51
Anhang .....	58

## II Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIEOP	Assoziationszone Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica
ALL	Akute Lymphoblastische Leukämie
AML1/ETO	Akute Myeloische Leukämie 1/ Eight-Twentyone (8-21) Onkoprotein
AUL	Akute Unklassifizierbare Leukämie
BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region-Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene
BFM	Berlin, Frankfurt, Münster
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
cMRT	craniale Magnetresonanztomographie
COALL	Co-operative Study Group for treatment of ALL
Ct	Cycle Threshold
$\Delta$ Ct	Differenz der Ct-Werte
d. h.	das heißt
DNA	DeoxyriboNucleic Acid
D-Segment	Diversitäts-Segment eines Antikörpergens
DSMC	Data and Safety Monitoring Committee
E	event
EFS	Event Free Survival
ESG	European Standard Guidelines
FAB	French-American-British Study Group
FAB-L1-3	Subtypen der ALL der FAB-Gruppe
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
HR	Hohes Risiko
HTLV-1	Humanes T-Lymphotropes Virus 1
Ig	Immunglobulin
J-Segment	Junktionales Segment eines Antikörpergens
Kap.	Kapitel
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
M1	morphologisch in Remission (Blasten $\leq$ 5%)
M2	morphologisch nicht im Remission (Blasten $\geq$ 5-25%)

---

M3	morphologisch nicht in Remission (Blasten $\geq$ 25%)
mind.	mindestens
MLL-AF4	Mixed Lineage Leukemia
MNC	Mono Nuclear Cells
MR	mittleres Risiko
MRD	Minimal Residual Disease
MRD-HR	hohes Risiko nach MRD-Kriterien
MRD-MR	mittleres Risiko nach MRD-Kriterien
MRD-SR	Standardrisiko nach MRD-Kriterien
MRT	Magnetresonanztomographie
MTA	Medizinisch-Technische Assistentin
RP	Repunktion
OP	Originalpunktion
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pEFS	probability of Event Free Survival
PGR	Prednison Good Response
PML/RAR $\alpha$	Promyelocytic Leukemia / Retinoic Acid $\alpha$ Receptor
PPR	Prednison Poor Response
PR	Prednison-Response
pre B-ALL	precursor B-ALL
qPCR	quantitative PCR
RQ-PCR	Real-time PCR
SAS	Statistical Analysis System
SPSS	Superior Performing Software System
SR	Standardrisiko
SZT	Stammzelltransplantation
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
V-Segmente	Variables Segment eines Antikörpersgens
WHO	World Health Organization
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZD	Zeitdifferenz

### III Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<u>Abbildungen</u>	Seite
Abb. 1: Therapieschema der ALL-BFM 2000 Studie, einschließlich der Risikostratifizierung in die Risikogruppen Standardrisiko (SR), Mittleres Risiko (MR) und Hochrisiko (HR).	5
Abb. 2: pEFS für MRD-Positivität vs. Negativität jeweils zur Original- (links) und Repunktion (rechts).	25
Abb. 3: pEFS für MRD-Positivität vs. MRD-Negativität im Vergleich Original- und Repunktion.	26
Abb. 4: pEFS in Abhängigkeit von der Therapieverzögerung (4 Kategorien links vs. 2 Kategorien rechts).	28
Abb. 5: pEFS in Abhängigkeit von der Leukozytenzahl bei Repunktion (4 Kategorien links vs. 2 Kategorien rechts).	29
Abb. 6: pEFS in Abhängigkeit von der Zellularität bei Originalpunktion (links) und Repunktion (rechts).	32
Abb. 7: pEFS in Abhängigkeit von Zellularität und Punktionsverzögerung (< 8 Tage links vs. ≥ 8 Tage rechts).	33
Abb. 8: pEFS in Abhängigkeit von Megakaryozyten in der Repunktion.	36



---

## Tabellen

Tab. 1:	Häufigkeitsverteilung der MRD-Risikogruppen mit 7-Jahres EFS.	6
Tab. 2:	Subgruppen der zytomorphologischen Kriterien.	12
Tab. 3:	Mindestzellzahl der Erythropoese als Zeichen der Knochenmarkregeneration.	14
Tab. 4:	Mindestzellzahl der Granulopoese als Zeichen der Knochenmarkregeneration.	14
Tab. 5:	Knochenmarkregeneration anhand des Erythrozytenanteils im Knochenmark.	15
Tab. 6:	Klinische und biologische Charakteristika der in die Studie eingeschlossenen Patienten im Vergleich zu einer repräsentativen Kohorte.	22
Tab. 7:	MRD-Last zur Original- und zur Repunktion (angegeben in log-Stufen).	23
Tab. 8:	MRD-Positivität und Negativität zur Original- und Repunktion.	24
Tab. 9:	Zusammenhang zwischen Punktions- und Therapieverzögerung nach Protokoll IA vor Beginn von Protokoll IB.	27
Tab. 10:	Zusammenhang zwischen Punktionsverzögerung und Leukozytenzahl.	30
Tab. 11:	Multivariate Cox-Regressionsanalyse für das pEFS unter Berücksichtigung von Leukozytenzahl bei Repunktion und Punktionsabstand.	30
Tab. 12:	Zellularität zum Zeitpunkt von Original- und Repunktion.	31
Tab. 13:	Knochenmark-Zellularität zum Zeitpunkt der Repunktion und Punktionsverzögerung.	32
Tab. 14:	Multivariate Cox-Regressionsanalyse von Leukozytenzahl und Zellularität zum Zeitpunkt der Repunktion unter Berücksichtigung der Punktionsverzögerung.	33
Tab. 15:	Vorhandensein von Markbröckel zum Zeitpunkt von Original- und Repunktion.	35
Tab. 16:	Multivariate Cox-Regressionsanalyse der Megakaryoztenzahl zum Zeitpunkt der Repunktion unter Berücksichtigung des Punktionsabstands.	36
Tab. 17:	Assoziation von Megakaryozyten und Zellularität in der Repunktion.	37
Tab. 18:	Multivariate Cox-Regressionsanalyse der Megakaryoztenzahl zum Zeitpunkt der Repunktion unter Berücksichtigung der Zellularität.	37
Tab. 19:	Multivariate Cox-Regressionsanalyse der Megakaryoztenzahl zum Zeitpunkt der Repunktion unter Berücksichtigung von Punktionsverzögerung und Zellularität.	37

## 1 Einleitung

### 1.1 Die akute lymphoblastische Leukämie im Kindesalter

#### 1.1.1 Definition, Ätiologie, Epidemiologie und Klinik

Mitte des 19. Jahrhunderts wurde der Begriff „Leukämie“ (*altgriechisch λευκός leukós „weiß“ und αἷμα haima „das Blut“*)<sup>1</sup> von Rudolph Virchow geprägt, als er unter dem Mikroskop die vielen weißen Blutzellen im Blutaussstrich entdeckte und das Überwiegen der unreifen gegenüber den reifen Zellen (die links verschobene Hämatopoese) als pathologisch einstufte.<sup>2</sup>

Jeder akuten Leukämie liegt eine maligne Entartung des blutbildenden Systems zugrunde, durch die es im Knochenmark (KM) zu einer pathologisch gesteigerten Akkumulation von Blasten kommt.<sup>3</sup> Ursache ist eine klonale Proliferation, d. h. aus einer im Erbgut maligne entarteten Vorläuferzelle entstehen durch fortwährende Teilung genetisch identische, undifferenzierte Leukämiezellen. Die Mechanismen, die zur Entartung führen, sind weitgehend ungeklärt. Diskutiert werden endogen-genetische und exogene Einflüsse.<sup>4</sup>

1. Endogene Risikofaktoren, bzw. angeborene Gendefekte:

- a) numerische Chromosomenaberrationen, z. B. Trisomie 21 (20-30-faches Risiko)<sup>5</sup>
- b) Chromosomenbrüchigkeitssyndrome, wie bei der Fanconi-Anämie
- c) Genomanomalien mit Funktionsverlust von DNA-Reparaturgenen, zum Beispiel Schwachman-Diamond-Syndrom und Neurofibromatose<sup>6</sup>
- d) Chromosomen-Aberrationen mit Stimulierung wachstumsregulierender Enzyme oder mit Hemmung der Zelldifferenzierung, z. B. die Translokationen *AML1/ETO*, *PML/RAR $\alpha$*  und *MLL*-Genrearrangements<sup>7</sup>
- e) Keimbahnmutationen mit familiärer Häufung bei Zwillingen<sup>8</sup>

2. Exogene Risikofaktoren, bzw. erworbene Gendefekte durch:

- a) ionisierende und nicht-ionisierende Strahlung<sup>9</sup>
- b) chemische Substanzen (flüchtige Kohlenwasserstoffe, z. B. Benzol) sowie Zytostatika<sup>10</sup>
- c) Viren (z. B. Epstein-Barr-Virus und *HTLV-1*).<sup>11</sup>

Erst das Zusammenspiel mehrerer Risikofaktoren führt jedoch zu einer malignen Entartung von Zellen. Als protektive Faktoren gelten Impfungen und eine hohe Antigenexposition in den ersten Lebensjahren.<sup>12</sup>

Leukämien sind mit rund 34% die häufigsten Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter<sup>13</sup>, das entspricht knapp 630 Neuerkrankungen im Alter von 0-18 Jahren jährlich in Deutschland.<sup>14</sup> In 80% der Fälle sind es akute lymphatische Leukämien (ALL) mit einem Altersgipfel zwischen dem 2. und 5. Lebensjahr, einem medianen Erkrankungsalter von 4,9 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnose und einem Verhältnis Jungen zu Mädchen von 1,2 : 1.<sup>15,16</sup>

Durch die Verdrängung der natürlichen Hämatopoese im KM durch die entarteten Zellen kommt es zur KM-Insuffizienz mit unspezifischen Symptomen wie:

- Anämie, Blässe und Abgeschlagenheit
- Epistaxis und Petechien
- Infektneigung, hohes Fieber und Nachtschweiß
- Knochenschmerzen<sup>17</sup>

Bei systemischer Ausbreitung kann es zu Lymphadenopathie, Hepato- und Splenomegalie und zu Funktionsstörungen der Organe kommen, bei Befall der Hirnhäute zu Erbrechen, Sehstörungen und Gesichtslähmungen. Häufig werden die unspezifischen Symptome fehl gedeutet (Knochenschmerzen als rheumatoide Arthritis), oder bei harmlosen Erkrankungen, wie z. B. einem Infekt, überinterpretiert.<sup>18</sup> Weitere Differentialdiagnosen sind die aplastische Anämie, das myelodysplastische Syndrom, die idiopathische Thrombozytopenie und Osteomyelitis. Maligne Differenzialdiagnosen sind akute myeloische Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphome sowie disseminierte Neuroblastome.<sup>19</sup>

### **1.1.2 Diagnostik und Klassifizierung**

Die Diagnose einer Leukämie wird anhand der Zytomorphologie der Zellen im KM-Ausstrich und im peripheren Blut gestellt, zur weiteren Differenzierung dienen die Immunphänotypisierung<sup>20</sup>, sowie die Zyto-<sup>21</sup> und Molekulargenetik.<sup>22</sup> Zur Diagnostik des Ausmaßes des extramedullären Befalls werden neben der Klinik bildgebende Verfahren (Röntgen, Sonographie, cMRT) eingesetzt, ein ZNS-Befall wird im Wesentlichen durch Analyse der Liquorzytologie per Lumbalpunktion festgestellt.<sup>14</sup>

Zytomorphologisch wird die ALL anhand der FAB-Klassifikation aus den 70er Jahren in die Gruppen FAB-L1 bis FAB-L3 unterteilt.<sup>23</sup> Klinisch relevant ist jedoch nur die Abgrenzung des Subtyp FAB-L3, der bei der reifzelligen B-ALL auftritt, der leukämischen Manifestation des Burkitt-Lymphoms, da die Therapie dieser Leukämieform nach den Protokollen zur Behandlung des Burkitt-Lymphoms erfolgt.<sup>24</sup>

Mitte der 90er Jahre entstand die WHO-Klassifikation, die immunphänotypische sowie zyto- und molekulargenetische Kriterien mit einschließt.<sup>25</sup> Das bekannteste Verfahren zur Bestimmung des Immunphänotypes ist das fluorescence-activated cell sorting (FACS), eine Form der Durchflusszytometrie, die zelltypspezifische, sogenannte CD-Antigene intra- oder extrazellulär nachweist. Art und Menge der exprimierten Antigene determinieren den Immunphänotyp und ermöglichen die Zuordnung zu den B- oder T-Lymphozyten, die Beurteilung des Differenzierungs- und Reifegrades der Zelle<sup>26</sup> sowie eine Einschätzung der Prognose.<sup>46</sup>

Die Immunphänotypisierung grenzt außerdem akute Leukämien von gutartigen Proliferationsprozessen ab und wird zur Verlaufskontrolle neuer Behandlungsstrategien eingesetzt.<sup>27</sup> Zudem kann sie dem Nachweis der minimalen Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) dienen (Kap. 1.2).<sup>28</sup> Knapp 80% der Leukämien bei Kindern und Jugendlichen sind B-Zell-Neoplasien, etwas mehr als 20% T-Zell-Leukämien und 1% Sonderfälle (akute unklassifizierbare Leukämien (AUL) ohne Differenzierungsmerkmale, akute biphänotypische Leukämien mit gleichzeitig myeloischen und lymphatischen Differenzierungsmerkmalen innerhalb einer Blastenpopulation sowie akute bilineäre Leukämien mit Blasten aus 2 verschiedenen Zellreihen (z. B. aus der T-Zellreihe und aus der myeloischen Zellreihe).<sup>29</sup>

Strukturelle und numerische Chromosomenveränderungen können durch die klassische Zytogenetik sowie die molekulare Zytogenetik mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder Polymerase Ketten Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) nachgewiesen werden. Sie gelten als wichtige Faktoren für die Therapieplanung und insbesondere für die Prognose, da spezielle Eigenschaften der ALL-Subtypen mit einer bestimmten Rezidivwahrscheinlichkeit assoziiert sind.<sup>30</sup>

Hyperdiploide Chromosomensätze mit mehr als 50 Chromosomen (25% der Fälle) sind die häufigste numerische Aberration bei der ALL im Kindesalter und gelten als prognostisch günstig<sup>31</sup>, hypodiploide Chromosomensätze (mit weniger als 45 Chromosomen) sind dagegen prognostisch ungünstig.<sup>32</sup> Unter den strukturellen Chromosomenabweichungen sind bei Säuglingen die prognostisch ungünstigen Translokationen des *MLL*-Gens auf Chromosom 11 am häufigsten (43-60%)<sup>33</sup>, bei Kleinkindern hingegen die prognostisch günstige Translokation t(12;21)(p13;q22) (korrespondierendes Rearrangement: *ETV6/RUNX1*; etwa 22% aller Fälle). Das prognostisch ungünstige Philadelphia-Chromosom t(9;22), bzw. die korrespondierende *BCR-ABL*-Fusion findet man bei ca. 3% der Kinder mit einer ALL.<sup>31</sup>

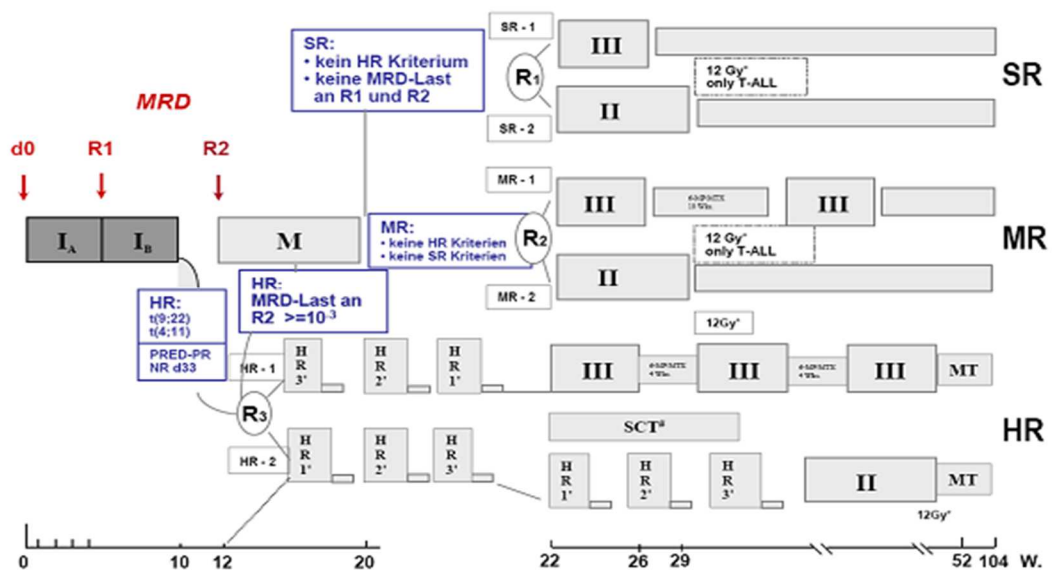
### 1.1.3 Therapie der akuten lymphatischen Leukämie

Akute lymphatische Leukämien bedürfen einer sofortigen intensiven Therapie, unbehandelt führen sie zum Tod. Während noch vor 30 Jahren 80% der Betroffenen an einer ALL verstarben, ist es heute dank Weiterentwicklung der Chemotherapie möglich, 80% der Erkrankten dauerhaft zu heilen.<sup>34</sup>

Weltweit erfolgt die Therapie der ALL mittels risikoadaptierter Polychemotherapie über einen Zeitraum von 2 bis 3 Jahren.<sup>35</sup> In Deutschland werden Kinder und Jugendliche, die im Alter von 1 bis 18 Jahren an einer ALL erkranken, im Rahmen zweier Therapieoptimierungsstudien behandelt, der AIEOP-BFM ALL- und der COALL-Studie. Ziel beider Studien ist es, durch Optimierung der individuellen, risikoadaptierten Therapie die Prognose zu verbessern und die Nebenwirkungen durch eine individuell angepasste Senkung der Therapietoxizität zu reduzieren. Beinahe alle Kinder und Jugendlichen mit einer ALL (laut Angaben des Deutschen Kinderkrebsregisters Mainz sind es 99,7%) werden in Deutschland im Rahmen von Therapieoptimierungsstudien behandelt.<sup>14</sup> Zuständiger Leiter der ALL-BFM-Studie ist Prof. Dr. Schrappe, der Direktor der Klinik für Allgemeine Pädiatrie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein in Kiel.

Zu Beginn der ALL-BFM-Therapie steht eine 7-tägige Prednisongabe (Abb. 1) sowie eine einmalige intrathekale Gabe von Methotrexat an Tag 0, gefolgt von der Induktionstherapie mit Induktionskonsolidierung (Protokoll I), die das Ziel einer Vollremission verfolgt. Dem schließt sich die Extrakompartimenttherapie an (Protokoll M, auch Konsolidierung genannt) und eine erneute Induktionsphase, die Reinduktion (Protokoll II oder III). Ergänzt wird die Therapie in Subgruppen durch Schädelbestrahlung und Stammzelltransplantation (SZT). Abschließend folgt bis zu einer Gesamtdauer der Therapie von 24 Monaten eine mildere orale Erhaltungstherapie. Die Durchführung der Therapie erfolgt grundsätzlich standardisiert anhand des aktuellen Behandlungsprotokolls, wobei die Behandlung individuell an Klinik und Laborbefunde angepasst werden kann.<sup>36</sup>

Die folgende Abbildung zeigt das Therapieschema der ALL-BFM 2000 Studie im Überblick, einschließlich der Risikostratifizierung in die Risikogruppen Standardrisiko (SR), Mittleres Risiko (MR) und Hochrisiko (HR) (Abb. 1):



**Abb. 1:** Therapieschema der ALL-BFM 2000 Studie, einschließlich der Risikostratifizierung in die Risikogruppen Standardrisiko (SR), Mittleres Risiko (MR) und Hochrisiko (HR). Die Stratifizierungskriterien sind in blau dargestellt. 'I' steht für das Protokoll I und entspricht der Induktionstherapie mit Induktionskonsolidierung. Protokoll M oder Konsolidierung steht für die Extrakompartimenttherapie. Protokoll II und III stehen für die erneute Induktionsphase, die Reinduktion. Ergänzend kommen die Schädelbestrahlung und SZT hinzu.<sup>36</sup>

### 1.1.4 Therapiestratifizierung im Rahmen der ALL-BFM 2000 Studie

Um eine optimale, individuelle Therapie der Leukämie zu gewährleisten, wird jeder Patient einer von drei Risikogruppen (Standardrisiko SR, mittleres MR oder höchstes Risiko HR) zugeordnet (Abb. 1). Die Risikostratifizierung erfolgte in der ALL-BFM 2000 Studie, in deren Rahmen diese Arbeit durchgeführt wurde, anhand verschiedener klinischer und biologischer Faktoren, die entscheidenden Einfluss auf die Rezidivwahrscheinlichkeit haben:

1. Zyto- und Molekulargenetik: Nachweis von *MLL-AF4* oder *BCR-ABL* (Der Nachweis einer dieser Rearrangements qualifiziert unabhängig vom Therapieansprechen für die HR-Gruppe.)
2. Dynamik im Ansprechen der Therapie:
  - a) Prednison-Response (PR) im peripheren Blut an Therapietag 8:
    - < 1.000 Blasten pro Mikroliter Blut = Prednison Good Responder (PGR)
    - $\geq 1.000$  Blasten pro Mikroliter Blut = Prednison Poor Responder (PPR)
  - b) KM-Remission an Therapietag 33 und 78:
    - Remission nach Induktionstherapie an Therapietag 33 (Zeitpunkt R1) und

- c) auf submikroskopischer Ebene: Bestimmung der MRD am Therapietag 33 und nach Induktionskonsolidierung am Therapietag 78 (Zeitpunkt R2).<sup>36</sup>

