UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation

Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger

Evaluation des prädiktiven Werts der Zytomorphologie in der Post-Transplantationsphase bei Patienten mit AML und MDS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Karolin Miersch
aus Potsdam

Hamburg 2014

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.01.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. U. Bacher

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. med. M. Binder

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. med. G. Escherich

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	**Einleitung**	**1**
1.1	Akute Myeloische Leukämie	1
1.2	Myelodysplastisches Syndrom	8
1.3	Allogene hämatologische Stammzelltransplantation (HSZT)	11
1.3.1	Indikation zur allogenen HSZT	11
1.3.2	Spendersuche und Wirkungsweise der allogenen HSZT	12
1.3.3	Vorbehandlung zur allogenen HSZT (Konditionierung)	13
1.3.4	Stammzellgewinnung	15
1.4	Komplikationen nach allogener HSZT	16
1.5	Therapeutische Möglichkeiten bei einem Rezidiv nach allogener HSZT	17
1.6	Nachsorge nach allogener HSZT – Zellularität, Blasten und Dysplasie	18
1.7	Stammzelltransplantation am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf	22
1.8	Design der Studie	22
2.	**Material und Methoden**	**23**
2.1	Einschlusskriterien	23
2.2	Zytomorphologie	24
2.3	Weitere Definitionen	25
2.4	Datenerfassung und Statistik	26
3.	**Ergebnisse**	**27**
3.1	Patientencharakteristika	27
3.2	Transplantationscharakteristika	30

Seite

3.3 Zellularität nach allogener HSZT 32

3.3.1 Zellularität am Untersuchungstag 30 nach allogener HSZT 33

3.3.2 Zellularität am Untersuchungstag 100 nach allogener HSZT 33

3.4 Dysplasie nach allogener HSZT 35

3.4.1 Dysplasie am Untersuchungstag 30 nach allogener HSZT 35

3.4.2 Dysplasie am Untersuchungstag 100 nach allogener HSZT 35

3.5 Klinische Ergebnisse 37

3.6 Korrelation zwischen der Gesamtzellularität und dem Überleben 38

3.7 Korrelation zwischen der Zellularität der Granulopoese und dem Überleben 40

3.8 Korrelation zwischen der Zellularität der Erythropoese und dem Überleben 40

3.9 Korrelation zwischen der Zellularität der Megakaryopoese und dem Überleben 41

3.10 Korrelation zwischen der Dysplasie in der Granulopoese und dem Überleben 44

3.10.1 Korrelation bezogen auf einen Grenzwert von 10 Prozent Dysplasie 44

3.10.2 Korrelation bezogen auf einen Grenzwert von 50 Prozent Dysplasie 44

3.11 Korrelation zwischen der Dysplasie in der Erythropoese und dem Überleben 45

3.11.1 Korrelation bezogen auf einen Grenzwert von 10 Prozent Dysplasie 45

3.11.2 Korrelation bezogen auf einen Grenzwert von 50 Prozent Dysplasie 46

Seite

3.12 Korrelation zwischen der Dysplasie in der Megakaryopoese und dem Überleben 47

3.12.1 Korrelation bezogen auf einen Grenzwert von 10 Prozent Dysplasie 47

3.12.2 Korrelation bezogen auf einen Grenzwert von 50 Prozent Dysplasie 47

3.13 Evaluation unterschiedlicher Prognoseparameter in der Cox-Regressionsanalyse 51

4. Diskussion 53

4.1 Bewertung 57

4.2 Ausblick 58

5. Zusammenfassung 58

6. Abkürzungsverzeichnis 60

7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen 61

8. Literaturverzeichnis 63

9. Veröffentlichungen 69

10. Danksagung 70

11. Lebenslauf 71

12. Eidesstattliche Erklärung 71

1. Einleitung

1.1 Akute Myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine maligne hämatopoetische Erkrankung vor allem des Erwachsenenalters, die Hälfte aller Patienten ist über 60 Jahre alt. Mit jährlich drei bis vier Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner stellt sie eine seltene Entität dar, wobei Männer etwas häufiger betroffen sind als Frauen (Büchner et al., 2013).