Während in der ALL-BFM 95 Studie zur Abschätzung des Rezidivrisikos zusätzlich noch die Kriterien 'Leukozytenzahl' und 'Alter' zum Zeitpunkt der Erkrankung mit einbezogen wurden<sup>37</sup>, ist bei der ALL-BFM 2000 Studie der In-Vivo-Nachweis eines Therapieansprechens das entscheidende Kriterium zur Abschätzung des Rückfallrisikos.<sup>38,39</sup> Dies wird einerseits anhand der Blastenzahl im peripheren Blut an Therapietag 8 bestimmt: Bereits nach der initialen Prednisontherapie bilden sich zwei prognostisch eindeutig unterschiedliche Gruppen heraus: Prednison Good oder Poor Responder. Die Wahrscheinlichkeit für ein ereignisfreies Überleben (Event Free Survival (EFS)) von 8 Jahren in der Gruppe der PGR konnte in den vorangegangenen Studien deutlich verbessert werden und lag in der ALL BFM 1990 Studie bei 0.81 +/- 0.01, gegenüber einem pEFS von 0.55 +/- 0.04 bei den PPR, die somit für die HR-Gruppe qualifizierten.<sup>40</sup>

Andererseits wird der Grad des Therapieansprechens auch im KM gemessen. Hierfür werden an bestimmten Therapiezeitpunkten KM-Punktionen durchgeführt. Obligat sind Punktionen an Tag 0 vor Beginn der Therapie, an Protokolltag 33 (Kontrollzeitpunkt R1) und an Protokolltag 1 von Protokoll M, bzw. vor dem 1. HR-Block (Kontrollzeitpunkt R2). An diesen Zeitpunkten wird das KM zytomorphologisch und hinsichtlich der MRD untersucht. Zytomorphologisch erfolgt bei einem Zellanteil von mehr als 5% Blasten die Zuordnung zur HR-Gruppe, unter 5% liegt eine klinische Remission (CR) vor.<sup>41</sup> Da beim Vorliegen einer Remission jedoch noch erhebliche Mengen an residuellen Leukämiezellen im KM vorhanden sind, erfolgt außerdem die MRD-Bestimmung.<sup>42</sup> Bei negativer MRD bereits nach Induktionstherapie an R1 (und R2) erfolgt die Einordnung in die SR-Gruppe, bei niedrig-positiver MRD ( $< 10^{-3}$  an R2) in die MR-Gruppe, und bei einer MRD-Last von  $\geq 10^{-3}$  Tumorzellen in die HR-Gruppe.<sup>36</sup> Eine Übersicht über die Häufigkeitsverteilung der drei MRD-Risikogruppen mit dem jeweiligen ereignisfreien Überleben (EFS) zeigt die folgende Tabelle (Tab. 1):

**Tab. 1: Häufigkeitsverteilung der MRD-Risikogruppen mit 7-Jahres EFS.<sup>42</sup>**

Risikogruppe	Häufigkeit pre B-ALL* <sup>1</sup> (%)	7-Jahres EFS pre B-ALL (%)	Häufigkeit T-ALL (%)	7-Jahres EFS T-ALL (%)
MRD-SR* <sup>2</sup>	42.0%	91.1%	16.0%	91.1%
MRD-MR* <sup>3</sup>	52.0%	76.0%	63.0%	80.6%
MRD-HR* <sup>4</sup>	6.0%	46.6%	21.0%	49.8%

\*1 precursor B-ALL (Vorläufer B-ALL) \*2 MRD-Standardrisikogruppe \*3 MRD-Mittlere Risikogruppe \*4 MRD-Hochrisikogruppe

Neben den obligaten KM-Punktionen gibt es weitere, fakultative Kontrollzeitpunkte (Protokolltag 15 und 52, Tag 1 von Protokoll II/III, Woche 52 und 104), sowie mehrere Kontrollzeitpunkte bei HR-Patienten und Patienten mit KMT.<sup>36</sup> Insgesamt ist die MRD-Diagnostik im Rahmen der ALL-BFM-2000 Studie der bedeutendste Parameter für die Risikostratifizierung und bei der Einschätzung der Rezidivwahrscheinlichkeit (Kap. 1.2).<sup>39,43</sup>

In der Hochrisikogruppe ist das relative Risiko für ein Therapieversagen insgesamt zwar am höchsten<sup>44</sup>, beinahe die Hälfte der Patienten jedoch, die erfolglos behandelt wurden, stammt aus der Gruppe mit mittlerem Risiko, ohne dass dies anhand der untersuchten Marker vorher abzusehen war.<sup>45</sup> So erleiden trotz der hohen Heilungsraten von inzwischen über 80% etwa 15-20% der Kinder und Jugendlichen, die in Deutschland an einer ALL erkranken, einen Rückfall, und die Aussicht auf Heilung liegt dann nur noch bei etwa 25-40%.<sup>42</sup> Demgegenüber rezidivieren nach über fünf Jahren ab Erstdiagnose nur noch 2-3% der Patienten, so dass man bei einer Remission über mindestens fünf Jahre ohne Unterbrechung von einer Heilung der Patienten spricht.<sup>14</sup>

## **1.2 Minimale Resterkrankung (MRD)**

Die MRD entspricht dem Maß an residuellen Leukämiezellen bei Patienten in klinischer Remission. Die Diagnostik erfolgt mit einer 100- bis 10.000-fachen Sensitivität gegenüber konventionellen zytomorphologischen Analysen und ermöglicht den Nachweis von einer Leukämiezelle unter  $10^4$  -  $10^6$  Zellen. Damit gilt die MRD-Bestimmung als sensitivste Methode zur Beurteilung des Therapieansprechens im submikroskopischen Bereich in der Initialphase der Behandlung und ermöglicht außerdem eine Einschätzung von Prognose und Langzeitüberleben über die Induktionsphase hinaus.<sup>46</sup> Mittels MRD-Diagnostik kann außerdem die Wirksamkeit unterschiedlicher Behandlungsregimes und neu entwickelter antileukämischer Therapien belegt werden, die Steuerung spezieller Behandlungsverfahren erfolgen (z. B. Therapien mit monoklonalen Antikörpern) und eine Qualitätskontrolle von Stammzellen für Stammzelltransplantationen durchgeführt werden.<sup>47</sup>

### **1.2.1 Methoden zur MRD-Bestimmung**

Drei Verfahren zur MRD-Bestimmung erlauben es, eine Leukämiezelle unter 10.000 bis 1 Million Normalzellen ( $10^4$  bis  $10^6$ ) zu identifizieren:

1. Immunphänotypisierung per Durchflusszytometrie und Mehrfachmarkierung zum Nachweis leukämiespezifischer Immunphänotypen



2. Quantitative Echtzeit PCR-Analyse (Real-time quantitative PCR, RQ-PCR) von Fusionsprodukten leukämiespezifischer Translokationen (zum Beispiel BCR-ABL bei der Philadelphia-Translokation t(9;22))
3. RQ-PCR-Analyse klonspezifischer Verknüpfungsregionen von Immunglobulin- (Ig) und T-Zell-Rezeptor (TCR)-Rearrangements<sup>42</sup>

Im Rahmen der ALL-BFM 2000 Studie wurde letztgenanntes Verfahren verwendet: Hierbei nutzt man die Monoklonalität der Leukämiezellen und die Einzigartigkeit jedes Ig- und TCR-Rearrangements über Rekombination der verschiedenen V-, D- und J-Segmente.<sup>38</sup> Das Screening für diese molekularen Marker sowie Festlegung von Sensitivität und Quantifizierbarkeit erfolgte entsprechend den Leitlinien der ESG-MRD-Gruppe anhand des primären KM bzw. peripheren Blutes mit ausreichend hohem Anteil an leukämischen Blasten.<sup>48</sup> Im Idealfall sollten für jeden Patienten mindestens zwei unterschiedliche Gensonden mit einer Sensitivität von mindestens  $10^{-4}$  identifiziert werden, da die Anwendung von zwei ausreichend sensitiven Markern in der ALL-BFM 2000 Studie Voraussetzung für die Stratifizierung in die SR-Gruppe (über Negativität dieser beiden Marker zum Zeitpunkt R1) war (siehe unten). Im Verlauf der Therapie konnte dann auf der Grundlage der initialen Markeridentifizierung und ~ charakterisierung die MRD-Last exakt quantifiziert werden.<sup>49</sup>

### **1.2.2 MRD-Diagnostik im Rahmen der ALL-BFM 2000 Studie**

Im Rahmen der ALL-BFM 2000 Studie erfolgt die MRD-Messung obligat an zwei Zeitpunkten: am Ende der Induktionstherapie (Therapietag 33, R1) und am Ende der Induktionskonsolidierung (Therapietag 78, R2).<sup>36</sup> Patienten mit persistierend hoher MRD-Last von  $\geq 10^{-3}$  noch 12 Wochen nach Therapiebeginn werden in die HR-Gruppe stratifiziert, keine MRD bereits am Therapietag 33 qualifiziert für die SR-Gruppe. Eine noch nachweisbare MRD, aber auf niedrigem Niveau an R2 qualifiziert für die MR-Gruppe.<sup>50</sup> Die Therapie der HR-Gruppe unterscheidet sich mit dem Einführen der hochintensiven HR-Blöcke grundlegend von der Behandlung der SR- und MR-Gruppe (Abb. 1). In der SR- und MR-Gruppe erfolgten in der Reinduktion im Rahmen der Studie zwei randomisierte Prüfungen: In der SR-Gruppe wurde geprüft, ob eine Therapiereduktion (Protokoll III statt Protokoll II) möglich ist mit dem Ziel eines unverändert exzellenten EFS; in der MR-Gruppe, ob eine Therapieintensivierung (2 x Protokoll III statt 1 x Protokoll II) zu einer Verbesserung des EFS führt. Kontrollarm war in beiden Strata Protokoll II. Somit hat die korrekte Zuordnung zur SR- bzw. MR-Gruppe, die über die Negativität zum Zeitpunkt R1 erfolgt, für 50% der Patienten erhebliche Konsequenzen: bei

falscher Zuordnung zur SR-Gruppe erhielt der Patient im Extremfall nur einmal Protokoll III (SR-Prüfarm) statt zweimal Protokoll III (MR-Prüfarm). Aus diesem Grund erfolgte die Stratifizierung nach SR nur bei Negativität zum Zeitpunkt R1 in mindestens 2 ausreichend sensitiven Markern.<sup>36</sup>

Die KM-Punktionen, die zur Bestimmung der MRD-Last durchgeführt wurden, mussten jedoch in etwa 15-20% der Fälle wiederholt werden. Entweder weil das Erstpunktat aus zytomorphologischer Sicht als nicht repräsentativ gewertet wurde oder weil für eine umfassende MRD-Analyse nicht ausreichend DNA-Material vorhanden war, um mindestens zwei sensitive Marker daraus zu bestimmen. Die Bedeutung der Repunktionen (RP) für die gemessene MRD-Last und deren Konsequenzen für Therapiestratifizierung und Therapieergebnis waren jedoch vollkommen unklar.<sup>45</sup>

Da dennoch viele KM-Punktate mit nur geringem DNA-Material wenigstens hinsichtlich eines sensitiven Markers untersucht werden konnten, lagen für einen Großteil der Patienten mit RP zu beiden Kontrollzeitpunkten gepaarte MRD-Messungen und auch gepaarte Beurteilungen der Zytomorphologie der KM-Proben vor. Diese Morphologie- und MRD-Paarungen von Patienten, deren KM erneut punktiert werden musste, dienten als Grundlage dieser Arbeit.

### **1.3 Zielsetzung der Arbeit**

Zunächst sollten für ein repräsentatives Patientenkollektiv mit einer akuten lymphatischen Leukämie, die nach dem Protokoll ALL-BFM 2000 behandelt wurden, Daten zu MRD und Morphologie systematisch erfasst werden. Anhand dieser Daten sollte dann eine Analyse der gepaarten Morphologie- und MRD-Befunde im Hinblick auf folgende Fragen erfolgen:

1. Wie unterscheiden sich die MRD-Befunde von Originalpunktion (OP) und Repunktion (RP)?
2. Welche Auswirkungen haben die unterschiedlichen MRD-Ergebnisse auf die Risikostratifizierung und damit auf die verabreichte Therapie sowie letztlich das Therapieergebnis?
3. Welche prognostische Relevanz haben aus zytomorphologischer Sicht die Leukozytenwerte, die KM-Zellularität, die Anzahl der Megakaryozyten sowie das Vorhandensein von Markbröckeln zum Zeitpunkt der OP und RP?
4. Welchen Einfluss hat die RP auf die Therapieverzögerung, und welchen Einfluss hat diese auf das Therapieergebnis?

## **2 Patienten und Methoden**

### **2.1 Auswahl der Patienten**

Dieser Arbeit liegen die Daten von 312 Kindern und Jugendlichen zugrunde, die im Zeitraum von August 2001 bis Mai 2010 an einer ALL erkrankt sind, nach dem Studienprotokoll ALL-BFM 2000 oder dem verwandten internationalen ALL IC-BFM 2002 Protokoll behandelt wurden und eine RP erhalten haben.

Ausgangspunkt waren 500 Patienten, die laut Kieler Studienreferenzlabor mit RP gelistet waren. Die Dokumentation von Patienten mit RP wurden in der Kinderklinik am UKSH Kiel im August 2001 begonnen, und der erste Patient, der dort mit einer RP gelistet war, entspricht dem ersten der ausgewählten 500 Patienten für diese Arbeit. Alle folgenden 499 Kinder und Jugendlichen, die mit 'RP' verzeichnet waren, wurden in chronologischer Reihenfolge ab August 2001 aus dem Archiv ausgesucht.

### **2.2 Erstellen der Projektdatenbank**

Für alle Patienten wurden zunächst sämtliche zytomorphologischen Daten der KM-Analysen aus den digitalisierten Archiven des Morphologie-Labors sowie den Akten-Archiven der Abteilung für Dokumentation der Kinderklinik des Universitätsklinikums Kiel zusammengetragen. Neben dem Namen, Vornamen, sowie der Studien- und MRD-Nummer sind für jeden Patienten weitere Angaben vorhanden, anhand derer die zytomorphologischen Eigenschaften der KM-Punktionen und Repunktionen beschrieben werden können:

#### **2.2.1 Angaben im Bereich Morphologie**

- Therapiezeitpunkte der KM-Entnahme (I = Initialpunktion Tag 0, R1, R2)
- Punktionstag (I, R1, R2 mit einer, zwei oder mehreren Repunktionen)
- Abstand zwischen der regulären Punktion und der RP in Tagen
- Probenmaterial aus dem peripheren Blut oder dem KM?
- gewonnene DNA-Menge in Mikrogramm aus dem KM
- Wurde das gewonnene Material zur MRD-Analyse verschickt?
- Angabe über die Zellzahl im KM-Aspirat
- Hämoglobinwert, sowie die Leukozyten- und Thrombozytenzahl
- Markierung von Leukozytenwerten  $<1.000/\mu\text{l}$  Blut
- Zellularität, Megakaryozytenzahl und Markbröckel im Aspirat

- Remissionsstatus, Regeneration, Repräsentativität und FAB-Gruppe
- Wurde die RP seitens des Morphologie-Labors empfohlen?
- Grund für die RP (Morphologie, MRD oder beides)
- zusätzliche Bemerkungen aus den Archiven.

### **2.2.2 Angaben im Bereich minimaler Resterkrankung**

Diese Angaben entstammen den digitalen Datenarchiven und den Patientenakten aus der Dokumentation des MRD-Labors der Humangenetik des Universitätsklinikums in Heidelberg.

- Immunphänotyp der Leukämie
- Immunglobulin- und TCR-Rearrangements
- Sensitivität der MRD-Messung
- Quantitativer Bereich der MRD-Messung
- Risikostratifizierung (Standard-, mittleres oder höchstes Risiko)
- MRD-Last von allen durchgeführten Punktionen und Repunktionen
- Sekundäre Malignome mit Datum der Diagnose, Ort und Art
- Rezidive mit Datum und Ort des Rezidivs
- Wurde die RP seitens des MRD-Labors empfohlen?
- zusätzliche Bemerkungen aus den Archiven.

## **2.3 Methodisches Vorgehen zur Erfassung und Bewertung der Knochenmark-Regeneration**

Nach dem Erstellen der Datenbank aus sämtlichen Morphologie- und MRD-Befunden wurden zunächst die morphologischen Kriterien (Kap. 2.2.1) weiter bearbeitet.

### **2.3.1 Bearbeitung der Morphologie-Daten**

Für sieben der morphologischen Kategorien gibt es weitere Unterteilungen, die der Systematik in den Archiven entsprechen und nach deren Vorlage die Primärdaten in dieser Arbeit dokumentiert wurden. Hierbei wurden die Unterteilungen den Begleitscheinen entnommen, auf denen die Ergebnisse der KM- und Blutanalysen differenziert dokumentiert werden. Diese Untergruppen wurden zunächst geschlossen in die Projektdatenbank aufgenommen:

- Für den Aspekt der 'Zellularität' gab es 11 Subgruppen.
- Für den Aspekt der 'Megakaryozyten' gab es 6 Subgruppen.
- Für den Aspekt der 'Markbröckel' gab es 5 Subgruppen.

- Für den Aspekt der 'Remission' gab es 6 Subgruppen.
- Für den Aspekt der 'Regeneration' gab es 6 Subgruppen.
- Für den Aspekt der 'Repräsentanz' gab es 4 Subgruppen.
- Für den Aspekt der 'RP' gab es 3 Subgruppen.

In der folgenden Tabelle sind diese ursprünglichen Subgruppen der zytomorphologischen Aspekte von KM und peripheren Blutausstrichen ungekürzt im Überblick dargestellt (Tab. 2):

**Tab. 2: Subgruppen der zytomorphologischen Kriterien.**

Zellularität	Megakaryozyten	Markbröckel	Remission	Regeneration
stark zellreich	ohne Angabe	ohne Angabe	Aussage nicht möglich	Aussage nicht möglich
sehr zellreich	keine	keine	eingeschränkt beurteilbar	keine/ nicht ausreichend
zellreich	stark vermindert	wenige	nicht sicher in Remission	extrem langsam
wenig zellreich	vermindert	ja	M1/ Remission Blasten ≤ 5%	sehr wenig/ sehr langsam
normal	vermindert bis normal	viele	M2 Blasten ≥ 5-25%	wenig/ langsam
vermindert	normal		M3 Blasten ≥ 25%	in Regeneration
sehr vermindert	vermehrt	<b>Repräsentanz</b>		
stark vermindert		nicht beurteilbar		<b>Repunktion</b>
hypozellulär		nicht repräsentativ		keine Aussage dazu vorhanden
sehr hypozellulär		fraglich repräsentativ		wurde nicht empfohlen
stark hypozellulär		repräsentativ		wurde empfohlen

Vor der Datenanalyse wurden im Weiteren die Untergruppen von 6 der morphologischen Kriterien zu wenigen wesentlichen Untergruppen zusammengefasst. Die Untergruppen des siebten Kriteriums 'Nachpunktion' wurden belassen und nicht zusammengefasst. Diese Systematik entstammt nicht den morphologischen Archiven, sondern wurde in Absprache mit der zuständigen Studienkordinatorin für jede Untergruppe nachträglich ergänzt.

- Die 11 Subgruppen des Kriteriums 'Zellularität' wurden in den 3 Untergruppen 'hypozellulär', 'normal' und 'hyperzellulär' zusammengefasst.
- Die 6 Subgruppen des Kriteriums 'Megakaryozyten' wurden in 3 Untergruppen 'ohne Angabe', 'keine Megakaryozyten', 'normale Megakaryozytenzahl' zusammengefasst.
- Die 5 Subgruppen des Kriteriums 'Markbröckel' wurden in 3 Untergruppen 'ohne Angabe', 'keine Markbröckel', 'Markbröckel vorhanden' zusammengefasst.
- Die 6 Subgruppen des Kriteriums 'Remission' wurden in 4 Untergruppen 'nicht beurteilbar', 'M1/ Remission (Blasten  $\leq$  5%)', 'M2 (Blasten  $\geq$  5-25%)', 'M3 (Blasten  $\geq$  25%)' zusammengefasst.
- Die 6 Subgruppen des Kriteriums 'Regeneration' wurden in 3 Untergruppen 'Aussage nicht möglich', 'keine Regeneration', 'in Regeneration' zusammengefasst.
- Die 4 Subgruppen des Kriteriums 'Repräsentanz' wurden in 3 Untergruppen 'nicht beurteilbar', 'nicht repräsentativ' und 'repräsentativ' zusammengefasst.
- Die 3 Subgruppen der 'RP' 'keine Aussage', 'empfohlen' und 'nicht empfohlen' wurden belassen.

Diese endgültigen Subgruppen wurden für die Datenanalyse mit Zahlencodes versehen. Dafür wurden natürliche Zahlen einschließlich der Null verwendet.

Da die Daten zu allen morphologischen Kategorien nicht bei allen Patienten in gleichem Umfang dokumentiert waren, wurden die fehlenden Angaben vor der eigentlichen Datenanalyse in einem Zwischenschritt aus den Labor-Archiven abgeleitet: Fehlende Angaben zu den Kriterien 'Regeneration' und 'Repräsentativität' wurden in Absprache und nach den Definitionen der Referenz-MTAs des Morphologie-Labors und der Studienärzte ergänzt und so die Morphologie-Daten für sämtliche Patienten vervollständigt.

### **2.3.1.1 Ergänzungen zum Kriterium der Markbröckelmenge**

Die Markbröckelmenge wurde auf den morphologischen Befundscheinen von 2001 bis Juni 2005 noch nicht dokumentiert und wurde erstmals am 15.07.2005 auf den Bögen mit erfasst. Auf die Ergebnisse der weiteren Analysen im Rahmen dieser Arbeit hat dies jedoch keine nachteiligen Auswirkungen, da es sich im Wesentlichen um intrapersonelle Vergleiche von Daten handelt und dieser Wert innerhalb der Daten-Paare jeweils identisch ist. In der Darstellung der Ergebnisse (Kap. 3) wird darauf noch einmal gesondert eingegangen.

### 2.3.1.2 Ergänzungen zum Kriterium der Regeneration

Die Zellregeneration ist ein wichtiges Kriterium dieser Arbeit, da es in die Beurteilung der Repräsentanz der KM-Proben mit einfließt. Aus diesem Grund wurde der Grad der KM-Regeneration überall dort, wo diese Einschätzung in den Morphologie-Begleitscheinen fehlte, anhand der Bewertungskriterien des Referenz-Morphologie-Labors aus den archivierten Morphologie-Daten abgeleitet:

- In der Probe müssen sowohl Erythrozyten als auch Granulozyten vorhanden sein.
- Das Verhältnis der Erythrozyten zu den Granulozyten sollte 1 : 3 betragen.
- Die Erythropoese hat einen Anteil von 30-40% am gesamten Zellbild.
- Die Granulopoese hat einen Anteil von 20-25% am gesamten Zellbild.
- Aus allen Zellstufen der Erythropoese und der Granulopoese muss mindestens eine Zelle vorhanden sein, insbesondere die Vorstufen der Zellen.
- Beträgt der Anteil der Erythrozyten mehr als 60%, dann dürfen es nicht nur normochrome Zellen sein.
- Mindestzahl der Zellstufen als Zeichen der KM-Regeneration (Tab. 3 und 4):

a) Zellzahlen der Erythropoese (Tab. 3):

**Tab. 3: Mindestzellzahl der Erythropoese als Zeichen der Knochenmarkregeneration.**

Zellen der Erythropoese im KM* <sup>1</sup>	Mindestzellzahl* <sup>2</sup>
Proerythroblasten	2
basophile Erythroblasten	0,5
Normoblasten	11
- basophile	3
- polychromatische	2
- oxyphile	6

\*<sup>1</sup> KM = Knochenmark \*<sup>2</sup> Mindestzellzahl pro Gesichtsfeld

b) Zellzahlen der Granulopoese (Tab. 4):

**Tab. 4: Mindestzellzahl der Granulopoese als Zeichen der Knochenmarkregeneration.**

Zellen der Granulopoese im KM* <sup>1</sup>	Mindestzellzahl* <sup>2</sup>
Promyeloblasten	1
Myelozyten	0,5
Metamyelozyten	2
Stabkernige	2
Segmentkernige	10

\*<sup>1</sup> KM = Knochenmark \*<sup>2</sup> Mindestzellzahl pro Gesichtsfeld

- Beurteilung des KM-Regenerationsgrades anhand des Erythrozytenanteils (Tab. 5):

**Tab. 5: Knochenmarkregeneration anhand des Erythrozytenanteils im Knochenmark.**

Erythrozytenanteil im KM*1 in %	KM-Regeneration
0-1.5%	keine, bzw. nicht ausreichende Regeneration
1.6-5%	extrem langsame Regeneration
5.1-15%	sehr langsame Regeneration
15.1-30%	langsame Regeneration
> 30%	KM in Regeneration

\*1 KM = Knochenmark

Zur besseren Einschätzung der KM-Regeneration, die nicht schon auf dem Morphologie-Begleitschein eingetragen war, wurden zusätzlich die Befundscheine mit abgeglichen, in denen eine Bewertung hinsichtlich der KM-Regeneration vorhanden war.

### 2.3.1.3 Ergänzungen zum Kriterium der Repräsentanz

Schließlich enthielten auch nicht alle morphologischen Befundscheine eine Beurteilung der Repräsentanz der jeweiligen KM-Probe. In den Fällen, in denen die Einschätzung der Repräsentanz fehlte, wurde sie ebenfalls nachträglich und nach Rücksprache mit den Referenz-Laborassistenten aus den archivierten Morphologie-Daten abgeleitet. Zum Vergleich wurden auch hier die Befundscheine herangezogen, in denen eine Bewertung der KM-Repräsentanz vorhanden war.

Die Bewertung der Repräsentanz erfolgte aus dem Umfang der Zellregeneration der jeweiligen Aspirate sowie aus drei weiteren morphologischen Kriterien, die in Abstimmung mit den Referenz-MTAs und den Studienärzten definiert wurden: 1. der Zellularität, 2. der Menge der Megakaryozyten und 3. dem Remissionsstatus. Je höher die Anzahl der Zellen und Megakaryozyten war und je besser der Remissionsstatus sowie der Grad der Zellregeneration, desto eher wurde der KM-Probe als repräsentativ eingestuft. Lagen demgegenüber hypozelluläre KM-Aspirate vor und demzufolge nur wenige analysierbare Zellen, oder waren nur wenige Megakaryozyten und Markbröckel im KM-Punktat vorhanden, dann wurde die Probe als nicht repräsentativ bewertet.

Schließlich wurde die Beurteilung, ob ein KM-Punktat als repräsentativ bezeichnet werden konnte, auch durch die DNA-Menge beeinflusst, die während der KM-Punktion gewonnen wurde. Geringe Punktatmengen gingen dabei häufig mit niedrigen Zellzahlen und einer eher schlechten Beurteilbarkeit der Zellmorphologie, d. h. mit einer geringeren Repräsentanz einher.



Anhand dieser Richtlinien war es möglich, die Mehrheit der KM-Punktionen eindeutig den Subgruppen der Kategorie 'Repräsentanz' zuzuordnen. In manchen Fällen war allerdings eine eindeutige Beurteilung erschwert, wenn beispielsweise laut Befundschein keine Markbröckel und keine Megakaryozyten vorhanden waren, demgegenüber jedoch eine Zellregeneration vermerkt war. Diese Fälle wurden alle einzeln mit den leitenden MTAs des Morphologie-Labors reanalysiert und dann anhand deren Einschätzung den Subgruppen der Repräsentanz zugeordnet.

### **2.3.2 Bearbeitung und Re-Analyse der MRD-Daten**

Die MRD-Daten der eingeschlossenen Patienten stammen aus den Archiven des Instituts für Humangenetik am Universitätsklinikum in Heidelberg (Direktor Prof. Dr. med. Claus R. Bartram) und wurden in einem 3-wöchigen Laboraufenthalt dort zusammengetragen.

Zunächst wurden die Primärdaten zur MRD mit dem Ziel erfasst, jede KM-Probe entweder als MRD-positiv oder MRD-negativ einzustufen. Im Anschluss daran wurde jede positive Probe weiter in die Kategorien 'quantifizierbar' oder 'nicht quantifizierbar' unterteilt, und schließlich wurde jeder MRD-positiven und quantifizierbaren Probe ein wahrer Wert zugeordnet, sowie für jede MRD-positive, jedoch nicht mehr quantifizierbare KM-Probe ein möglichst genauer Näherungswert bestimmt. Dabei erfolgte die Einstufung der vorliegenden Proben als 'quantifizierbar' oder 'nicht quantifizierbar' standardisiert gemäß den europäischen Vorgaben zur MRD-Diagnostik bei akuter lymphatischer Leukämie, den ESG-Guidelines der RQ-PCR Daten-Interpretation.<sup>51</sup>

Für die Auswertung semiquantitativer Messverfahren wie der nested PCR sind diese Richtlinien nicht formuliert worden. Um dennoch eine einheitliche Auswertung der Daten im Rahmen dieser Arbeit zu gewährleisten, sowie einen Vergleich zwischen den Ergebnissen aus quantitativen und nested PCR-Analysen zu ermöglichen, sind die ESG-Guidelines zur MRD-Diagnostik nachträglich auf die nested PCRs angewendet worden. Hierdurch war es möglich, die nested PCRs gemäß den ESG-Guidelines analog zu den quantitativen PCR-Analysen zu evaluieren und mit diesen zu vergleichen.

In einer 4-wöchigen Schulung durch die Laborassistenten in Kiel wurde die Auswertung der nested PCR geprobt, bevor sie in dem 3-wöchigen Aufenthalt im Heidelberger Labor umgesetzt wurde.

### 2.3.2.1 ESG-Guidelines für die Auswertung der PCR-Analysen

Für die Auswertung der PCR-Analysen im Rahmen dieser Arbeit kamen die europäischen ESG-Richtlinien zur Anwendung:

#### Experimentelle Grundlagen:

##### 1. Die Standardkurve:

- Sie wird erstellt unter Hinzunahme der DNA aus mononukleären Zellen (MNC-DNA) von mindestens 5 gesunden Probanden.
- Innerhalb der MNC-DNA wird die Ziel-DNA per Reihenverdünnung bestimmt.
- Die Standardkurve sollte sich von  $10^{-1}$  bis wenigstens  $10^{-5}$  erstrecken.
- Die Standardkurve sollte wenigstens zweifach getestet werden.
- Bei dreifach vorhandenen Werten sollten alle Werte berücksichtigt werden, mit Ausnahmen von Fällen, in denen technische Gründe die Ursache sind.

##### 2. Der Background:

- Ist definiert als nicht-spezifische Amplifikation einer nicht-leukämischen DNA.
- Wird festgelegt durch die Analyse der MNC-DNA von mind. 5 gesunden Probanden.
- Sollte wenigstens 6-fach durchgeführt werden.

##### 3. Der Grenzwert:

- Sollte im unteren Anteil des linear-logarithmischen Bereichs der Amplifikationskurven festgelegt werden.

##### 4. Kriterien für die Standardkurve:

- Sie sollte die niedrigste Verdünnung des quantitativen Bereichs und sämtlicher vorangehenden Verdünnungen mit einschließen.
- Sie sollte mindestens 3 Verdünnungsreihen enthalten.
- Sie sollte einen minimalen Bereich von 2 Log-Stufen abdecken.
- Sie sollte eine Steigung zwischen - 3.1 und - 3.9 sowie einen Korrelationskoeffizienten von  $\geq 0.98$  aufweisen.

##### 5. Kriterien für den quantitativen Bereich:

- Die niedrigste Verdünnung des quantitativen Bereichs muss spezifische DNA-Amplifikationen ergeben (bzw. gute Amplifikationskurven).
- Sie muss wiederholbare Amplifikationen liefern, d. h. der Differenzwert des Cycle Threshold (Zyklus-Schwellenwert,  $\Delta Ct$ ) sämtlicher Wiederholungen muss  $\leq 1.5$  betragen.

- Alle Ct-Werte müssen  $\geq 3.0$  unterhalb des niedrigsten Ct-Wertes des Backgrounds liegen (also niedriger sein als die Amplifikation, die in gesunder MNC-DNA gefunden wird).
- Sie muss im Verhältnis zum Durchschnitts-Ct-Wert der vorangegangenen Verdünnung einen durchschnittlichen Ct-Wert innerhalb eines definierten Bereichs aufweisen:
  - 2.6-4.0 Cts zwischen 10-fachen Verdünnungen (z. B.  $10^{-3}$  bis  $10^{-4}$ )
  - 0.5-1.5 Cts zwischen 2-fachen Verdünnungen (z. B.  $10^{-3}$  bis  $5 \times 10^{-4}$ )
- Werden die Kriterien für den quantitativen Bereich und die Standardkurve nicht erfüllt, dann entspricht die Qualität der RQ-PCR-Analyse nicht den notwendigen Mindestanforderungen und weitere Analysen sollten durchgeführt werden.

6. Kriterien für die Sensitivität:

- Die Sensitivität entspricht der niedrigsten Verdünnung, die spezifische Amplifikationen, bzw. gute Amplifikationskurven liefert.
- Sie muss wenigstens einen positiven Versuchswert aufweisen.
- Der  $\Delta Ct$ -Wert der Wiederholungen ist hier nicht relevant.
- Der niedrigste Ct-Wert muss  $\geq 1.0$  unterhalb des niedrigsten Ct-Wertes des Backgrounds liegen.

7. Kriterien für Positivität:

- Eine KM-Probe gilt dann als positiv, wenn der Ct-Wert von wenigstens einer der 2, bzw. 3 Wiederholungen innerhalb von 4.0 Cts - ausgehend vom höchsten Ct-Wert der Sensitivität - entfernt liegt und sämtliche Kriterien der Sensitivität erfüllt.
- Gleichzeitig muss der Ct-Wert von wenigstens einer der 2 oder 3 Wiederholungen um  $\geq 1.0$  unterhalb des niedrigsten Cts des Backgrounds liegen.
- Liegen diese Kriterien nicht vor, dann gilt die Probe als negativ.
- Sie gelten für Studien, die das Ziel einer Therapie-Reduktion verfolgen, bzw. die Prävention falsch-negativer Ergebnisse.

8. MRD-Level:

- $10^{-5}$ :  $\geq 5 \times 10^{-6}$  bis  $< 5 \times 10^{-5}$
- $10^{-4}$ :  $\geq 5 \times 10^{-5}$  bis  $< 5 \times 10^{-4}$
- $10^{-3}$ :  $\geq 5 \times 10^{-4}$  bis  $< 5 \times 10^{-3}$
- $10^{-2}$ :  $\geq 5 \times 10^{-3}$  bis  $< 5 \times 10^{-2}$
- $10^{-1}$ :  $\geq 5 \times 10^{-2}$  bis  $< 5 \times 10^{-1}$

### Grundlagen für die Datenanalyse:

#### 1. Quantifizierbare MRD-positive KM-Proben:

- MRD-positive Proben können quantifiziert werden, wenn der durchschnittliche Ct-Wert der Wiederholungswerte  $\leq$  der höchste Ct-Wert des quantitativen Bereichs beträgt.
- Gleichzeitig muss der  $\Delta$ Ct-Wert der Wiederholungen  $\leq 1.5$  betragen.
- Eine Quantifizierung sollte erfolgen unter Verwendung der Standardkurve, indem Verdünnungsreihen außerhalb des quantitativen Bereichs ausgeschlossen werden,
- indem die Durchschnittsmenge der 2-, bzw. 3-fachen Wiederholungen der Folgeprobe verwendet wird, und
- indem die MRD-Last entsprechend der DNA-Qualität, bzw. Quantität korrigiert wird, wie sie durch die RQ-PCR eines Kontrollgens festgelegt ist.

#### 2. Nicht-quantifizierbare MRD-positive KM-Proben:

- Daten sollten dargestellt werden als 'positiv und kleiner als der quantitative Bereich' oder 'nicht eindeutig negativ', in Abhängigkeit vom klinischen Protokoll.
- Die Qualität, bzw. Quantität der DNA, die anhand der RQ-PCR-Analyse eines Kontrollgens überprüft wird, sollte sich innerhalb eines akzeptierbaren Bereichs befinden, der im Vorfeld festgelegt wird.

### **2.4 Finaler Datenfundus**

Eine Reihe von Patienten mussten von der Analyse ausgeschlossen werden. Dies waren Fälle

- die laut Morphologie-Labor eine RP erhalten haben, für die jedoch keine Repunktionsdaten vorlagen.
- bei denen ein zweites Mal DNA-Material der vorhandenen KM-Probe vom MRD-Labor in Heidelberg angefordert worden war, ohne dass eine erneute Punktion durchgeführt worden ist.
- die zwar eine RP erhalten haben, deren MRD-Befunde jedoch nicht einheitlich interpretierbar waren.
- für die Repunktionsdaten an den Untersuchungszeitpunkten I (Tag 0) oder R2 vorhanden sind, die aber beide für die vorliegende Arbeit nicht relevant sind.
- Schließlich wurden Patienten ausgeschlossen, bei denen zwei oder mehr als zwei Repunktionen durchgeführt wurden, da in dieser Arbeit die Wertigkeit gepaarter Morphologie-Befunde aus Erst- und Folgepunktion untersucht wurde und eine einheitliche Vergleichbarkeit bei mehreren Repunktionen nicht gegeben wäre.

## **2.5 Statistische Methoden**

Die in dieser Arbeit erfassten und ausgewerteten Daten der ALL-BFM 2000 Studie stammen aus den jeweiligen Referenzlaboratorien der Universitäten in Kiel und Heidelberg und wurden in der Studienzentrale in Hannover gesammelt und auf Richtigkeit überprüft. In regelmäßigen Abständen wurden die Daten mit dem statistischen Analyse System SAS (statistical analysis system) ausgewertet und der Studienkommission sowie dem 'Data and Safety Monitoring Committee' (DSMC) zur Mitbeurteilung vorgelegt.

In dieser Arbeit wurde die statistische Auswertung mit SPSS, dem Superior Performing Software System durchgeführt. Zur Analyse der Bedeutung von KM-Repunktionen am Ende der Induktionstherapie für die Therapie-Stratifizierung und das Therapie-Ergebnis im Rahmen der Therapieoptimierungsstudie ALL-BFM 2000 wurden Log-Rank-Tests verwendet, zur Darstellung des pEFS kamen Kaplan-Meier-Plots zum Einsatz.<sup>52,53</sup>

Die Datenanalyse und Datenauswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit den Studienärzten aus Kiel und Heidelberg sowie den Studienstatistikern in Hannover.

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Studie wurden letztlich die Daten von 312 Kindern und Jugendlichen mit einer ALL analysiert. Für diese Patienten liegen größtenteils gepaarte Morphologie- und MRD-Befunde nach erfolgter OP und wiederholter RP des KM an Therapietag 33 vor, wobei an beiden untersuchten Punktionszeitpunkten nicht für alle Patienten MRD-Befunde und Daten aus allen zytomorphologischen Subgruppen gleichermaßen vorhanden waren: MRD-Ergebnisse lagen sowohl an OP und RP bei 289 Patienten vor, Angaben zur Leukozytenzahl bei 231 und 214 Patienten (OP und RP), Angaben zur Zellularität bei 236 und 226 Patienten, Angaben zu den Markbröckeln bei 135 und 129 Patienten, Angaben zu den Megakaryozyten bei 236 und 227 Patienten, und genaue Angaben zum Abstand zwischen OP und RP waren für 220 Patienten vorhanden.

Mit eingeschlossen in die Studie wurden Patienten, die in einem parallelen Projekt der kooperierenden Prager Studiengruppe anhand der gleichen Parameter dokumentiert und analysiert wurden. Von den 312 Patienten wurden 293 nach dem Protokoll ALL-BFM 2000 therapiert und 19 Patienten nach dem ALL IC-BFM 2002 Regime. Wegen der besseren Lesbarkeit und bei vergleichbarer Therapie von ALL-BFM 2000 und ALL IC-BFM 2002 wird in den Analysen nicht zwischen den Protokollen unterschieden und in der gesamten Arbeit nur vom ALL-BFM 2000 Protokoll gesprochen. Beide Therapieprotokolle sind durch die zuständigen Ethikkommissionen in Hannover, Prag und Wien genehmigt worden, und das Einverständnis der Patienten bzw. derer gesetzlicher Vertreter lag vor Durchführung der Untersuchungen vor.

Die klinischen und biologischen Charakteristika der Patienten bzw. Leukämien sind in Tabelle 6 gezeigt, zum Vergleich diente eine unselektierte Kohorte aus 3846 konsekutiv in die Studie aufgenommenen Patienten ohne RP, die ebenfalls nach dem ALL-BFM 2000 Protokoll behandelt wurden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren im untersuchten Kollektiv signifikant häufig weibliche Patienten vertreten ( $p = 0.044$ ), Patienten mit einer B-ALL ( $p = 0.023$ ), Patienten, die TEL/AML-negativ waren ( $p = 0.033$ ) und weniger MRD-SR-Patienten ( $p = 0.039$ ).

In der folgenden Tabelle sind die Patientencharakteristika sowohl der in dieser Arbeit eingeschlossenen als auch der nicht eingeschlossenen Patienten aus einer repräsentativen Kohorte zusammengefasst (Tab. 6):

Tab. 6. Klinische und biologische Charakteristika der in die Studie eingeschlossenen Patienten im Vergleich zu einer repräsentativen Kohorte.

Eigenschaft	Kontrollkohorte nicht analysiert (%)	Studienkohorte analysiert (%)	P*1
Anzahl der Patienten	3846 (100)	312 (100)	
<b>Geschlecht</b>			<b>0.044</b>
männlich	2167 (56.3)	157 (50.3)	
weiblich	1679 (43.7)	155 (49.7)	
<b>Alter bei Diagnose (Alter)</b>			<b>0.946</b>
1 – 9	2870 (74.6)	232 (74.4)	
≥ 10	976 (25.4)	80 (25.6)	
<b>Leukozytenzahl (x 10<sup>10</sup>/l)</b>			<b>0.064</b>
< 1	1803 (46.9)	145 (46.5)	
1 – 4.99	1246 (32.4)	116 (37.2)	
5 – 9.99	392 (10.2)	19 (6.1)	
≥ 10	405 (10.5)	32 (10.3)	
<b>Prednisone responder*2</b>			<b>0.767</b>
good	3433 (90.1)	277 (89.6)	
poor	377 (9.9)	32 (10.4)	
<b>MRD*3</b>			<b>0.039</b>
MRD-SR	1280 (41.3)	83 (33.3)	
MRD-MR	1596 (51.5)	148 (59.4)	
MRD-HR	566 (7.3)	18 (7.2)	
<b>Immunzytologie</b>			<b>0.023</b>
nicht-T-ALL	3202 (85.2)	278 (90.0)	
T-ALL	557 (14.8)	31 (10.0)	
<b>ETV6/RUNX1</b>			<b>0.033</b>
negativ	2746 (76.5)	248 (81.8)	
positiv	844 (23.5)	55 (18.2)	
<b>Endgültige Risikogruppe</b>			<b>0.202</b>
SR	1240 (32.2)	86 (27.6)	
MR	2040 (53.0)	174 (55.8)	
HR	566 (14.7)	52 (16.7)	

\*1 Studienkohorte im Vergleich zur nicht untersuchten Kohorte im Chi<sup>2</sup>-Test

\*2 PGR: < 1000 Blasten/ µl am Therapietag 8; PPR: ≥ 1000 Blasten/ µl

\*3 MRD Risikogruppen: MRD-SR: R1 und R2 negativ; MRD-MR: R1 und/oder R2 < 10<sup>-3</sup>, MRD-HR: R2 ≥ 10<sup>-3</sup>

Bei 32% der 312 Patienten musste eine wiederholte KM-Punktion durchgeführt werden, weil die Morphologie der KM-Probe als nicht repräsentativ gewertet wurde; in 33% der Fälle aufgrund nicht ausreichenden MRD-Materials und in 35% der Fälle aufgrund unzureichender Morphologie- und MRD-Befunde zugleich.

### 3.1 Vergleich der gemessenen MRD zwischen Original- und Repunktion

Bei dem Vergleich der MRD von OP und RP zeigte sich, dass die MRD-Last bei 63% der Patienten (181/289) konstant blieb, bei 8% (23/289) anstieg, und bei 29% (85/289) abnahm (Tab. 7). Die Häufigkeitsverteilung der MRD-Last zum Zeitpunkt von OP und RP sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Tab. 7):

Tab. 7. MRD-Last zur Original- und zur Repunktion (angegeben in log-Stufen).