Genetische Veränderungen führen zu einer Störung des normalen Ablaufs des Wachstums, der Differenzierung und der Apoptose hämatopoetischer Zellen. Diese Deregulation führt zu einer für die AML charakteristischen autonomen Proliferation von unreifen myeloischen Zellen, den Myeloblasten (Braess et al., 2009, S. 19).

Werden keine Myeloblasten im peripheren Blut nachgewiesen (Abb. 1), so schließt dies eine Erkrankung nicht aus, da ein Nachweis von mindestens 20 Prozent Blasten im Knochenmark die Diagnose der AML sichert (Büchner et al., 2013).

Darüber hinaus können auch andere Organe mit Blasten infiltriert werden, man spricht dann von Chloromen oder einem „myeloischen Sarkom“. Häufig sind hierbei z.B. Haut, Gingiva und die Meningen infiltriert (Braess et al., 2009, S. 33).

Durch die starke Vermehrung der Blasten kommt es zu einer Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark.

Die Folge ist eine Verminderung von reifen, funktionsfähigen Zellen im peripheren Blut, so dass eine Thrombozytopenie und Anämie entstehen. Klinische Symptome können Müdigkeit, Schwäche, Blässe, häufige Infektionen und Blutungszeichen sein. Die absolute Leukozytenzahl kann erhöht, normal oder erniedrigt sein (Braess et al., 2009, S. 32f.).

Als Prädispositionsfaktoren für eine AML sind u.a. ionisierende Strahlen, Zytostatika, vorausgehende andere hämatologische Erkrankungen, Chemikalien und hereditäre Faktoren bekannt.

Die Basis-Diagnostik bei einem Patienten mit dem Verdacht auf eine AML umfasst neben einer Analyse des Blut- und Differenzialblutbilds die Bestimmung der Serumchemie, insbesondere der Lactatdehydrogenase (LDH), Harnsäure und Gerinnungsparameter. So kann man eventuell bereits vorhandene Komplikationen, wie eine disseminierte intravasale Gerinnung und eine Verbrauchskoagulopathie bei einer akuten Promyelozytenleukämie (AML French-American-British/FAB Subtyp M3), detektieren (Braess et al., 2009, S. 32).

Die Knochenmarkpunktion ermöglicht die Sicherung der Diagnose einer AML (insbesondere auch bei fehlendem Blastennachweis in der Peripherie) und ermöglicht die Erfassung wesentlicher Kriterien, u.a. des morphologischen FAB Subtyps. Der zytomorphologischen Beurteilung von Knochenmarkausstrichen kommt hier eine ganz zentrale Rolle zu: Zum einen kann anhand des Blastenanteils die Diagnose einer akuten Leukämie, im Falle des Nachweises von Auerstäbchen auch bereits einer AML, gesichert werden. Fälle von AML haben in der Regel einen Knochenmarkblastenanteil von ≥ 20 Prozent (Büchner et al., 2013). Des Weiteren erlauben der Grad der Ausreifung in der Granulopoese, der Anteil der monozytären Zellen, sowie der Anteil von Zellen der Erythropoese eine Bestimmung des morphologischen FAB-Subtyps. Anhand der Zytochemie und der Immunphänotypisierung wird die myeloische Herkunft der Leukämiezellen festgestellt (Braess et al., 2009, S. 25). Anschließend erstellt man einen zytogenetischen Befund. Mit Hilfe der Zytogenetik lässt sich die AML in prognostisch relevante Subgruppen einteilen:

- prognostisch günstige Subgruppe, z.B. t(8;21), t(15;17) sowie Inversion des Chromosoms 16 (Abb. 2, 3)
- prognostisch intermediäre Subgruppe, vor allem normaler Karyotyp (Abb. 4)
- prognostisch ungünstige Subgruppe, wie Veränderungen der Chromosomen 5 oder 7, komplexer Karyotyp (Abb. 5)

Chromosomale Aberrationen können anhand der Chromosomenanalyse bei über 50 Prozent aller AML-Patienten nachgewiesen werden (Braess et al., 2009, S. 22).

Des Weiteren ist eine molekulargenetische Untersuchung möglich. Beispielsweise gilt eine *FLT3*-ITD-Mutation (= Längenmutation im *FLT3*-Gen) als prognostisch ungünstig.
Die neue Klassifikation der WHO (2008) berücksichtigt morphologische, immunologische und zytogenetische sowie molekulargenetische Aspekte (Swerdlow et al., 2008, S. 110ff.).