		Repunktion n* (%)					Gesamt
		negativ	$< 5 \times 10^{-4}$	$\geq 5 \times 10^{-4}$ - $< 5 \times 10^{-3}$	$\geq 5 \times 10^{-3}$ - $< 5 \times 10^{-2}$	$\geq 5 \times 10^{-2}$	
Original- Punktion n (%)	negativ	101 (34.9%)	12 (4.2%)	0 (0.0%)	2 (0.7%)	0 (0.0%)	115 (39.8%)
	$< 5 \times 10^{-4}$	49 (17.0%)	56 (19.4%)	5 (1.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	110 (38.1%)
	$\geq 5 \times 10^{-4}$ - $< 5 \times 10^{-3}$	1 (0.3%)	18 (6.2%)	16 (5.5%)	3 (1.0%)	0 (0.0%)	38 (13.1%)
	$\geq 5 \times 10^{-3}$ - $< 5 \times 10^{-2}$	0 (0.0%)	4 (1.4%)	7 (2.4%)	3 (1.0%)	1 (0.3%)	15 (5.2%)
	$\geq 5 \times 10^{-2}$	0 (0.0%)	0 (0.0%)	2 (0.7%)	4 (1.4%)	5 (1.7%)	11 (3.8%)
	<b>Gesamt</b>	151 (52.2%)	90 (31.1%)	30 (10.4%)	12 (4.2%)	6 (2.1%)	289 (100%)

\* n = Anzahl der Patienten

Für die Risikostratifizierung (SR vs. MR) war jedoch die Unterscheidung relevant, ob die KM-Probe zum Zeitpunkt R1 positiv oder negativ war. Betrachtet man diesen Aspekt, so zeigte sich, dass in knapp 78% der Fälle (225/289) das MRD-Ergebnis (positiv oder negativ) von OP und RP gleich war, es in etwa 5% der Fälle (14/289) initial negativ war und in der RP positiv wurde, und in 17% der Fälle (50/289) initial positiv und in der RP negativ war. In der folgenden Tabelle sind die Häufigkeiten von MRD-Positivität vs. MRD-Negativität zum Zeitpunkt der OP und RP zusammengefasst (Tab. 8):



**Tab. 8: MRD-Positivität und Negativität zur Original- und Repunktion.**

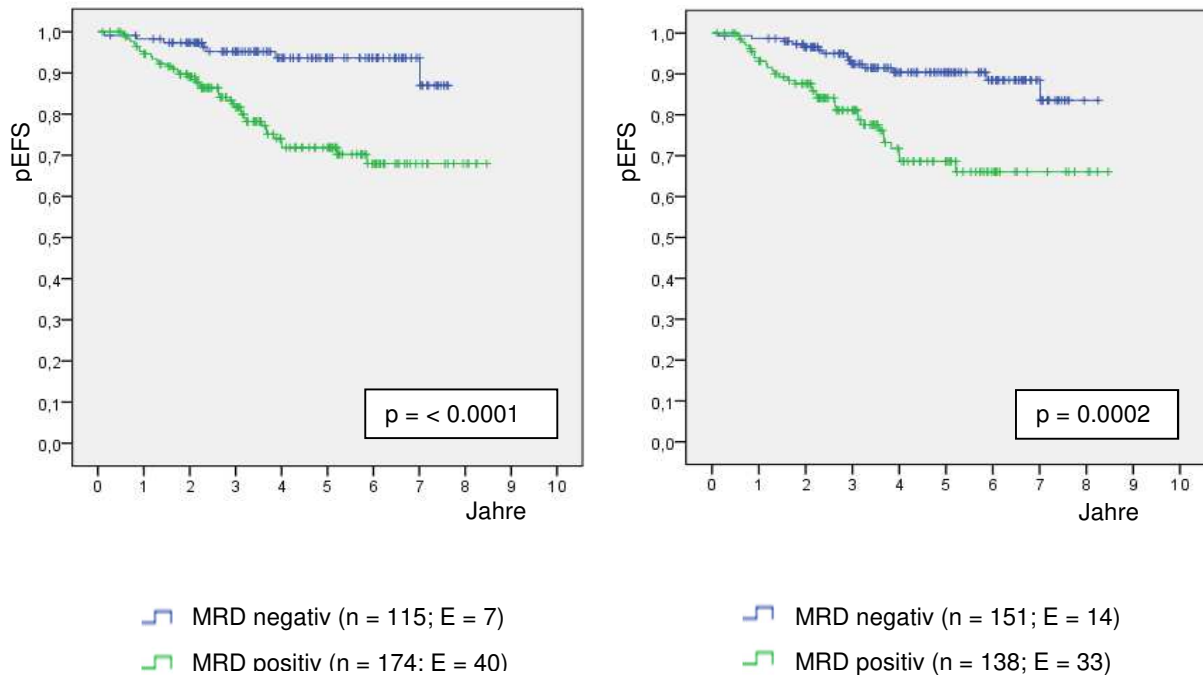
Eigenschaft	RP neg. n (%) <sup>*1,2</sup>	RP pos. n (%) <sup>*3</sup>	Gesamtsumme n (%)
OP neg. <sup>*4</sup>	101 (34.9%)	14 (4.8%)	115 (39.8%)
OP pos.	50 (17.3%)	124 (42.9%)	174 (60.2%)
<b>Gesamtsumme</b>	151 (52.2%)	138 (47.8%)	289 (100%)

\*1 RP = Repunktion \*2 neg. n = Anzahl der Patienten mit negativer MRD \*3 pos. n = Anzahl der Patienten mit positiver MRD \*4 OP = Originalpunktion

Zwölf der 14 Patienten, die in der OP MRD-negativ waren und in der RP MRD-positiv wurden, sind nur sehr niedrig positiv getestet worden, so dass hier die MRD-Befunde als grenzwertig negativ/(leicht) positiv gewertet wurden. In den beiden anderen Fällen war die MRD-Last der RP größer als  $10^{-3}$  und damit eindeutig positiv. Die MRD-Ergebnisse der OP dieser Patienten müssen jedoch möglicherweise als falsch negativ bewertet werden, da bei der OP nur sehr geringe DNA-Mengen zur Analyse vorlagen.

Dennoch wäre bei allen Patienten mit einem MRD-Anstieg, bzw. MRD-Abfall eine unterschiedliche Risikostratifizierung möglich gewesen, je nachdem, ob die OP oder die RP dafür zugrunde gelegt worden wäre: MRD-Negativität bedeutet Stratifizierung in die SR-Gruppe, MRD-Positivität bedeutet Stratifizierung in die MR-Gruppe (sofern jeweils keine zusätzlichen HR-Kriterien vorliegen und für die SR-Stratifizierung die Punktion zum Zeitpunkt 2 ebenfalls negativ ist). Die unterschiedlichen MRD-Befunde hätten gemäß dieser Vorgaben bei etwas mehr als 22% der Betroffenen zu einer abweichenden Risikostratifizierung geführt. Darunter sind 17.3% mit positiv/negativem MRD-Befund in OP und RP, sowie 4.8% mit negativ/positivem MRD-Befund in OP und NP (Tab. 8).

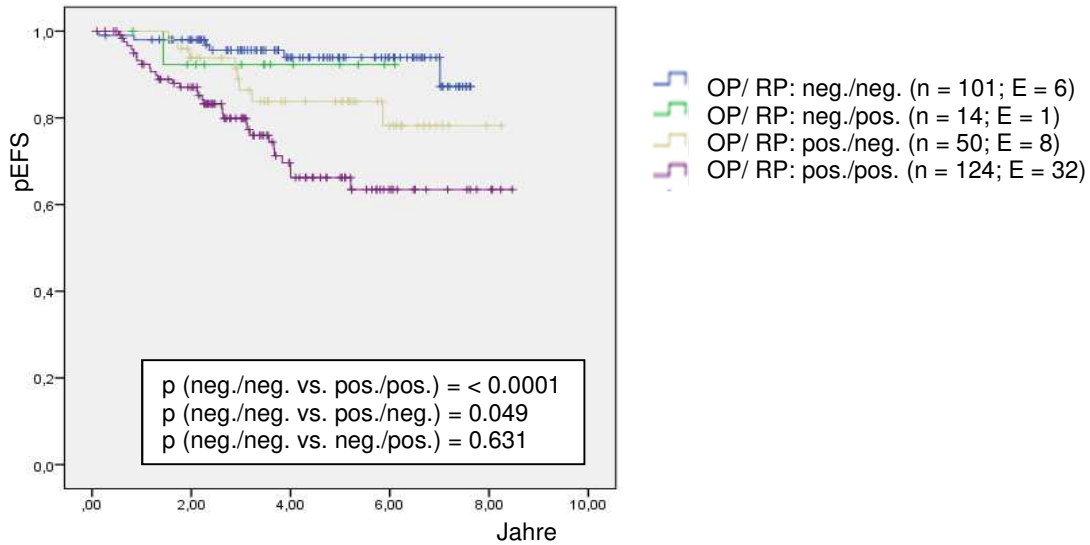
Insgesamt war unabhängig vom Zeitpunkt (OP oder RP) eine höhere MRD-Last am Ende der Induktionstherapie mit einem höheren Risiko des Therapieversagens assoziiert: Die Wahrscheinlichkeit für ein 5-Jahres-pEFS für MRD-negative gegenüber MRD-positiven Patienten betrug  $0.94 \pm 0.03$  gegenüber  $0.72 \pm 0.04$ ; Hazard Ratio 4.41 [1.97-9.85];  $p = < 0.0001$ ) bei Analyse der OP; und  $0.90 \pm 0.03$  vs.  $0.69 \pm 0.05$  (Hazard Ratio 3.31 [1.77-6.21];  $p = 0.0002$ ) bei Analyse der RP (Abb. 2).



pEFS = Wahrscheinlichkeit des Event Free Survival    OP = Originalpunktion    RP = Repunktion    p = Signifikanz  
 n = Anzahl der Patienten    E = Event

**Abb. 2: pEFS für MRD-Positivität vs. MRD-Negativität jeweils zur Original- (links) und Repunktion (rechts).** Auf der linken Seite ist das 5-Jahres-pEFS bei MRD-Positivität vs. MRD-Negativität in der Originalpunktion dargestellt, während die Abbildung rechts das 5-Jahres-pEFS bei MRD-Positivität und MRD-Negativität in der Repunktion zeigt.

Bezüglich der prognostischen Relevanz der MRD-Ergebnisse aus der OP im Vergleich zur RP lässt sich Folgendes feststellen: Ein Drittel der Patienten mit negativem MRD-Ergebnis in der RP war MRD-positiv in der OP. Hier hätte bei Berücksichtigung der Ergebnisse der OP eine Stratifizierung nach MR stattgefunden, während bei Berücksichtigung des Repunktionsergebnisses eine Stratifizierung nach SR erfolgt wäre. Für diese Patienten (positiv für die OP, negativ für die RP) zeigte sich im Vergleich zu den Patienten, die bereits in der OP negativ waren, ein signifikant schlechteres EFS (5-Jahres-pEFS MRD-positiv/ MRD negativ 0.84 +/- 0.06 vs. MRD-negativ/ MRD-negativ: 0.94 +/- 0.03; p = 0.049). Diesen Zusammenhang zeigt die folgende Abbildung (Abb. 3):



pEFS = Wahrscheinlichkeit des Event Free Survival OP = Originalpunktion RP = Repunktion n = Anzahl der Patienten E = Event p = Signifikanz

**Abb. 3: pEFS für MRD-Positivität vs. MRD-Negativität im Vergleich Original- und Repunktion.** Dargestellt ist das pEFS für MRD-Positivität vs. MRD-Negativität im Vergleich von Original- und Repunktion für die vier möglichen Kombinationen von OP und RP: neg./neg., neg./pos., pos./neg. und pos./pos.

Beim Vergleich der Patienten, die in der RP MRD-positiv wurden und jenen, die in beiden Proben MRD-negativ waren, konnten keine Unterschiede im pEFS festgestellt werden ( $p = 0.631$ ) (Abb. 3), wobei die Anzahl der Patienten, die in der RP MRD-positiv wurden, zu gering war, um eine sichere Aussage treffen zu können.

Zusammenfassend lässt sich zur Relevanz der MRD-Ergebnisse feststellen:

- Die MRD-Last in der RP unterscheidet sich häufig von der MRD-Last in der OP.
- Im Falle eines Unterschiedes ist die MRD-Last meistens höher in der OP und niedriger in der RP.
- Diese Unterschiede können potentiell zu einer Stratifizierung in eine andere Risikogruppe in einer erheblichen Anzahl von Fällen führen.
- Das pEFS von Patienten, die MRD-positiv in der OP waren und MRD-negativ in der RP wurden ist signifikant schlechter als das pEFS von Patienten, die bereits in der OP negativ waren.
- MRD-Analysen, die zum gemäß Therapie-Protokoll geplanten Zeitpunkt durchgeführt wurden, scheinen besser geeignet zur Identifizierung von Standard-Risiko Patienten.
- Unabhängig vom Zeitpunkt der Punktion (OP oder RP) war eine hohe MRD-Last mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für ein Therapieversagen assoziiert.

### 3.2 Relevanz der Punktionsverzögerung infolge der Repunktion

Genauere Angaben zur Punktionsverzögerung zwischen dem Ende der Induktionstherapie (Protokoll IA) und dem Beginn der Konsolidierung (Protokoll IB) waren für 220 Patienten vorhanden. Gemäß ALL-BFM 2000 Protokoll liegen 3 Tage zwischen dem Ende von Protokoll IA (Tag 33, dem protokollgerechten Zeitpunkt der KM-Punktion am Zeitpunkt 1) und dem Beginn von Protokoll IB (Tag 36), und neben bestimmten klinischen Voraussetzungen ist eine ausreichende morphologische KM-Regeneration notwendig für eine Fortsetzung der Behandlung mit Protokoll IB.

Ein größerer Abstand zwischen Original- und RP resultierte fast immer in einem verzögerten Beginn von Protokoll IB. Bei 17% der Patienten (37/220) konnte die Behandlung nach regulärem Therapieregime, also 3 Tage nach dem Ende von Protokoll IA fortgesetzt werden; in 26% der Fälle (58/220) wurde mit Protokoll IB erst innerhalb von 4 bis 7 Tagen nach Ende der Induktionstherapie begonnen, und bei 57% der Patienten (125/220) wurde die Chemotherapie frühestens nach 8 Tagen fortgeführt.

Der Zusammenhang zwischen Punktions- und Therapieverzögerung ist in Tab. 9 gezeigt. Da beide nicht unabhängig voneinander sind, erfolgt im Weiteren nur die Betrachtung der Punktionsverzögerung (Tab. 9):

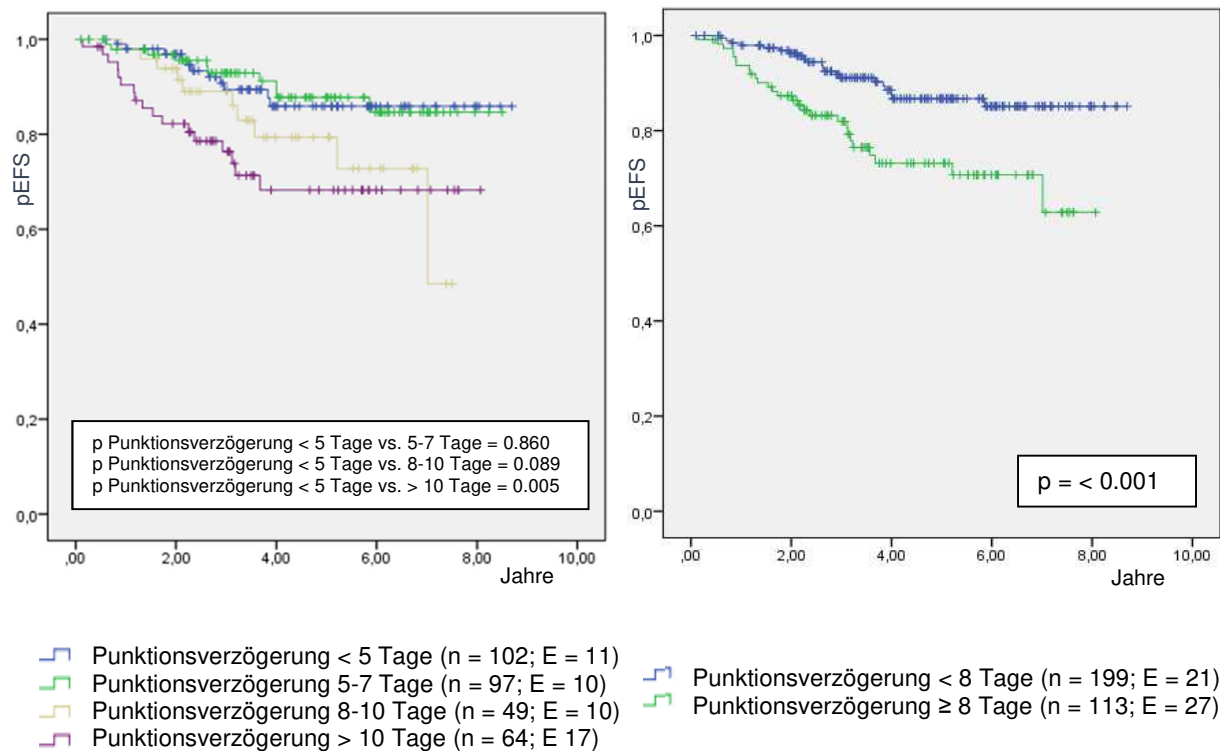
**Tab. 9: Zusammenhang zwischen Punktions- und Therapieverzögerung nach Protokoll IA vor Beginn von Protokoll IB.**

<b>Therapieverzögerung → Punktionsverzögerung ↓</b>	<b>&lt; 5 Tage n* (%)</b>	<b>5-7 Tage n (%)</b>	<b>8-10 Tage n (%)</b>	<b>&gt; 10 Tage n (%)</b>	<b>Gesamt n (%)</b>
<b>&lt; 5 Tage</b>	48 (21.8%)	8 (3.6%)	6 (2.7%)	6 (2.7%)	68 (30.9%)
<b>5-7 Tage</b>	4 (1.8%)	34 (15.5%)	16 (7.3%)	15 (6.8%)	69 (31.4%)
<b>8-10 Tage</b>	0 (0.0%)	1 (0.5%)	16 (7.3%)	22 (10.0%)	39 (17.7%)
<b>&gt; 10 Tage</b>	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (0.5%)	43 (19.5%)	44 (20.0%)
<b>Gesamt</b>	52 (23.6%)	43 (19.5%)	39 (17.7%)	86 (39.1%)	220 (100%)

\* n = Anzahl der Patienten

Die Analysen zum pEFS zeigten eine signifikant schlechtere Prognose für Patienten mit einer Punktionsverzögerung zwischen dem Ende von Protokoll IA und dem Beginn von Protokoll IB von mehr als einer Woche gegenüber einer Verzögerung von weniger als oder gleich einer

Woche (5-Jahres-pEFS 0.87 vs. 0.73;  $p = < 0.001$ ). Dieser Zusammenhang ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 4):



pEFS = Wahrscheinlichkeit des Event Free Survival n = Anzahl der Patienten E = Event p = Signifikanz

**Abb. 4: pEFS in Abhängigkeit von der Therapieverzögerung (4 Kategorien links vs. 2 Kategorien rechts).** Zu sehen ist der Zusammenhang von pEFS und Therapieverzögerung. Auf der linken Seite ist die Korrelation bei 4 Kategorien der Therapieverzögerung zu sehen, auf der rechten Seite bei 2 Kategorien.

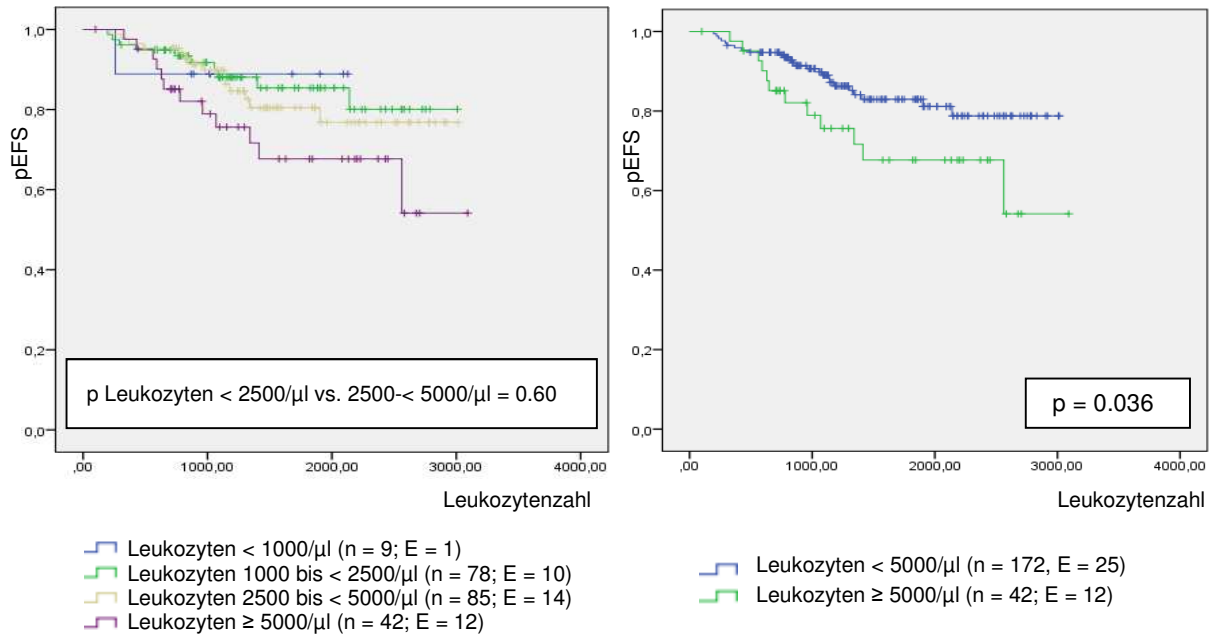
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Punktions- und damit nahezu immer auch Therapieverzögerung von mehr als einer Woche, mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert ist.

### 3.3 Relevanz zytomorphologischer Befunde zum Zeitpunkt von Original- und Repunktion

#### 3.3.1 Bedeutung der Leukozytenzahl

Die mediane Leukozytenzahl betrug 1300 Zellen/ $\mu$ l am Tag der OP (mit einer Spannweite von 200 bis zu 8300/ $\mu$ l) und 2900 Zellen/ $\mu$ l zum Zeitpunkt der RP (mit einer Spannweite von 300 bis 22400/ $\mu$ l) ( $p = < 0.001$ ). Am Tag der OP konnte der Leukozytenzahl keine prognostische

Bedeutung zugeschrieben werden (Daten werden nicht gezeigt), zum Zeitpunkt der RP hingegen zeigten die Analysen ein deutlich schlechteres Therapieergebnis für Patienten mit einer Leukozytenzahl von gleich oder mehr als 5000/ $\mu\text{l}$  im Vergleich zu Patienten mit einer Leukozytenzahl unter 5000/ $\mu\text{l}$  mit einem 5-Jahres-pEFS von 0.83 +/- 0.03 vs. 0.67 +/- 0.09;  $p = 0.036$ ). Diesen Zusammenhang zeigt die folgende Abbildung (Abb. 5):



pEFS = Wahrscheinlichkeit des Event Free Survival n = Anzahl der Patienten E = Event p = Signifikanz

**Abb. 5: pEFS in Abhängigkeit von der Leukozytenzahl bei Repunktion (4 Kategorien links vs. 2 Kategorien rechts).** Dargestellt ist das pEFS in Abhängigkeit von der Leukozytenzahl bei Repunktion. Auf der linken Seite wird dieser Zusammenhang für 4 Kategorien der Leukozytenzahl gezeigt, auf der rechten für 2 Kategorien.

Interessanterweise haben Patienten mit einer Leukozytenzahl von unter 2500/ $\mu\text{l}$  (der empfohlenen Mindestmenge vor Beginn von Protokoll IB) im Vergleich zu Patienten mit einer Leukozytenzahl von 2500 bis 4999/ $\mu\text{l}$  eine ähnliche Prognose mit einem 5-Jahres-EFS von 0.86 +/- 0.04 vs. 0.81 +/- 0.05;  $p = 0.6$ ) (Abb. 5).

Mit zunehmendem Abstand zur vorausgehenden Chemotherapie ist mit einem Anstieg der Leukozytenzahl zu rechnen. Aus diesem Grunde erfolgte im nächsten Schritt die Analyse des Zusammenhangs zwischen Punktionsverzögerung (und damit Abstand zur vorausgehenden Therapie) und Leukozytenzahl und es bestätigte sich, dass mit zunehmender Punktionsverzögerung die Zahl der Patienten mit größer oder gleich 5000 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  steigt: So haben 62% der Patienten mit größer oder gleich 5000 Leukozyten/ $\mu\text{l}$  eine Punktionsverzögerung von mindestens 8 Tagen.

Die folgende Tabelle zeigte die Häufigkeitsverteilung von Punktionsverzögerung und Leukozytenzahl bei 2 Kategorien der Leukozyten und 4 Kategorien der Punktionsverzögerung (Tab. 10):

**Tab. 10: Zusammenhang zwischen Punktionsverzögerung und Leukozytenzahl.**

<b>Punktionsverzögerung → Leukozytenzahl ↓</b>	<b>&lt; 5 Tage n* (%)</b>	<b>5-7 Tage n (%)</b>	<b>8-10 Tage n (%)</b>	<b>&gt; 10 Tage n (%)</b>	<b>Gesamt n (%)</b>
<b>&lt; 5000/μl</b>	60 (89.6%)	52 (85.2%)	30 (75.0%)	30 (65.2%)	172 (80.4%)
<b>≥ 5000/μl</b>	7 (10.4%)	9 (14.8%)	10 (25.0%)	16 (34.8%)	42 (19.6%)
<b>Gesamt</b>	67 (100%)	61 (100%)	40 (100%)	46 (100%)	214 (100%)

\* n = Anzahl der Patienten

Betrachtet man nun die prognostische Relevanz von Punktionsverzögerung und Leukozytenzahl in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse, so zeigt sich, dass die Leukozytenzahl unter Berücksichtigung der Punktionsverzögerung nicht von unabhängigem prognostischem Wert war. Dagegen war eine extreme Therapieverzögerung aufgrund einer sehr späten RP auch unter Berücksichtigung der Leukozytenzahl prognostisch ungünstig. Diesen Zusammenhang zeigt die folgende Tabelle (Tab. 11):

**Tab. 11: Multivariate Cox-Regressionsanalyse für das pEFS unter Berücksichtigung von Leukozytenzahl bei Repunktion und Punktionsabstand.**

<b>Eigenschaft</b>	<b>Hazard Ratio</b>	<b>95% CI*<sup>1</sup></b>	<b>p*<sup>2</sup></b>
<b>Leukozyten &gt; 5000/μl</b>	1.577	0.769 – 3.234	0.214
<b>Punktionsabstand 5-7 Tage</b>	0.695	0.247 – 1.954	0.490
<b>Punktionsabstand 8-10 Tage</b>	1.513	0.579 – 3.952	0.398
<b>Punktionsabstand &gt; 10 Tage</b>	2.426	1.019 – 5.774	0.045

\*<sup>1</sup> CI = Konfidenzintervall \*<sup>2</sup>p = Signifikanz

Zusammenfassend lässt sich zur Leukozytenzahl sagen:

- Mit zunehmendem Abstand der Punktionen nimmt die Leukozytenzahl erwartungsgemäß zu.
- Hohe Leukozytenzahlen von größer oder gleich 5000/μl sind signifikant mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

- Patienten mit niedrigen Leukozytenzahlen von unter 2500/ $\mu\text{l}$  unterscheiden sich im Therapieergebnis nicht von Patienten mit Leukozytenzahlen von 2500-4999/ $\mu\text{l}$ .
- Die multivariate Cox-Regressionsanalyse zeigt, dass die Leukozytenzahl in gemeinsamer Betrachtung mit der Punktionsverzögerung kein unabhängiger prognostischer Faktor ist.

### 3.2.2 Bedeutung der Zellularität

Am Ende der Induktionstherapie war das KM bei vielen Patienten zellarm und zeigte häufig keine Anzeichen einer Regeneration. Demzufolge wurden viele KM-Proben als zytomorphologisch nicht repräsentativ gewertet und mussten wiederholt werden.

Für 221 Patienten lagen an beiden Punktionszeitpunkten Angaben zur Zellularität der KM-Proben vor: Bei 219 Patienten war die Zellularität der OP vermindert und blieb in 68.9% dieser Fälle auch in der RP reduziert (151/221). Demgegenüber stieg bei 31.1% (68/219) die Zellularität in der RP auf normale bis hohe Werte an. Bei den 2 übrigen Patienten war die Zellularität in der Original- und RP normal bis hoch. Die Häufigkeitsverteilung einer reduzierten vs. normalen Zellularität in OP und RP ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst (Tab. 12):

**Tab. 12: Zellularität zum Zeitpunkt von Original- und Repunktion.**

Zellularität	RP red. n (%) <sup>*1,2</sup>	RP normal n (%)	Gesamt n (%)
OP red. <sup>*3</sup>	151 (68.9%)	68 (31.1%)	219 (100%)
OP normal	0 (0.0%)	2 (100%)	2 (100%)
<b>Gesamt</b>	151 (68.3%)	70 (31.7%)	221 (100%)

\*1 RP = Repunktion \*2 red. n = Anzahl der Patienten mit reduzierter Zellularität \*3 OP = Originalpunktion

Wie auch bei der Leukozytenzahl ist mit zunehmendem Abstand zur vorausgehenden Chemotherapie mit einer Verbesserung der Zellularität zu rechnen. Aus diesem Grunde erfolgte im nächsten Schritt die Analyse des Zusammenhangs zwischen Punktionsverzögerung (und damit Abstand zur vorausgehenden Therapie) und Zellularität:

Es zeigte sich, dass die Anzahl der Patienten mit reduzierter Zellularität mit zunehmender Punktionsverzögerung abnahm: In 77.5% der Fälle, die eine Punktionsverzögerung von weniger als 5 Tagen hatten (55/71), war die Zellularität bei der RP reduziert. Von den 50



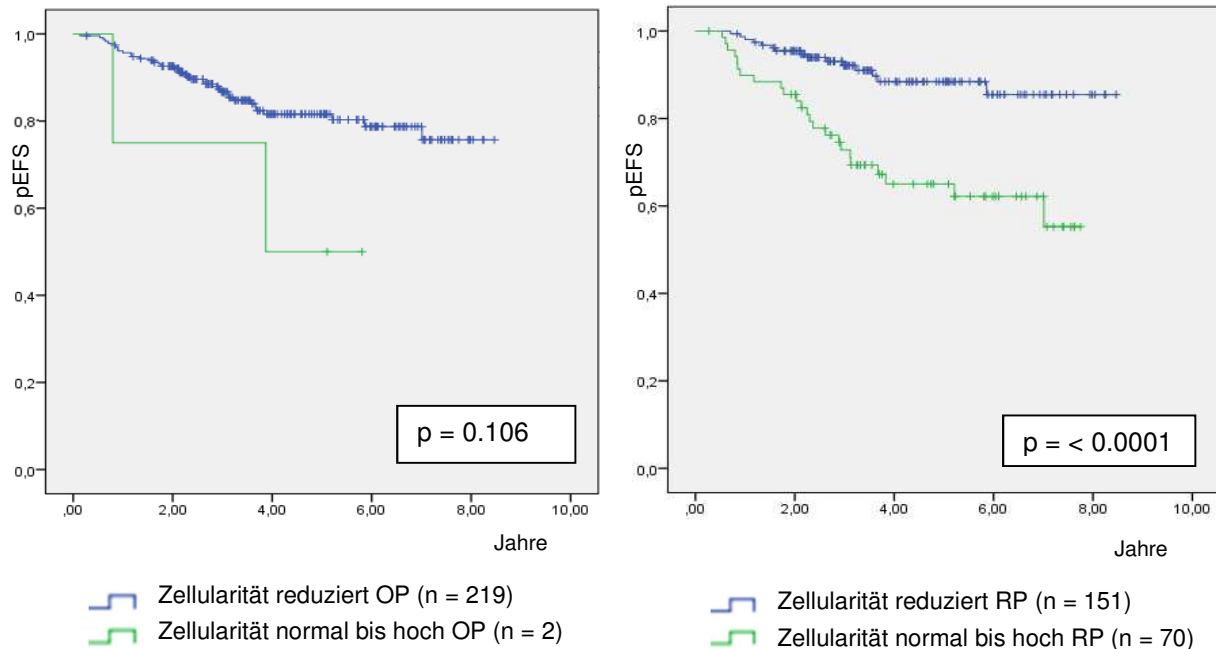
Patienten mit einer Punktionsverzögerung von über 10 Tagen hatte nur noch die Hälfte zum Zeitpunkt der RP ein zellarmes KM (25/50). Die Häufigkeiten einer reduzierten vs. normalen Zellularität bei Repunktion im Bezug auf 4 Kategorien der Punktionsverzögerung sind in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 13):

**Tab. 13: Knochenmark-Zellularität zum Zeitpunkt der Repunktion und Punktionsverzögerung.**

Punktionsverzögerung → Zellularität RP*1 ↓	< 5 Tage n*2 (%)	5-7 Tage n (%)	8-10 Tage n (%)	> 10 Tage n (%)	Gesamt n (%)
<b>reduziert</b>	55 (77.5%)	49 (77.8%)	27 (64.3%)	25 (50.0%)	156 (69%)
<b>normal bis hoch</b>	16 (22.5%)	14 (22.2%)	15 (35.7%)	25 (50.0%)	70 (31.0%)
<b>Gesamt</b>	71 (100%)	63 (100%)	42 (100%)	50 (100%)	226 (100%)

\*1 RP = Repunktion \*2 n = Anzahl der Patienten

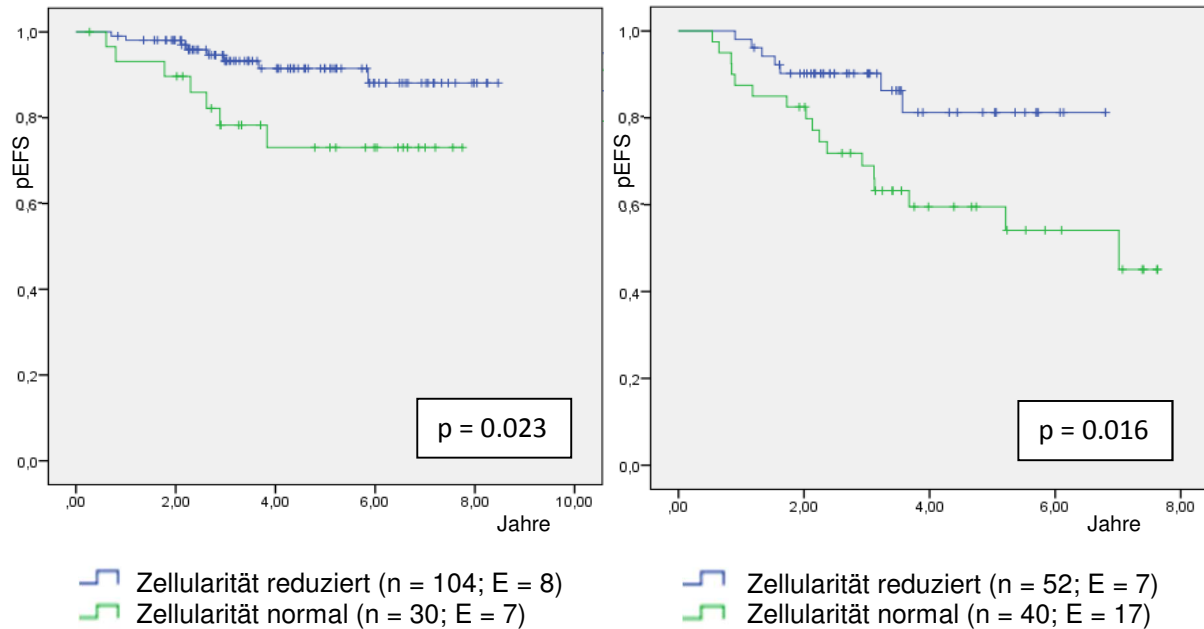
Betrachtet man den Zusammenhang zwischen Zellularität und Prognose, so lässt sich feststellen, dass sich in der OP keine signifikanten Unterschiede zeigten, in der RP hingegen war eine normal bis hohe Zellularität im Vergleich zu eine reduzierten Zellularität mit einer schlechteren Prognose assoziiert (5-Jahres-pEFS = < 0.0001). Dieser Zusammenhang ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abb. 6):



pEFS = Wahrscheinlichkeit des Event Free Survival n = Anzahl der Patienten p = Signifikanz

**Abb. 6: pEFS in Abhängigkeit von der Zellularität bei Originalpunktion (links) und Repunktion (rechts).** Zu sehen ist das pEFS in Abhängigkeit von der Zellularität bei OP (links) und zum Zeitpunkt der Repunktion (rechts).

Analysiert man die Zellularität stratifiziert nach Punktionsverzögerung (< 8 Tage vs. ≥ 8 Tage), so behält die Zellularität in beiden Strata ihren prognostischen Wert. Dies zeigt die folgende Abbildung (Abb. 7):



pEFS = Wahrscheinlichkeit des Event Free Survival   n = Anzahl der Patienten   E = Event   p = Signifikanz

**Abb. 7: pEFS in Abhängigkeit von Zellularität und Punktionsverzögerung (< 8 Tage links vs. ≥ 8 Tage rechts).** Auf der linken Seite ist das pEFS bei einer Punktionsverzögerung von weniger als 8 Tagen dargestellt, auf der rechten Seite das pEFS bei einer Punktionsverzögerung von 8 oder mehr Tagen.

Betrachtet man nun Leukozytenzahl, Zellularität und Punktionsverzögerung in der multivariaten Analyse, so zeigt sich, dass die Zellularität als einziger Faktor seine prognostische Relevanz behält. Dies belegt die folgende Tabelle, in der die Ergebnisse der multivariaten Analyse von Leukozytenzahl und Zellularität zum Zeitpunkt der Repunktion im Zusammenhang mit der Punktionsverzögerung zusammengefasst sind (Tab. 14):

**Tab. 14: Multivariate Cox-Regressionsanalyse von Leukozytenzahl und Zellularität zum Zeitpunkt der Repunktion unter Berücksichtigung der Punktionsverzögerung.**

Eigenschaft	Hazard Ratio	95% CI* <sup>1</sup>	p* <sup>2</sup>
Leukozytenzahl RP* <sup>3</sup>	0.592	0.592 – 2.614	0.564
Punktionsverzögerung RP	0.909	0.909 – 3.760	0.090
Zellularität RP	1.486	1.486 – 6.265	0.002

\*<sup>1</sup> CI = Konfidenzintervall   \*<sup>2</sup> p = Signifikanz   \*<sup>3</sup> RP = Repunktion

Zusammenfassend lässt sich zur Relevanz der Zellularität Folgendes sagen:

- Analog zur Leukozytenzahl steigt mit zunehmender Punktionsverzögerung erwartungsgemäß auch die Zellularität an.
- Eine hohe Zellularität in der RP geht mit einer signifikant schlechteren Prognose einher.
- Die Analysen zeigen sowohl bei einer Punktionsverzögerung von  $< 8$  Tagen als auch von  $\geq 8$  Tagen signifikante Ergebnisse.
- In der multivariaten Analyse von Leukozytenzahl, Punktionsverzögerung und Zellularität behält die Zellularität als einzige Variable einen unabhängigen prognostischen Wert.
- Eine schlechtere Prognose bei Patienten mit einer hohen Zellularität lässt sich demnach nicht allein auf die Punktionsverzögerung und den verspäteten Beginn von Protokoll IB zurückführen.

### **3.3.3 Bedeutung der Markbröckel**

Das Vorhandensein von Markbröckeln wird als Zeichen der Repräsentativität von KM-Proben gewertet: Wenn Markbröckel vorhanden sind, dann ist von KM (und nicht überwiegend Blutbeimengung) auszugehen.

Bei 44% der Patienten (129/289) waren Angaben zu den Markbröckeln vorhanden. Darunter waren 81 Patienten (63%), bei denen initial Markbröckel nachgewiesen werden konnten. Bei 93% dieser 81 Fälle (75/81) waren Markbröckel zu beiden Punktionszeitpunkten vorhanden, während bei 7% (6/81) zum Zeitpunkt der OP Bröckel vorhanden waren, jedoch keine bei der RP nachgewiesen werden konnten. In 48 Fällen von den 129 Patienten mit dokumentierter Markbröckelmenge (37%) fehlten in der OP die Markbröckel. Bei 29% von diesen Patienten (14/48) waren auch in der RP keine Bröckel vorhanden, während bei einem Großteil (71%) in der RP Markbröckel nachgewiesen werden konnten (34/48).

Insgesamt lagen bei 85% der Patienten (109/129) zum Zeitpunkt der RP unabhängig von der initialen Markbröckelmenge Markbröckel vor, und in 16% der Fälle (20/129) fehlten die Markbröckel in der RP unabhängig von der Bröckelmenge zum Zeitpunkt der OP. Die folgende Tabelle zeigt die Häufigkeiten des Vorhandenseins von Markbröckeln bei OP und RP (Tab. 15):

**Tab. 15: Vorhandensein von Markbröckel zum Zeitpunkt von Original- und Repunktion.**

Markbröckel	RP neg. n <sup>*1,2</sup> (%)	RP pos. n <sup>*3</sup> (%)	Gesamt n (%)
OP neg. <sup>*4</sup>	1 (29.2%)	34 (70.8%)	48 (100%)
OP pos.	6 (7.4%)	75 (92.6%)	81 (100%)
<b>Gesamt</b>	20 (15.5%)	109 (84.5%)	129 (100%)

\*1 RP = Repunktion \*2 neg. n. = Anzahl der Patienten ohne Markbröckel \*3 pos. n. = Anzahl der Patienten mit Markbröckeln \*4 OP = Originalpunktion

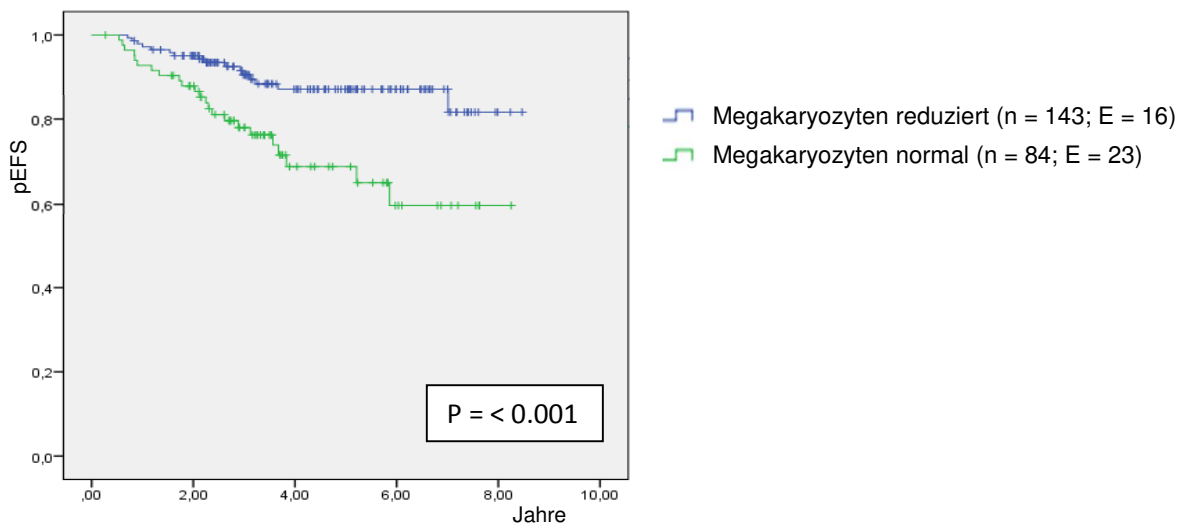
Betrachtet man das ereignisfreie Überleben in Abhängigkeit vom Vorhandensein der Markbröckel, so zeigt sich, dass das Vorhandensein von Markbröckeln weder in der Original- noch in der RP von prognostischer Relevanz ist (OP:  $p = 0.58$ ; RP:  $p = 0.914$ ).