Die Therapie der AML lässt sich in verschiedenen Phasen unterteilen. Zunächst erhalten alle Patienten eine Induktionschemotherapie. Sie hat das Ziel, eine komplette Remission der Erkrankung zu erreichen. Eine komplette Remission ist durch weniger als 5 Prozent Blasten im Knochenmark und Blastenfreiheit im peripheren Blut, die Wiederherstellung des normalen Blutbilds, und die Absenz extramedullärer Manifestationen der AML gekennzeichnet (Cheson et al., 2003). Somit hat auch zur Überprüfung des Therapie-Erfolgs die zytomorphologische Beurteilung der Knochenmarkaspirate eine große Bedeutung.
Danach wird die Konsolidierungstherapie eingeleitet, welche als Postremissionstherapie gilt und eine weitere Elimination residueller leukämischer Zellen zum Ziel hat.
Der Wert einer Erhaltungstherapie ist bei der AML umstritten. Die individuelle Prognose der AML-Patienten ist vom Alter und dem genetischen Risikoprofil abhängig.
AML-Patienten mit einem prognostisch günstigen Karyotyp werden in erster Linie mit einer kurativ angesetzten Chemotherapie behandelt.
Bei AML-Patienten mit einem ungünstigen Karyotyp sollte bereits in der ersten kompletten Remission eine allogene hämatologische Stammzelltransplantation (HSZT) durchgeführt werden (Gökbuget et al., 2005).
Bei einem intermediären Karyotyp wird das molekulargenetische Risikoprofil berücksichtigt. Patienten mit einer isolierten *NPM1*-Mutation werden oftmals primär konservativ behandelt. Bei einer *FLT3*-ITD-Mutation hingegen kann eine allogene HSZT indiziert sein.

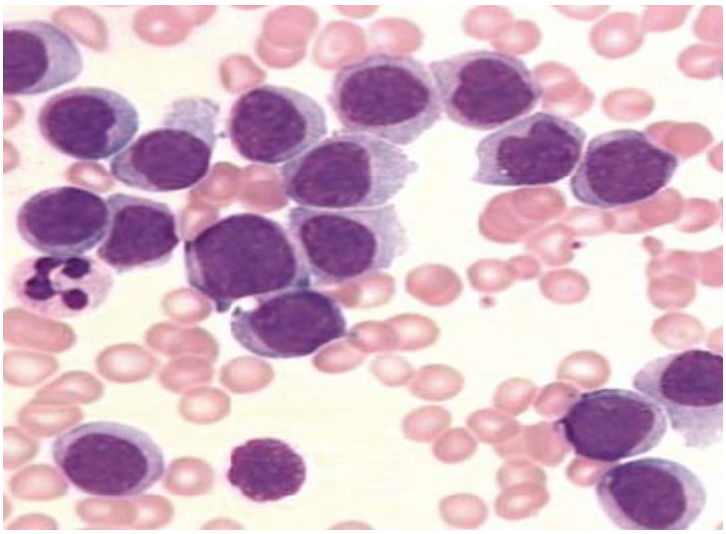


Abbildung 1: Vermehrung myelomonozytärer Blasten bei AML im peripheren Blut (*Prof. Dr. Dr. Torsten Haferlach, MLL Münchner Leukämielabor)*