### 3.3.4 Bedeutung der Megakaryozyten

Für 222 Patienten liegen an beiden Punktionszeitpunkten Angaben zur Menge der Megakaryozyten der KM-Proben vor. Zur Vereinfachung werden die Subgruppen 'keine' und 'geringe Anzahl an' Megakaryozyten im weiteren Verlauf der Arbeit in der Subgruppe 'reduzierte' Megakaryozyten zusammengefasst.

Zum Zeitpunkt der RP lagen bei 84.2% der Patienten (187/222) normwertige, bei 15.8% (35/222) reduzierte Megakaryozytenzahlen vor. In 23.1% der Fälle, bei denen initial geringe Megakaryozytenzahlen gefunden wurden (21/91), waren die Megakaryozyten auch in der RP reduziert, während bei 76.9% der Patienten (70/91) in der RP Megakaryozyten nachgewiesen werden konnten. Demgegenüber lagen bei 10.7% der Patienten, bei denen Megakaryozyten in der OP nachgewiesen wurden (14/131), reduzierte Megakaryozytenzahlen in der RP vor, während in 89.3% der Fälle (117/131) Megakaryozyten zu beiden Punktionszeitpunkten vorhanden waren.

In ihrer prognostischen Relevanz unterschieden sich die Ergebnisse zu den Megakaryozyten zum Zeitpunkt von OP und RP: Die Analysen der Megakaryozyten bei der OP zeigen kein Einfluss auf das EFS ( $p = 0.808$ ), während die Ergebnisse zum Zeitpunkt der RP signifikant sind ( $p = < 0.001$ ): Normwertige Megakaryozytenzahlen in der RP (5-Jahres-pEFS =  $0.69 \pm 0.03$ ) sind im Vergleich zu reduzierten Megakaryozytenzahlen mit einem schlechteren Therapieergebnis assoziiert (5-Jahres-pEFS =  $0.87 \pm 0.06$ ). In der folgenden Abbildung ist das pEFS in Abhängigkeit von den Megakaryozyten in der Repunktion gezeigt (Abb. 8):



pEFS = Wahrscheinlichkeit des Event Free Survival n = Anzahl der Patienten E = Event p = Signifikanz

**Abb. 8: pEFS in Abhängigkeit von Megakaryozyten in der Repunktion.** Gezeigt ist der Zusammenhang des pEFS und der Anzahl von Megakaryozyten in der Repunktion bei reduzierter und normaler Megakaryozytenzahl.

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse von Megakaryozytenzahl zum Zeitpunkt der RP und Punktionsabstand behalten sowohl die Megakaryozyten als auch die Punktionsverzögerung ihre prognostische Relevanz. Dieser Zusammenhang ist in der folgenden Tabelle dargestellt (Tab. 16):

**Tab. 16: Multivariate Cox-Regressionsanalyse der Megakaryozytenzahl zum Zeitpunkt der Repunktion unter Berücksichtigung des Punktionsabstands.**

Eigenschaft	Hazard Ratio	95% CI*1	p*2
Megakaryozyten RP*3	2.299	1.190 – 4.444	0.013
Punktionsverzögerung	2.179	1.118 – 4.245	0.022

\*1 CI = Konfidenzintervall \*2 p = Signifikanz \*3 RP = Repunktion

Im Vergleich von Megakaryozyten und Zellularität in der RP zeigen sich folgende Ergebnisse: Insgesamt liegen für 224 Patienten Daten zu beiden Eigenschaften vor. Bei 69% der Patienten (155/224) war die Zellularität in der RP reduziert. Analog zur reduzierten Zellularität waren auch die Megakaryozyten in der Mehrheit der Patienten reduziert (121/155; 78%). Bei den übrigen 22% (34/155) lagen bei reduzierter Zellularität normale Megakaryozytenzahlen in der RP vor. In 31% der Fälle war die Zellularität in der RP normal bis hoch (69/224). Bei 28% dieser Patienten war die Megakaryozytenzahl reduziert (19/69) und bei 73% analog zur

normwertigen Zellularität normal (50/69). In der Mehrheit der Fälle (76%) waren also parallel Zellularität und Megakaryozyten in der RP reduziert bzw. normal (171/224). Den Zusammenhang von Megakaryozyten und der Zellularität zum Zeitpunkt der Repunktion zeigt die folgende Tabelle (Tab. 17):

**Tab. 17: Assoziation von Megakaryozyten und Zellularität in der Repunktion.**

Eigenschaft	Megakaryozyten RP red. n (%) <sup>*1,2</sup>	Megakaryozyten RP normal n (%)	Gesamt n (%)
Zellularität RP red. <sup>*3</sup>	121 (78.1%)	34 (21.9%)	155 (100%)
Zellularität RP normal bis hoch	19 (27.5%)	50 (72.5%)	69 (100%)
<b>Gesamt</b>	140 (62.5%)	84 (37.5%)	224 (100%)

\*1 RP = Repunktion \*2 red. n = Anzahl der Patienten mit reduzierter Megakaryozytenzahl \*3 RP = Repunktion

In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse der Megakaryozytenzahl zum Zeitpunkt der RP unter Berücksichtigung der Zellularität zeigte sich, dass die Megakaryozyten ihre prognostische Relevanz verlieren. Dies ist in der folgenden Tabelle zu sehen (Tab. 18):

**Tab. 18: Multivariate Cox-Regressionsanalyse der Megakaryozytenzahl zum Zeitpunkt der Repunktion unter Berücksichtigung der Zellularität.**

Eigenschaft	Hazard Ratio	95% CI <sup>*1</sup>	p <sup>*2</sup>
Megakaryozyten RP <sup>*3</sup>	1.682	0.820 – 3.450	0.156
Zellularität RP	2.858	1.383 – 5.906	0.005

\*1 CI = Konfidenzintervall \*2 p = Signifikanz \*3 RP = Repunktion

Gleiches gilt auch für die gemeinsame Betrachtung von Megakaryozyten, Zellularität und Punktionsverzögerung: Nur die Zellularität behält ihren, von der Megakaryozytenzahl und Punktionsverzögerung unabhängigen, prognostischen Wert. Dies zeigt die folgende Tabelle (Tab. 19):

**Tab. 19: Multivariate Cox-Regressionsanalyse der Megakaryozytenzahl zum Zeitpunkt der Repunktion unter Berücksichtigung von Punktionsverzögerung und Zellularität.**

Eigenschaft	Hazard Ratio	95% CI <sup>*1</sup>	p <sup>*2</sup>
Punktionsverzögerung	1.886	0.962 – 3.696	0.065
Zellularität RP <sup>*3</sup>	2.510	1.211 – 5.202	0.013
Megakaryozyten RP	1.558	0.764 – 3.176	1.558

\*1 CI = Konfidenzintervall \*2 p = Signifikanz \*3 RP = Repunktion

Zusammenfassend lässt sich zur Relevanz der Megakaryozyten sagen:

- Analog zur Zellularität und Leukozytenzahl nehmen die Megakaryozytenzahlen von der OP zur RP zu.
- Zum Zeitpunkt der OP haben Megakaryozyten keinen Einfluss auf das Therapieergebnis, zum Zeitpunkt der RP ist der Einfluss jedoch signifikant.
- Patienten mit normwertigen Megakaryozytenzahlen zum Zeitpunkt der RP haben im Vergleich zu reduzierten Megakaryozytenzahlen ein schlechteres Therapieergebnis.
- In der multivariaten Cox-Regressionsanalyse von Megakaryozyten unter Berücksichtigung von Zellularität, bzw. Zellularität und Punktionsverzögerung, verliert die Megakaryozytenzahl in der RP ihre prognostische Relevanz.

### **3.3.5 Gemeinsame Betrachtung von zytomorphologischen Parametern und Therapieverzögerung**

Zusammenfassend lässt sich zu den zytomorphologischen Befunden in Original- und RP folgendes feststellen:

- Das Vorhandensein von Markbröckeln hat weder in der Original- noch in der RP eine prognostische Bedeutung.
- Zum Zeitpunkt der OP sind weder die Leukozytenzahl, KM-Zellularität noch Megakaryozytenzahl von prognostischer Relevanz.
- Hohe Leukozytenzahlen von  $\geq 5000/\mu\text{l}$ , eine gute KM-Zellularität und eine normale Megakaryozytenzahl in der RP sind im Vergleich zu Leukozyten  $< 5000/\mu\text{l}$ , einer reduzierten Zellularität und reduzierten Megakaryozyten mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert.
- Die Länge von Punktions- bzw. Therapieverzögerung ist von wichtigem prognostischen Wert: Eine Punktions- und damit Therapieverzögerung von mehr als einer Woche ist im Vergleich zu einer Punktions- und Therapieverzögerung von weniger als einer Woche mit einer schlechteren Prognose assoziiert.
- Der prognostische Wert der Megakaryozyten als auch der Leukozytenzahl zum Zeitpunkt der RP geht in der multivariaten Cox-Analyse mit der KM-Zellularität verloren.
- Betrachtet man in der multivariaten Cox-Analyse KM-Zellularität, Megakaryozytenzahl und Punktionsverzögerung gemeinsam, so bleibt die Zellularität als einziger Faktor mit unabhängiger prognostischer Bedeutung.

#### 4 Diskussion

Trotz enormer Fortschritte in der Behandlung der ALL in den letzten vier Jahrzehnten mit Langzeitüberlebensraten bei Kindern und Jugendlichen von inzwischen 80 bis 90% erleiden etwa 10-20% der Betroffenen ein Rezidiv, und die Chancen auf Heilung liegen dann nur noch bei 25-40%.<sup>42</sup> Außerdem ist davon auszugehen, dass ein Teil der Patienten mit initial gutem Therapieansprechen und geringem Rezidivrisiko übertherapiert und damit unnötig hohen Therapietoxizitäten ausgesetzt wird, die sowohl schwerwiegende akute Nebenwirkungen als auch schwere Langzeitfolgen verursachen können (zum Beispiel sekundäre maligne Neoplasien, Unfruchtbarkeit, Schäden des Herzkreislaufsystems).<sup>14</sup>

Demzufolge sollte es bei der Behandlung akuter Leukämien weiterhin vorrangiges Ziel sein, das individuelle Therapiekonzept so zu optimieren, dass das Langzeitüberleben verbessert wird und gleichzeitig Therapietoxizitäten, sowie akute und langfristige Therapiefolgen minimiert werden.<sup>54</sup> Betroffene mit hohem Rezidivrisiko sollten eine entsprechend intensiviertere Therapie erhalten, um die Heilungschancen trotz des erhöhten Risikos steigern zu können, während Patienten mit guter Überlebenswahrscheinlichkeit und einer hohen Therapiesensibilität eine weniger aggressive Therapie erhalten sollten, damit unerwünschte Nebenwirkungen durch die Behandlung reduziert werden.<sup>55,56</sup>

Um diese Behandlungsziele erreichen zu können, wird seit langem angestrebt, anhand prognostischer Kriterien das Rezidivrisiko möglichst genau einzuschätzen um ein individuelles, risikoadaptiertes Behandlungsregime erstellen zu können.<sup>57,58</sup> Neben patientenspezifischen Risikofaktoren (z. B. Alter und Geschlecht) flossen auch ALL-spezifische Faktoren (z. B. Leukozytenzahl, Immunphänotyp und chromosomale Aberrationen) sowie die Therapieverzögerung in die Beurteilung des Rezidivrisikos mit ein. Als das entscheidende prognostische Kriterium hat sich jedoch mittlerweile der In-Vivo-Nachweis des molekularen Ansprechens der Betroffenen auf die Chemotherapie (gemessen mittels MRD) erwiesen.<sup>59,60</sup>

In der ALL-BFM 2000 Studie (und auch in der ALL-BFM 2009 Studie) wurde das Therapieansprechen mittels MRD jeweils an den zwei obligaten Zeitpunkten R1 und R2 (an Therapietag 33 und 78) überprüft. Dabei war der Zeitpunkt R2 entscheidend für die HR-Eingruppierung, während der Zeitpunkt R1 relevant war für die Stratifizierung in SR und MR: Patienten, die MRD-negativ waren am Zeitpunkt R1 (sowie an R2 und keine HR-Kriterien aufwiesen), wurden der SR-Gruppe zugeordnet, und Patienten mit niedrig-positiver MRD-Last an R1 oder R2 und ohne HR-Kriterien wurden der MR-Gruppe zugeteilt.<sup>36</sup> Die akkurate



Zuordnung in die Risikogruppen ist essentiell, um für die SR-Patienten, die potentiell übertherapiert werden und dadurch einer unnötig hohen Therapietoxizität ausgesetzt sind, eine Therapie-Deintensivierung zu wagen, ohne dass dies zu Einbußen im sehr guten Langzeitergebnis führt.<sup>61</sup>

Das Therapieansprechen in der ALL-BFM 2000 Studie wurde neben der MRD-Bestimmung auch anhand der zytomorphologischen Befunde an den zwei obligaten Zeitpunkten R1 und R2 (an Therapietag 33 und 78) überprüft.<sup>36</sup> Zum Zeitpunkt R1 war der zytomorphologische KM-Befund wichtiger Indikator des Therapieansprechens und die KM-Repräsentativität ein notwendiges Kriterium zur Beurteilbarkeit des Remissionsstatus der Patienten. Darüber hinaus war eine ausreichende morphologische KM-Regeneration notwendig für eine Fortsetzung der Behandlung mit Protokoll IB sowie essentielles Kriterium für die Nutzung des KM zur MRD-Analyse. Bei der Überprüfung des Therapieansprechens zum protokollgemäßen Punktionszeitpunkt R1 am Therapietag 33 zeigte sich jedoch, dass bei einem erheblichen Anteil der Patienten ein unzureichend regeneriertes KM mit einer geringen Zellularität vorlag, so dass diese KM-Proben aus zytomorphologischer Sicht als nicht repräsentativ gewertet wurden. Zudem reichte das gewonnene DNA-Material häufig nicht aus, um in der MRD-Analyse mindestens zwei sensitive Marker zu bestimmen.

Insgesamt mussten die KM-Punktionen in etwa 15-20% der Fälle wiederholt werden<sup>42</sup>, entweder wegen mangelnder Regeneration oder ungenügender DNA-Menge, in rund einem Drittel der Fälle lagen beide Ursachen gleichzeitig vor. Die Bedeutung der RP für die gemessene MRD-Last und deren Konsequenzen für Therapiestratifizierung und Therapieergebnis waren jedoch vollkommen unklar und wurden deshalb Schwerpunkt dieses Promotionsprojektes. Ziel war es, zu klären, ob die RP, von der man sich repräsentativere Morphologie- als auch besser prädiktive MRD-Befunde im Vergleich zur OP versprach, tatsächlich besser für die Therapiestratifizierung geeignet war als die Erstpunktion.

#### **4.1 Relevanz der Repunktion für MRD, Risikostratifizierung und Therapieergebnis**

Hinsichtlich der gemessenen MRD zeigten sich relevante Unterschiede in der MRD-Last zwischen Original- und RP, wobei die gemessene MRD zur RP in der Mehrzahl der Fälle mit unterschiedlicher MRD-Last niedriger war, bei 60% der Patienten (174/289) war die MRD-Last zum Zeitpunkt der OP noch positiv, in 17% der Fälle (50/289) zum Zeitpunkt der RP dagegen bereits negativ. Während eine positive MRD-Last sowohl zur OP als auch zur RP mit einer schlechteren Prognose als bei einer negativen MRD-Messung assoziiert war, so war die Prognose der Patienten, die bei der RP negativ, aber bei der OP noch positiv war, schlechter,

als diejenige der Patienten, die bereits zum Zeitpunkt der OP negativ waren. Somit scheint die OP an Therapietag 33 besser zur Risikostratifizierung geeignet zu sein. Nicht unerheblich ist in diesem Zusammenhang die Zahl der Patienten, die aufgrund der RP anders stratifiziert worden sind als es bei Berücksichtigung des Ergebnisses zum Zeitpunkt der OP der Fall gewesen wäre; die Therapiereduktion in der SR-Gruppe (die in der 2000er Studie geprüft wurde), könnte dabei zur genannten schlechteren Prognose beigetragen haben.

#### **4.2 Relevanz der Therapieverzögerung für das Therapieergebnis**

Neben den MRD- und Zytomorphologiebefunden im KM erwies sich auch die Therapieverzögerung zwischen dem Ende der Induktionstherapie (Protokoll IA) und dem Beginn der Konsolidierung (Protokoll IB) als ein wichtiger prognostischer Faktor: Größere Abstände zwischen OP und RP gingen fast immer mit einem verzögerten Beginn von Protokoll IB einher. Infolgedessen konnte bei 83% der Patienten die Therapie erst nach 4 oder mehr Tagen fortgesetzt werden, in über der Hälfte der Fälle sogar erst nach 8 Tagen. Die Analyse des Zusammenhangs zwischen Punktionsverzögerung und Therapieergebnis ergab, dass längere Abstände zwischen OP und RP mit daraus resultierendem verzögertem Beginn der Weiterbehandlung mit Protokoll IB einen signifikant negativen Einfluss auf die Prognose hatten. So hatten Patienten mit einer Punktionsverzögerung von einem bis zu 7 Tagen gegenüber den Patienten mit einer Punktionsverzögerung von 8 oder mehr Tagen ein signifikant schlechteres 5-Jahres-pEFS.

Die Frage, welchen Einfluss Therapieverzögerungen initial oder im Verlauf einer ALL-Behandlung haben, ist Gegenstand verschiedener Publikationen. So konnten Wahl und Kollegen zeigen, dass eine Verzögerung des Therapiebeginns unmittelbar nach Diagnose einer Leukämie nicht signifikant mit einer erhöhten Rezidivrate einherging. Dies war das Ergebnis einer retrospektiven Analyse an 207 Patienten des Children's Hospitals & Research Centers in Oakland zwischen 1995 und 2007.<sup>62</sup> Dort war untersucht worden, ob eine Klinikaufnahme von neu diagnostizierten ALL-Patienten kurz vor dem Wochenende mit einem schlechteren Therapieergebnis assoziiert war im Vergleich zu einer Klinikaufnahme innerhalb der Woche von Montag bis Donnerstag. Die Grundannahme war hier, dass stationäre Aufnahmen an einem Freitag zunächst mit einem späteren Therapiebeginn und in Folge mit einem schlechteren Therapieergebnis einhergehen. Die durchgeführten Untersuchungen bestätigten dies jedoch nicht: Patienten, die an einem Freitag neu mit einer ALL diagnostiziert und stationär aufgenommen wurden, erhielten die initiale Therapie durchschnittlich nach 4.13 +/- 2.40 Tagen nach Diagnosestellung gegenüber 3.72 +/- 1.57 Tagen bei allen anderen

Patienten, die nicht an einem Freitag aufgenommen wurden ( $p = 0.29$ ). Die Analysen zum Therapieerfolg ergaben hier keinen signifikanten Zusammenhang zwischen einer stationären Aufnahme am Freitag und einem erhöhten Risiko für ein Rezidiv ( $p = 0.94$ ) oder für ein Versterben ( $p = 0.55$ ). Diese Aussage wird durch den Umstand relativiert, dass es bei 91% der 207 Patienten nur zu einer Therapieverzögerung von maximal 5 Tagen kam und kaum Daten vorlagen zu Therapieverzögerungen von 6 und mehr Tagen. Auch in der multivariaten Coxanalyse zeigte sich kein Zusammenhang zwischen einer Therapieverzögerung und einem frühzeitigeren Auftreten eines Rezidivs ( $p = 0.80$ ).<sup>62</sup>

Die größte pädiatrische Studie, die den Zusammenhang zwischen einer Verzögerung von Diagnose, Therapiebeginn und dem Therapieergebnis untersucht, wurde von Baker und Kollegen zwischen 1997 und 2007 an einer Kohorte von 1000 Patienten in Ontario durchgeführt.<sup>63</sup> Das 5-Jahres-pEFS und pOS betrug hier  $0.83 \pm 0.01$  und  $0.91 \pm 0.01$ , und Patienten mit einem längeren Abstand zwischen der Diagnosestellung und dem ersten Therapieprotokoll von mehr als 3 Tagen hatten ein schlechteres pEFS und pOS. Die assoziierte Hazard Ratio für ein Versterben betrug  $2.83$  (95% CI  $1.6 - 5.01$ ;  $p = < 0.001$ ), und die Hazard Ratio für ein Event im Vergleich zu den Patienten mit einer Therapieverzögerung von  $\leq 3$  Tagen lag bei  $1.83$  (95% CI  $1.07 - 3.12$ ;  $p = 0.027$ ). Letztlich hatten die Zeit bis zur Diagnosestellung und eine Diagnosestellung am Freitag oder am Wochenende keinen Einfluss auf pEFS und pOS, jedoch blieb eine Dauer von mehr als 3 Tagen bis zum Therapiebeginn nach Diagnosestellung auch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse ein unabhängiger prädiktiver Faktor für ein schlechteres pEFS und pOS.<sup>63</sup>

Im Vergleich zur Studie von Baker und Kollegen hatten Wahl und Kollegen keinen Zusammenhang zwischen der Dauer von der stationären Aufnahme bis zum Therapiebeginn und dem Auftreten eines Rezidivs oder des Versterbens finden können. Diese kontroversen Ergebnisse können unter anderem möglicherweise auf die Verwendung unterschiedlicher Variablen zurückgeführt werden ('Zeit der Aufnahme bis zum ersten Therapieblock' bei Wahl vs. 'Zeitpunkt der Diagnose bis zur ersten Therapie' bei Baker) sowie auf die deutlich größere Kohorte bei Baker.<sup>62,63</sup> Gegen eine ursächliche Kausalität zwischen einem verzögerten Therapiebeginn und einem schlechteren Überleben spricht laut Baker zunächst der Umstand, dass kein Zusammenhang nachgewiesen werden konnte zwischen der zeitlichen Dauer bis zur Diagnosestellung und dem Therapieergebnis.<sup>63</sup> Der Zusammenhang zwischen einem größeren zeitlichen Abstand bis zum Beginn des ersten Therapieblocks und schlechteren Überlebensraten kann außerdem teilweise durch Patienten begründet werden, die aufgrund

ihrer Multimorbidität oder einer bestehenden Sepsis am Aufnahmetag die initiale Chemotherapie nicht erhalten können. Ebenso können diagnostische Schwierigkeiten, wie zum Beispiel das Vorliegen komplexer Immunphänotypen (wie z. B. die biphänotypische ALL), zum Teil erklären, warum größere zeitliche Abstände bis zum Therapiebeginn entstehen und in Folge mit einem schlechteren Therapieergebnis korrelieren. Außerdem wurden die Patienten in den genannten Studien mit Therapieprotokollen behandelt, die sich über die Jahre hinweg verändert haben, insbesondere hinsichtlich der Risikostratifizierung.<sup>62,63</sup>

Demzufolge lagen jeweils heterogene Studiengruppen vor, für die nicht zuletzt keine Daten für die Risikostratifizierung in Form des Therapieansprechens mittels MRD-Messung vorhanden waren. Eine direkte Vergleichbarkeit der diskutierten Daten mit unseren Ergebnissen ist nicht gegeben, da wir eine Therapieverzögerung im laufenden Protokoll untersuchten und nicht vor Therapiebeginn. So könnte die Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika bei längeren Therapiepausen einen anderen Stellenwert haben als bei verzögertem Beginn der Therapie überhaupt und die schlechtere Prognose bei langen Therapiepausen begründen.

Herold und Kollegen führten eine Untersuchung an 314 Patienten der Rezidivstudie ALL-REZ-BFM 90 und 95 durch und stellten fest, dass eine zunehmende Therapieverzögerung zwischen dem ersten und zweiten Behandlungsblock der Induktionsphase mit einem deutlich schlechteren pEFS einherging.<sup>64</sup> In der 90er Studie lag die Zeitdifferenz (ZD) zwischen den beiden Therapieblöcken gemäß empfohlenem Behandlungsregime bei 21 Tagen. Die Analyse der Subgruppen (bis zu 20 Tage ZD, 21-24 Tage und mehr als 24 Tage ZD) ergab zunehmend schlechtere Therapieergebnisse mit größer werdender ZD: Die 5-Jahres-Überlebensraten betragen 0.49 +/- 0.06 (bei einer ZD von bis zu 20 Tagen; n = 82), 0.40 +/- 0.05 (ZD 21-24 Tage; n = 109) und 0.33 +/- 0.06 (ZD mehr als 24 Tage; n = 92; p = 0.02).

Für die Folgestudie ALL-REZ-BFM 95 zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Die Zeitdifferenz war in dieser Studie auf Grundlage vorangegangener Analysen auf 14 Tage reduziert worden, und analog zur Vorgängerstudie wurde untersucht, inwiefern die Variabilität der ZD zwischen den beiden Induktionsblöcken Einfluss auf das Therapieergebnis hatte: Auch hier war eine zunehmende ZD mit einem schlechteren Langzeitüberleben assoziiert. Das 5-Jahres-pEFS bei Patienten mit einer ZD von mehr als 15 Tagen lag bei 0.37 +/- 0.05 (n = 127) gegenüber 0.51 +/- 0.04 bei Patienten mit einer ZD von weniger als 15 Tagen (n = 187) (p = 0.02). Auch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse blieb unter Berücksichtigung von Störfaktoren (z. B. Ort des Rezidivs und Dauer der ersten Remission) die ZD als signifikante Variable bestehen (p = 0.001) und bestätigte, dass eine möglichst genaue Einhaltung des empfohlenen

Behandlungsregimes ohne Therapieverzögerungen mit einem besserem Langzeitüberleben einhergeht.<sup>64</sup> Diese Daten bei Rezidivpatienten sind somit durchaus vergleichbar zu unseren hier gezeigten Ergebnissen für Patienten in der Primärtherapie. Herold verweist außerdem darauf, dass die Durchsetzung einer zeitlich möglichst exakten Kontinuität in der Behandlung der ALL scheinbar eine größere Rolle spielt als die Durchführung einer möglichst aggressiven, bis zur Toleranzgrenze gehende Therapie, und dass logistische Ursachen eines verzögerten Therapiebeginns vermieden werden sollten (wie z. B. Verzögerungen durch Aufnahme von Patienten am Wochenende).<sup>64</sup>

Die Bedeutung von Therapieverzögerung (und KM-Regeneration - siehe unten) auf das Therapieergebnis untersuchten auch Koka und Kollegen an 239 ALL-Patienten an der Istanbul University.<sup>65</sup> Bei Patienten mit einer verlängerten Übergangsphase von Protokoll M zu Protokoll II konnten diese Kollegen interessanterweise ein signifikant besseres OS im Vergleich zu Patienten mit einer kürzeren Übergangsdauer nachgewiesen werden ( $p = 0.035$ ), auf das pEFS hatte eine verlängerte Übergangszeit jedoch keinen Einfluss. Ebenso hatten Therapieunterbrechungen zu anderen Zeitpunkten während der gesamten Behandlungsdauer keine Auswirkungen auf das Langzeitüberleben. Bei der Betrachtung der gesamten Summe an Therapieverzögerungen für jeden Patienten zeigte sich dennoch, dass Patienten mit kürzeren Unterbrechungen während der gesamten Therapie von weniger als 11 Tagen ein signifikant schlechteres Langzeitüberleben hatten als Patienten mit Therapieunterbrechungen von insgesamt mehr als 10 Tagen ( $p = 0.0001$ ). Koka und Kollegen diskutierten als Gründe hierfür, dass Therapieverzögerungen in der Regel Folge von Therapietoxizitäten sind und dass bei fehlender Toxizität möglicherweise auch die Wirkung auf die Leukämiezellen geringer ist.<sup>65</sup> Bei insgesamt deutlich schlechterem Therapieergebnis der Istanbul Klinik im Vergleich zu denen der ALL-BFM-2000 Studie und einer therapiebedingten Mortalität von 20% in dieser Klinik ist eine Vergleichbarkeit unserer Arbeit mit der vorgestellten sicher nur begrenzt möglich.

Schließlich führten Suarez und Kollegen eine Untersuchung an 99 Patienten durch, die zwischen 2007 und 2010 in Kolumbien an einer ALL erkrankten und verglichen die Ergebnisse mit einer Kohorte von 181 Patienten, die dort zwischen 1995 und 2004 mit der Therapie begonnen hatten.<sup>66</sup> In Entwicklungsländern ist die Rate von therapie-assoziiierter Mortalität und Therapieabbrüchen Hauptursache für ein Therapieversagen. Therapieverzögerungen in dieser Studie waren häufig, und ein verspäteter Beginn von Protokoll III mehr als 4 Wochen nach Regimevorgabe ging signifikant mit einem Therapieversagen einher ( $p = 0.016$ ). Dabei waren 25% der Therapieverzögerungen medizinisch indiziert und 75% bedingt durch nicht-

medizinische Ursachen (wie z. B. das Fehlen von stationären Betten oder durch verspätete Kostenübernahmen seitens der Versicherungen). Umgekehrt konnten Patienten, die ohne längere Verzögerungen die Behandlungsprotokolle durchliefen, annähernd so gute Therapieergebnisse erreichen wie Patienten aus einkommensstärkeren Ländern (pEFS = 0.88). Insgesamt waren Therapieverzögerungen – unabhängig von ihrer Ursache – ein entscheidender prognostischer Faktor für ein Therapieversagen.<sup>66</sup>

Zusammenfassend zeigen die meisten Studien, unsere eingeschlossen, dass – klinisch nicht indizierte – Therapieverzögerungen mit einer schlechten Prognose assoziiert sind und unbedingt vermieden werden sollten.

#### **4.3 Relevanz der KM-Regeneration für das Therapieergebnis**

Bezüglich der KM-Regeneration sahen wir eine klare Assoziation einer guten Regeneration mit der Punktionsverzögerung. Das verwundert nicht, war doch die unzureichende KM-Regeneration eine wesentliche Ursache für die RP. Interessanterweise war aber die Zellularität auch unabhängig von der Zeit der Punktions- und damit Therapieverzögerung von prognostischem Wert: Es zeigte sich, dass eine bessere Zellularität, höhere Leukozyten- und Megakaryozytenzahlen, zum Zeitpunkt der RP mit einem schlechteren Therapieergebnis assoziiert waren.

Dieses Ergebnis steht scheinbar im Gegensatz zu einer Untersuchung von Zeidler und Kollegen, die den Einfluss der normalen Hämatopoese anhand der peripheren Blutbilder während und nach der Induktionstherapie auf das Therapieergebnis untersuchte.<sup>67</sup> Grundlage der Studie waren 282 Patienten, die in einem von drei konsekutiven ALL-BFM-Protokollen (ALL-BFM 90, ALL-BFM 95 und ALL-BFM 2000) zwischen 1990 und 2005 an der Medizinischen Hochschule in Hannover behandelt wurden. Hier zeigte sich, dass Parameter wie z. B. das Hämoglobin, die Monozytenzahl und auch eine Linksverschiebung der Hämatopoese keinen signifikanten Einfluss auf das Therapieergebnis hatten. Demgegenüber stand die Zahl der Thrombozyten in signifikantem Zusammenhang mit dem pEFS. Während in unserer Arbeit zur RP hohe Leukozytenzahlen und eine hohe Zellularität im KM mit einer signifikant schlechteren Prognose einhergehen, zeigten Zeidler und Kollegen, dass hohe Thrombozytenzahlen im peripheren Blut am Therapietag 33 mit einem geringeren Rezidivrisiko und besseren Überlebensraten assoziiert waren.<sup>67</sup> Außerdem konnten Zeidler und Kollegen aufzeigen, dass eine niedrige Neutrophilenzahl an Therapietag 8 ebenfalls mit einer besseren Prognose assoziiert war, während an Therapietag 33 kein signifikanter

Zusammenhang nachgewiesen wurde. Auch in der multivariaten Cox-Regressionsanalyse (inklusive anderer prognostischer Variablen, wie z. B. Geschlecht, Immunphänotyp, Leukozytenzahl, usw.) blieben die beiden Variablen Thrombozytenzahl an Therapietag 33 und die Neutrophilenzahl an Therapietag 8 unabhängige prognostische Faktoren für das Therapieergebnis. Dabei war die Kombination aus niedrigen Thrombozytenzahlen an Therapietag 33 und hohen Neutrophilenzahlen an Tag 8 prognostisch am ungünstigsten. Außerdem belegten die Untersuchungen einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Thrombozytenzahl an Therapietag 33 und dem MRD-Befund, da bei 74% der HR-Patienten niedrige Thrombozytenzahlen vorlagen.<sup>67</sup>

Zeidler und Kollegen postulierten, dass die prognostisch günstige Thrombozytenzahl am Therapietag 33 Ausdruck eines besseren Therapieansprechens und Regenerationspotentials des KM ist, möglicherweise bedingt durch einen geringeren supprimierenden Einfluss von residuellen Leukämiezellen. Demgegenüber spiegelt der negative Einfluss von hohen Neutrophilenzahlen an Therapietag 8 möglicherweise den hoch proliferativen Erkrankungsstatus wider, der in dieser frühen Behandlungsphase noch nicht im peripheren Blut erkennbar ist. Die Autoren schlugen zudem vor, die Thrombozytenzahl als günstigen Ersatzparameter für MRD-Messungen in finanziell weniger gut gestellten Ländern einzusetzen oder in Situationen, in denen die MRD-Last nicht beurteilt werden kann.<sup>67</sup>

Die Bedeutung der KM-Regeneration (sowie weiterer prognostischer Faktoren) auf das Therapieergebnis untersuchten Koka und Kollegen ebenfalls an 242 ALL-Patienten an der Istanbul University.<sup>65</sup> Hierbei wurde die normale hämatologische Zellregeneration an den Therapietagen 15 und 33 bewertet, wobei die Thrombozytenzahl an beiden Therapietagen, sowie die Lympho- und Monozytenzahl an Therapietag 33 signifikant mit dem Therapieergebnis assoziiert waren: Thrombozytenzahlen von weniger als 50.000/ $\mu$ l an Therapietag 15 waren – analog zu den Ergebnissen von Zeidler – mit einem schlechteren pEFS und pOS assoziiert.<sup>65,67</sup> Für den Therapietag 33 wurde gezeigt, dass absolute Lymphozytenzahlen von mehr als 1200/ $\mu$ l, Monozytenzahlen von mehr als 100/ $\mu$ l und Thrombozytenzahlen von mehr als 50.000/ $\mu$ l mit einem signifikant besseren pEFS und pOS einhergingen.<sup>65</sup>

Faderl und Kollegen untersuchten 249 neu diagnostizierte ALL-Patienten zwischen 1992 und 2000 am Anderson Cancer Center in Texas und konnten nachweisen, dass die Zeit bis zur Regeneration der Thrombozytenzahlen (d. h. bis zu Thrombozytenzahlen von mehr als 100.000/ $\mu$ l) innerhalb der ersten 60 Therapietage signifikant und unabhängig mit dem pEFS

und pOS assoziiert war:<sup>68</sup> In diesem Zeitraum stieg das relative Risiko für ein Versterben mit zunehmender Regenerationszeit der Thrombozyten. Sogar Philadelphia-Chromosom-positive Patienten hatten – wenn die Regenerationszeit kurz war und nur maximal 12 Tage betrug – ein besseres pEFS gegenüber Philadelphia-Chromosom-negativen Patienten mit einer langen Regenerationszeit von 48 Tagen. D. h. eine geringe Regenerationsdauer konnte die Auswirkungen einer prognostisch ungünstigen Translokation ausgleichen. Insgesamt ging eine kurze Regenerationszeit der Thrombozyten mit einem längeren Langzeitüberleben einher.<sup>68</sup> Da während der gesamten Behandlungsdauer regelmäßig Kontrollen des peripheren Bluts durchgeführt werden, ist dieser Parameter einfach zugänglich und kann weiterhin als prognostisches Kriterium eingesetzt und bewertet werden.

Im Gegensatz zu Faderl und Kollegen zeigte die Untersuchung von De Angulo und Kollegen, die 171 neu diagnostizierte ALL-Patienten zwischen 1995 und 2005 ebenfalls am Anderson Cancer Center in Texas untersuchten, keinen Zusammenhang zwischen der Thrombozytenzahl während der Induktionsphase und einem schlechteren Therapieergebnis.<sup>69</sup>

Die aufgeführten Studienergebnisse lassen sich nur eingeschränkt mit unseren Befunden vergleichen. Wir untersuchten ein selektives Kollektiv von Patienten mit einer notwendigen KM-RP aufgrund fehlender Repräsentativität des KM oder zu wenig Material für die MRD-Analyse. Außerdem war eine bessere Zellularität nur in der RP mit einer schlechteren Prognose assoziiert, nicht aber in der OP. Nicht zuletzt sind Befunde des peripheren Bluts sicher nur begrenzt mit denen im KM zu vergleichen. Trotzdem werden unsere aktuellen Ergebnisse Anlass sein, eine große und repräsentative Kohorte am Therapietag 33 auf die prognostische Bedeutung der Zellularität hin zu untersuchen.

Einschränkend sei außerdem angemerkt, dass die hier vorgestellten Untersuchungen, einschließlich unserer Arbeit, retrospektiver Natur sind, denen selektierte Patientenkohorten als Grundlage dienten, die über die Jahre hinweg nach unterschiedlichen und sich z. T. wandelnden Therapieprotokollen behandelt wurden und für die ebenfalls sehr unterschiedliche supportive Mittel und Maßnahmen zur Verfügung standen. Dennoch belegen diese Untersuchungen die Bedeutung und Notwendigkeit einer möglichst protokollkonformen Therapiedurchführung ohne längere Therapieverzögerungen, aber unter Beachtung der jeweiligen Therapiefähigkeit des individuellen Patienten.

Aus den Ergebnissen unserer Studie lässt sich unter Würdigung publizierter Daten schlussfolgern:



Die kontroversen Ergebnisse zur prognostischen Bedeutung der KM-Regeneration bedürfen einer Ausweitung unserer Analysen auf ein größeres Kollektiv.

Die Tatsache, dass bei einem Großteil der Patienten die gemessene MRD in der RP niedriger ist als in der OP, dass dies stratifizierungsrelevant und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist; sowie die Tatsache, dass die damit verbundene Therapieverzögerung sich ebenfalls negativ auf die Prognose auswirkt, lässt den Schluss zu, dass die MRD-Bestimmung möglichst zum in der Studie vorgegebenen Zeitpunkt stattfinden sollte und hier unbedingt darauf geachtet werden, ausreichend Material zu gewinnen, um eine RP aus diesem Grund zu vermeiden. Sollte eine RP aufgrund unzureichender KM-Regeneration notwendig sein (denn diese ist Voraussetzung dafür, den – ebenfalls stratifizierungsentscheidenden – zytomorphologischen Remissionsstatus festzustellen), so sollte diese möglichst zeitnah stattfinden und der Originalzeitpunkt trotzdem zur MRD-Bestimmung verwendet werden. Davon unabhängig müssen Therapieverzögerungen aufgrund klinischer Probleme des Patienten akzeptiert werden, darf es doch unter keinen Umständen zu einer Gefährdung der Kinder und Jugendlichen durch eine zu früh fortgesetzte Therapie kommen.

## 5 Zusammenfassung

Knochenmark (KM)-Punktionen am Ende der Induktionstherapie am Therapietag 33 spielen eine entscheidende Rolle in der Bewertung der zytomorphologischen Remission und der Minimalen Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) im KM, beides essentielle Kriterien für die Risikostratifizierung von Kindern und Jugendlichen mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) im Rahmen der ALL-BFM 2000 Studie. Patienten, die zu diesem Zeitpunkt schon keine MRD-Last mehr nachweisbar haben und keine Hochrisikokriterien aufweisen, werden der Standardrisikogruppe (SR) zugeordnet und erhalten die am wenigsten intensive Therapie; die Patienten, die noch eine messbare MRD-Last zeigen (und ebenfalls keine HR-Kriterien erfüllen), werden in die mittlere Risikogruppe stratifiziert. Die Punktionen müssen jedoch bei 15-20% der Betroffenen wiederholt werden, da das KM entweder nicht ausreichend regeneriert oder nicht repräsentativ ist, oder aufgrund einer zu geringen DNA-Menge zur MRD-Messung. Die Relevanz dieser wiederholten KM-Punktion für die gemessene MRD-Last, für Therapiestratifizierung und Therapieergebnis war jedoch bislang ungeklärt und ist deshalb Gegenstand dieser Arbeit.

Es wurden 312 Kinder und Jugendliche mit einer ALL untersucht, die nach dem ALL-BFM 2000- (n = 293) oder dem sehr ähnlichen ALL-IC-BFM 2002 Protokoll (n = 19) behandelt worden waren und die aus oben genannten Gründen am Therapietag 33 eine zusätzliche KM-Punktion erhalten hatten. Betrachtet wurden der Verlauf der gemessenen MRD, das zeitliche Intervall zwischen den Punktionen, sowie Parameter, die einen Eindruck von der KM-Regeneration bzw. Repräsentativität vermitteln. Folgende Erkenntnisse wurden gewonnen:

MRD-Positivität war unabhängig davon, ob sie bei Originalpunktion (OP) oder Repunktion (RP) erhoben wurden, mit einer schlechteren Prognose assoziiert als MRD-Negativität. Die MRD-Last nahm von Original- zur RP bei 8% der Patienten zu und bei 32% ab, in 22% der Fälle hätten die unterschiedlichen MRD-Befunde aufgrund wechselnder Positivität bzw. Negativität an OP und RP zu einer abweichenden Risikostratifizierung geführt, hierbei waren die überwiegenden Fälle zum Zeitpunkt der OP noch positiv und bei RP negativ und wären bei Berücksichtigung der RP der SR-Gruppe zugeordnet worden. Zudem konnte gezeigt werden, dass Patienten, die bei OP noch positiv, bei RP jedoch negativ waren, eine schlechtere Prognose hatten, als die Patienten, die bereits bei OP MRD-negativ waren.

Hinsichtlich der zytomorphologischen Befunde in OP und RP ließ sich feststellen, dass das Vorhandensein von Markbröckeln weder in der OP noch in der RP eine prognostische

Bedeutung hatte. Zum Zeitpunkt der OP waren zudem weder die Leukozytenzahl, KM-Zellularität noch die Megakaryozytenzahl von prognostischer Relevanz.

In der RP waren dagegen hohe Leukozytenzahlen von  $\geq 5000/\mu\text{l}$ , eine gute KM-Zellularität und eine normale Megakaryozytenzahl im Vergleich zu Leukozyten  $< 5000/\mu\text{l}$ , einer reduzierten Zellularität und reduzierten Megakaryozyten mit einer signifikant schlechteren Prognose assoziiert. Die Länge von Punktions- bzw. Therapieverzögerung war ebenfalls von wichtigem prognostischen Wert: Eine Punktions- und damit Therapieverzögerung von mehr als einer Woche war im Vergleich zu einer Punktions- und Therapieverzögerung von weniger als einer Woche ebenfalls mit einer schlechteren Prognose assoziiert.

Der prognostische Wert der Megakaryozyten als auch der Leukozytenzahl zum Zeitpunkt der RP ging in der multivariaten Cox-Analyse mit der KM-Zellularität verloren. Bei gemeinsamer Betrachtung von KM-Zellularität, Megakaryozytenzahl und Punktionsverzögerung in der multivariaten Analyse blieb nur die Zellularität als einziger Faktor mit unabhängiger prognostischer Bedeutung. Die Beobachtung, dass eine gute Zellularität mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist, steht teilweise im Widerspruch zu publizierten Ergebnissen und bedarf der Analyse dieses Aspekts in einer größeren Studienkohorte.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass, wenn klinisch vertretbar, die KM-Punktion am Ende der Induktionstherapie möglichst zum protokollgemäßen Zeitpunkt stattfinden und die MRD-Bestimmung aus dem Material erfolgen sollte, das zu diesem Zeitpunkt gewonnen wurde. Hierfür ist es von großer Bedeutung, ausreichend KM zu entnehmen. Sollte eine RP aufgrund unzureichender KM-Regeneration notwendig sein (denn diese ist Voraussetzung dafür, den – ebenfalls stratifizierungsentscheidenden – zytomorphologischen Remissionsstatus festzustellen), so sollte diese möglichst zeitnah stattfinden und die OP trotzdem zur MRD-Bestimmung verwendet werden.