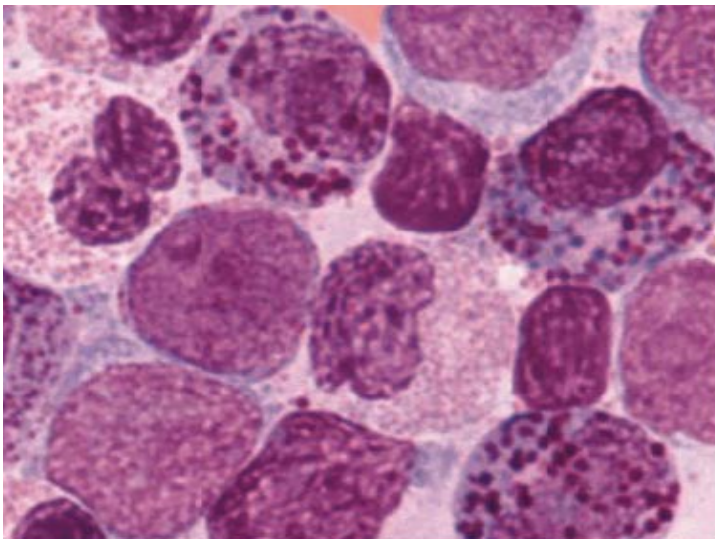


Abbildung 2: Das zytomorphologische Korrelat zur inv(16)/*CBFB-MYH11* mit pathologischen Eosinophilen mit dunklen Granula (AML FAB M4eo)

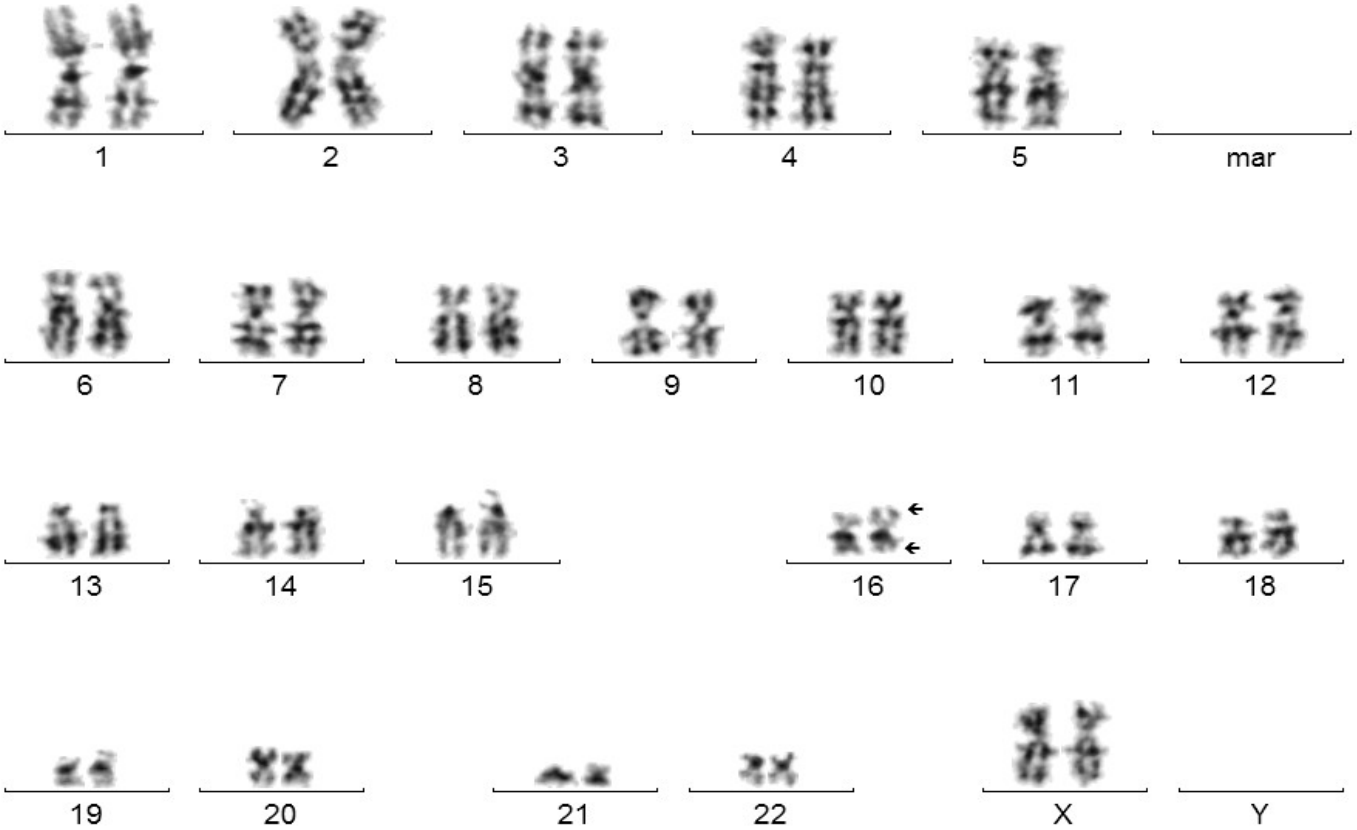


Abbildung 3: Karyotyp bei inv(16)/*CBFB-MHY11* (Prof. Dr. Claudia Haferlach, MLL Münchner Leukämielabor)