## Literaturverzeichnis

1. Antwerpes F (ed.). Doc Check Flexikon. URL: <http://flexikon.doccheck.com/de/Leukämie>. 2015.
2. Ashworth Underwood E. Rudolf Virchow. In: Encyclopædia Britannica Online. <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/629797/Rudolf-Virchow>. 2015.
3. Nguyen T-V, Melville A, Nath S, Story C, Howell S, Sutton R et al. Bone Marrow Recovery by Morphometry during Induction Chemotherapy for Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *PLoS One*. 2015;10:e0126233.
4. Pui C-H, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371:1030-43.
5. Altmann AE, Halliday JL, Giles GG. Associations between congenital malformations and childhood cancer. A register-based case-control study. *Br J Cancer*. 1998;78:1244-1249.
6. Wong KF, Lam SC, Leung JN. Isochromosome 7q in Down syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006;164:152-154.
7. Ikawa Y, Sugimoto N, Koizumi S, Yachie A, Saikawa Y. Dense methylation of types 1 and 2 regulatory regions of the CD10 gene promoter in infant acute lymphoblastic leukemia with MLL/AF4 fusion gene. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2010;32:4-10.
8. Kadan-Lottick NS, Kawashima T, Tomlinson G, Friedman DL, Yasui Y, Mertens AC, Robison LL, Strong LC. The risk of cancer in twins: a report from the childhood cancer survivor study. *Pediatr Blood Cancer*. 2006;46:476-481.
9. Moloney WC<sup>†</sup>. Leukemia in Survivors of Atomic Bombing. *N Engl J Med*. 1955;253:88-90.
10. Vigliani EC<sup>†</sup>, Saita G. Benzene and Leukemia. *N Engl J Med*. 1964;271:872-876.
11. Lehtinen M, Koskela P, Ogmundsdottir HM, Bloigu A, Dillner J, Gudnadottir M, Hakulinen T, Kjartansdottir A, Kvarnung M, Pukkala E, Tulinius H, Lehtinen T. Maternal herpesvirus infections and risk of acute lymphoblastic leukemia in the offspring. *Am J Epidemiol*. 2003;158:207-213.
12. Schüz J, Blettner M, Michaelis J, Kaatsch P. Ursachen von Leukämien im Kindesalter - Resümee einer Fallkontrollstudie des Deutschen Kinderkrebsregisters. *Dtsch Arztebl Int*. 2005;102:A2557-2564.
13. C-H, Evans WE. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 2006;354:166-178.

14. [www.kinderkrebsinfo.de/sites/kinderkrebsinfo/content/e9031/e9035/e9060/e10948/ALL-lang2013\\_ger.pdf](http://www.kinderkrebsinfo.de/sites/kinderkrebsinfo/content/e9031/e9035/e9060/e10948/ALL-lang2013_ger.pdf). 2015.
15. Spix C, Eletr D, Blettner M, Kaatsch P. Temporal trends in the incidence rate of childhood cancer in Germany 1987-2004. *Int J Cancer*. 2008;122:1859-1867.
16. <http://www.kinderkrebsregister.de/dkk/veroeffentlichungen/auswertungen-im-deta.il/leukaemien/lymphatische-leukaemien/dall10d.html>. Kinderkrebsregister Mainz: Detaillierte Auswertungen für lymphatische Leukämien. Deutschland 2004-2013. 2015.
17. [http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/all/index\\_ger.html](http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/patienten/leukaemien/all/index_ger.html). Kompetenznetz Leukämien Heidelberg. Symptome bei akuten lymphatischen Leukämien. Deutschland 2006-2013. 2014.
18. Schrappe M, Creutzig U. Akute lymphoblastische (ALL) und akute myeloische (AML) Leukämie im Kindesalter. AWMF online. 2008. [www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/025-014.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/025-014.pdf). (Die aktuellen Leitlinien der AWMF werden zur Zeit überarbeitet. 2015.)
19. Gökbüget N, Hauswirth AW, Kneba M, Schanz U, Ottmann O. Differentialdiagnosen der akuten lymphatischen Leukämie. Leitlinien der DGHO Onkopedia. [www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/akute-lymphatische-leukaemie](http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/akute-lymphatische-leukaemie). 2012.
20. Campana D, Behm FG. Immunophenotyping of leukemia. *J Immunol Methods*. 2000;243:59-75.
21. Chessels JM, Swansbury GJ, Reeves B, Bailey CC, Richards SM. Cytogenetics and prognosis in childhood lymphoblastic leukaemia: Results of MRC UKALL X. Medical Research Council Working Party in Childhood Leukaemia. *Br J Haematol*. 1997;99:93-100.
22. Bacher U, Schnittger S, Haferlach C, Haferlach T. Molecular diagnostics in acute leukemias. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47:1333-1341.
23. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33:451-458.
24. Reid MM, Proctor SJ. Failure of FAB classification to predict relapse-free survival in acute leukemia. *Lancet*. 1982;2:153-154.
25. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the WHO classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114:937-951.

26. Sarma A, Hazarika M, Das D, Kumar Rai A, Sharma JD, Bhuyan C, Katakai AC. Expression of aberrant CD markers in acute leukemia: A study of 100 cases with immunophenotyping by multiparameter flowcytometry. *Cancer Biomark.* 2015. [Epub ahead of print]
27. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VH, Flores-Montero J, Rawstron A, Asnafi V, Lécresse Q, Lucio P, Mejstrikova E, Szczepański T, Kalina T, de Tute R, Brüggemann M, Sedek L, Cullen M, Langerak AW, Mendonça A, Macintyre E, Martin-Ayuso MO, Vidriales MB, Orfao A. EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708). EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia.* 2012;26:1908-1975.
28. DiGiuseppe JA, Tadmor P. Detection of Minimal Residual Disease in B Lymphoblastic Leukemia Using viSNE. *Cytometry B Clin Cytom.* 2015. [Epub ahead of print]
29. Ludwig WD, Bartram CR, Ritter J, Raghavachar A, Hiddemann W, Heil G, Harbott J, Seibt-Jung H, Teichmann JV, Riehm H. Ambiguous phenotypes and genotypes in 16 children with acute leukemia as characterized by multiparameter analysis. *Blood.* 1988;71:1518-1528.
30. Greaves MF, Janossy G, Peto J, Kay H. Immunologically defined subclasses of acute lymphoblastic leukaemia in children: Their relationship to presentation features and prognosis. *Br J Haematol.* 1981;48:179-197.
31. Schrappe M, Harbott J, Riehm H. Akute lymphoblastische Leukämien. In: Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J (editors). *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie* Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag. 2006;656-679.
32. Bloomfield CD, Goldman AI, Alimena G, Berger R, Borgström GH, Brandt L, Catovsky D, de la Chapelle A, Dewald GW, Garson OM, et al. Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1986;67:415-420.
33. Hilden JM, Frestedt JL, Moore RO, Heerema NA, Arthur DC, Reaman GC, Kersey JH. Molecular Analysis of Infant Acute Lymphoblastic Leukemia: MLL Gene Rearrangement and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction for t(4;11)(q21;q23). *Blood.* 1995;86:3876-3888.
34. Reiter A, Schrappe M, Ludwig WD, Hiddemann W, Sauter S, Henze G, Zimmermann M, Lampert F, Havers W, Niethammer D et al. Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood.* 1994;84:3122-3133.
35. Silverman LB, Gelber RD, Dalton VK, Asselin BL, Barr RD, Clavell LA, Hurwitz CA, Moghrabi A, Samson Y, Schorin MA, Arkin S, Declerck L, Cohen HJ, Sallan SE. Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Dana-Farber Consortium Protocol 91-01. *Blood.* 2001;97:1211-1218.

36. Schrappe et al. Multizentrische Therapiestudie ALL-BFM 2000 zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit akuter lymphoblastischer Leukämie. Therapieprotokoll. 2000.
37. Möricke A, Reiter A, Zimmermann M, Gadner H, Stanulla M, Dördelmann M, Löning L, Beier R, Ludwig WD, Ratei R, Harbott J, Boos J, Mann G, Niggli F, Feldges A, Henze G, Welte K, Beck JD, Klingebiel T, Niemeyer C, Zintl F, Bode U, Urban C, Wehinger H, Niethammer D, Riehm H, Schrappe M; German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. Risk-adjusted therapy of acute lymphoblastic leukemia can decrease treatment burden and improve survival: treatment results of 2169 unselected pediatric and adolescent patients enrolled in the trial ALL-BFM 95. *Blood*. 2008;111:4477-4489.
38. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, Parasole R, Zimmermann M, Dworzak M, Buldini B, Reiter A, Basso G, Klingebiel T, Messina C, Ratei R, Cazzaniga G, Koehler R, Locatelli F, Schäfer BW, Aricò M, Welte K, van Dongen JJM, Gadner H, Biondi A, Conter V. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood*. 2011;118:2077-2084.
39. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, Arico M, Zimmermann M, Mann G, De Rossi G, Stanulla M, Locatelli F, Basso G, Niggli F, Barisone E, Henze G, Ludwig W-D, Haas OA, Cazzaniga G, Koehler R, Silvestri D, Bradtke J, Parasole R, Beier R, van Dongen JJM, Biondi A, Schrappe M. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*. 2010;115:3206-3214.
40. Lauten M, Möricke A, Beier R, Zimmermann M, Stanulla M, Meissner B, Odenwald E, Attarbaschi A, Niemeyer C, Niggli F, Riehm H, Schrappe M. Prediction of outcome by early bone marrow response in childhood acute lymphoblastic leukemia treated in the ALL-BFM 95 trial: differential effects in precursor B-cell and T-cell leukemia. *Haematologica*. 2012;97:1048-1056.
41. van der Does-van den Berg A, Bartram CR, Basso G, Benoit YC, Biondi A, Debatin KM, Haas OA, Harbott J, Kamps WA, Köller U, et al. Minimal requirements for the diagnosis, classification, and evaluation of the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) in the "BFM Family" Cooperative Group. *Med Pediatr Oncol*. 1992;20:497-505.
42. Bartram CR, Schrauder A, Köhler R, Schrappe M. Acute lymphoblastic leukemia in children - treatment planning via minimal residual disease assessment. *Dtsch Arztebl Int*. 2012;109:652-628.
43. Campana D. Minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2009;46:100-106.

44. Riehm H, Reiter A, Schrappe M, Berthold F, Dopfer R, Gerein V, Ludwig R, Ritter J, Stollmann B, Henze G. Die Corticosteroid-abhängige Dezimierung der Leukämiezellzahl im Blut als Prognosefaktor bei der akuten lymphoblastischen Leukämie im Kindesalter (Therapiestudie ALL-BFM 83). *Klin Padiatr.* 1987;199:151-160.
45. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W, Niemeyer C, Henze G, Feldges A, Zintl F, Kornhuber B, Ritter J, Welte K, Gadner H, Riehm H. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood.* 2000;95:3310-3322.
46. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: A Children's Oncology Group study. *Blood.* 2008;111:5477-5485.
47. Raff T, Brüggemann M, Kneba M. Klinische Bedeutung der minimalen Resterkrankung bei Leukämien. *Med Welt.* 2004;55:269-273.
48. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, van't Veer MB. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia.* 1995;9:1783-1786.
49. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer R, van der Velden V, Fischer S, Stanulla M, Basso G, Niggli FK, Schäfer BW, Sutton R, Koehler R, Zimmermann M, Valsecchi MG, Gadner H, Masera G, Schrappe M, van Dongen JJM, Biondi A, Bartram CR; International BFM Study Group (I-BFM-SG). Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2008;22:771-782.
50. van Dongen JJM, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willems MJ, Corral L, Stolz F, Schrappe M, Masera G, Kamps WA, Gadner H, van Wering ER, Ludwig WD, Basso G, de Bruijn MA, Cazzaniga G, Hettlinger K, van der Does-van den Berg A, Hop WC, Riehm H, Bartram CR. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet.* 1998;352:1731-1738.
51. van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, et al: Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia.* 2007;21:604-611.
52. Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Am. Stat. Assoc.* 1958;53:457-481.
53. Mantel N: Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemother Rep.* 1966;50:163-170.



54. Schrappe M. Risk-adapted stratification and treatment of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Radiat Prot Dosimetry*. 2008;132:130-133.
55. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013;381:1943–1955.
56. Vora A, Goulden N, Wade R, et al. Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): A randomised controlled trial. *Lancet*. 2013;14:199-209.
57. Stary J, Zimmermann M, Campbell M, et al. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *J Clin Oncol*. 2014;32:174-184.
58. Reiter A, Schrappe M, Tiemann M, et al. Improved treatment results in childhood B-cell neoplasms with tailored intensification of therapy: A report of the Berlin- Frankfurt-Munster Group Trial NHL-BFM 90. *Blood*. 1999;94:3294-3306.
59. Vora A, Goulden N, Wade R, et al: Treatment reduction for children and young adults with low-risk acute lymphoblastic leukaemia defined by minimal residual disease (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2013;14:199-209.
60. Pui C-H, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. *J Clin Oncol*. 2011;29:551-565.
61. Moricke A, Zimmermann M, Reiter A, et al. Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*. 2010;24:265-284.
62. Wahl SK, Gildengorin G<sup>†</sup>, Feusner J. Weekend Delay in Initiation of Chemotherapy for Acute Lymphoblastic Leukemia: Does it Matter? *J Pediatr Hematol Oncol*. 2012;34:8–11.
63. Baker JM, To T, Beyene J, Zagorski B, Greenberg ML, Sung L. Influence of length of time to diagnosis and treatment on the survival of children with acute lymphoblastic leukemia: a population-based study. *Leuk Res*. 2014;38:204-209.
64. Herold R, von Stackelberg A, Hartmann R, Eisenreich B, Henze G. Acute Lymphoblastic Leukemia - Relapse Study of the Berlin-Frankfurt-Münster Group (ALL-REZ BFM) Experience: Early Treatment Intensity Makes the Difference. *J Clin Oncol*. 2004;22:569-570.
65. Koka A, Saygin C, Uzunaslán D, Ozdemir N, Apak H, Celkan T. A 17-year experience with ALL-BFM protocol in acute lymphoblastic leukemia: Prognostic predictors and interruptions during protocol. *Leuk Res*. 2014;38:699-705.

66. Suarez A, Piña M, Nichols-Vinueza DX, Lopera J, Rengifo L, Mesa M, Cardenas M, Morrissey L, Veintemilla G, Vizcaino M, Del Toro L, Vicuna V, Fernandez J, Neuberg D, Stevenson K, Gutierrez A. A strategy to improve treatment-related mortality and abandonment of therapy for childhood ALL in a developing country reveals the impact of treatment delays. *Pediatr Blood Cancer*. 2015. [Epub ahead of print]
67. Zeidler L, Zimmermann M, Möricke A, Meissner B, Bartels D, Tschan C, Schrauder A, Cario G, Goudeva L, Jäger S, Ratei R, Ludwig W-D, Teigler-Schlegel A, Skokowa J, Koehler R, Bartram CR, Riehm H, Schrappe M, Welte K, Stanulla M. Low platelet counts after induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia are strongly associated with poor early response to treatment as measured by minimal residual disease and are prognostic for treatment outcome. *Haematologica*. 2012;97:402-409.
68. Faderl S, Thall PF, Kantarjian HM, Estrov Z. Time to platelet recovery predicts outcome of patients with de novo acute lymphoblastic leukaemia who have achieved a complete remission. *Br J Haematol*. 2002;117:869–874.
69. De Angulo G, Yuen C, Palla SL, Anderson PM, Zweidler-McKay PA. Absolute lymphocyte count is a novel prognostic indicator in ALL and AML: implications for risk stratification and future studies. *Cancer*. 2008;112:407-15.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Martin Schrappe und Herrn Prof. Dr. med. Claus R. Bartram danke ich für die Genehmigung und Unterstützung meiner Arbeit zur Dissertation in der hämatoonkologischen Abteilung in der Klinik für Allgemeine Pädiatrie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel und in der Abteilung für Humangenetik am Universitätsklinikum in Heidelberg. Im Besonderen danke ich Herrn Prof. Dr. Schrappe für die Förderung und finanzielle Unterstützung meines Projektes, durch die meine Besuche im MRD-Labor in Heidelberg ermöglicht wurden, sowie auch die Präsentation meiner Arbeit auf dem Kongress der American Society of Hematology in San Diego im Dezember 2011.

Meinem früheren Betreuer des Promotionsprojekts Herrn Dr. med. André Schrauder möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für die gute und geduldige Betreuung meiner Arbeit in den ersten Jahren danken. Er erfüllte mir meinen Wunsch, eine Arbeit über akute lymphatische Leukämien zu schreiben und war stetiger Ansprechpartner in allen Fragen.

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Gunnar Cario, der nach dem Ausscheiden von Dr. med. André Schrauder aus der Kinderklinik die Betreuung meiner Arbeit übernahm, gilt mein tief empfundener Dank. Seiner zielstrebigem und akkuraten Betreuung, sowie seiner immerwährend höflichen, geduldigen und stets positiv-motivierenden Art ist es zu verdanken, dass diese Arbeit fertig gestellt wurde. Dafür werde ich immer dankbar sein.

Bei Frau Dr. med. Anja Möricke, der leitenden Studienkoordinatorin der ALL-BFM Studie in Kiel, möchte ich mich herzlich für die tatkräftige Unterstützung, Geduld und Akkuratheit bei der statistischen Auswertung der Daten sowohl im Rahmen der Doktorarbeit über all die Jahre als auch im Rahmen der geplanten Veröffentlichung bedanken, sowie für die vielen Gespräche und Ratschläge.

Bei Studienstatistiker Dr. med. Martin Zimmermann aus Hannover möchte ich mich ebenfalls für die Hilfe bei der Datenauswertung über die letzten Jahre bedanken.

Herrn Dr. phil. nat. Rolf Köhler aus dem Institut für Humangenetik an der Universität Heidelberg möchte ich für die Betreuung während meiner Besuche in Heidelberg und auch aus der Ferne danken, insbesondere für die Geduld und Zuwendung, die mir durch ihn und das gesamte Team des MRD-Labors in Heidelberg entgegen gebracht wurden.

Der Archivarin Melanie Gerzmehle möchte ich danken, die mich von Beginn meiner Arbeit an begleitet und mir stets zur Seite gestanden hat. Der Dokumentarin Susanne Timm danke ich ebenfalls für ihre Hilfe während meiner Arbeit im Archiv. Des Weiteren möchte ich den medizinisch technischen Assistenten Christina Becker, Frauke Kahlert, Birthe Eggers, Martina Kähler und Christian Bretscher aus dem Labor in Kiel herzlich danken für ihre geduldige Einarbeitung und stets freundliche Unterstützung bei der Erhebung meiner Daten im Labor. Ein weiterer Dank geht an die medizinischen Assistentinnen der Morphologie-Diagnostik Marga Lorenzen, Antje Sörensen und Dietlinde Hille, die mich herzlich im Labor aufgenommen und in die Diagnostik der Morphologie von Blut- und Leukämiezellen eingeführt haben.

Abschließend möchte ich meinen Eltern Sabine und Dieter Arens danken, die mir nach Abschluss meines ersten Studiums noch das Studium der Medizin finanzierten und mir damit den Weg ebneten, meinen lang gehegten Wunsch umzusetzen, Ärztin zu werden.

## **Curriculum Vitae**

### **Persönliche Daten:**

Name, Vorname: Arens, Marianne  
Geburtsdatum: 19. Juli 1972  
Geburtsort: Heide (Holstein)  
Familienstand: ledig  
Nationalität: Deutsch

---

### **Schulbildung:**

1978-1982 Grundschule Wesseln, bei Heide (Holstein)  
1982-1991 Werner-Heisenberg-Gymnasium, Heide (Holstein)  
1991 Abitur

---

### **Auslandsaufenthalt:**

1991-1992 Au-Pair in Chicago, Michigan, USA

---

### **Weiterer Werdegang:**

1992-1993 Ausbildung zur Schwestern-Helferin, Malteser Hilfsdienst, Kiel  
1993-1999 Pflegedienst in der Werk- & Betreuungsstätte Ottendorf, Kiel

---

### **1. Hochschulausbildung:**

1994-2000 Sport und Englisch Lehramt Gymnasium, CAU Kiel  
2000 1. Staatsexamen Sport und Englisch  
2001-2003 Referendariat in Heikendorf bei Kiel  
2003 2. Staatsexamen Sport und Englisch

---

### **1. Berufliche Tätigkeit:**

2003-2004 Lehrerin in Gettorf bei Kiel für Sport, Englisch und Kunst

---

### **2. Hochschulausbildung:**

2004 Humanmedizin, CAU Kiel  
2006 Abschluss 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2008 Beginn einer Promotion über Leukämien bei Kindern  
2010 Abschluss 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2011 Erteilung der Approbation als Ärztin  
2011-2015 Durchführung der Dissertation

---

### **2. Berufliche Tätigkeit:**

2011-2014 Assistenzärztin in der Allgemeinchirurgie bei Prof. Becker, UKSH Kiel  
2014-2015 Assistenzärztin Praxis für Proktologie Dr. Doniec & Dr. Birkner, Kiel  
2015-2016 Assistenzärztin Hautarztpraxis Dr. Grieffenhagen, Eutin  
bis 10/2016 Assistenzärztin Hautarztzentrum Dr. Müller-Steinmann, Kiel  
seit 10/2016 Assistenzärztin Dermatologie Asklepios Nordseeklinik Westerland, Sylt

---

### **Veröffentlichung:**

2011 Präsentation der Doktorarbeit auf dem Kongress der American Society of Hematology in San Diego im Dezember 2011

---