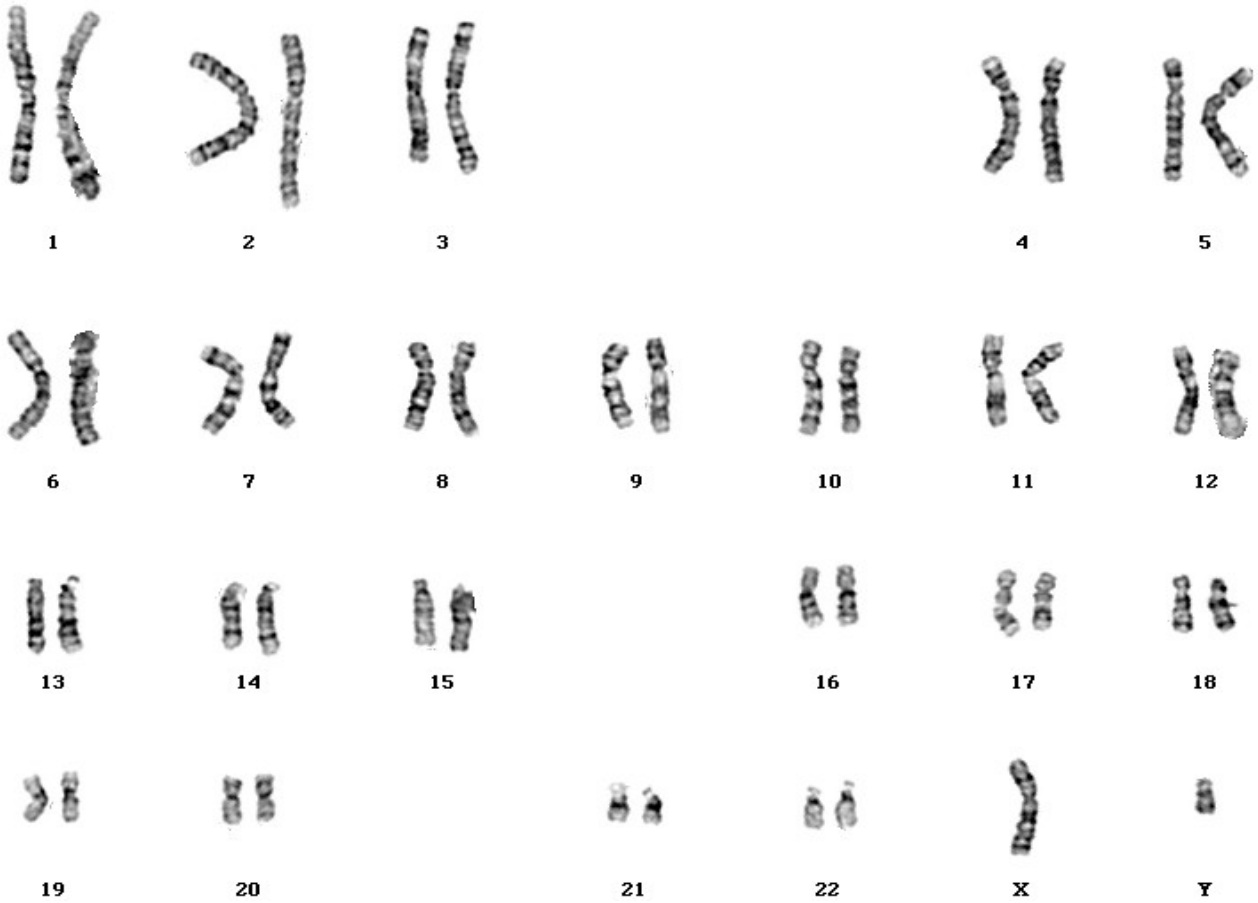


Abbildung 4: Normaler männlicher Karyotyp (Ahsen und Rommel, 2012)

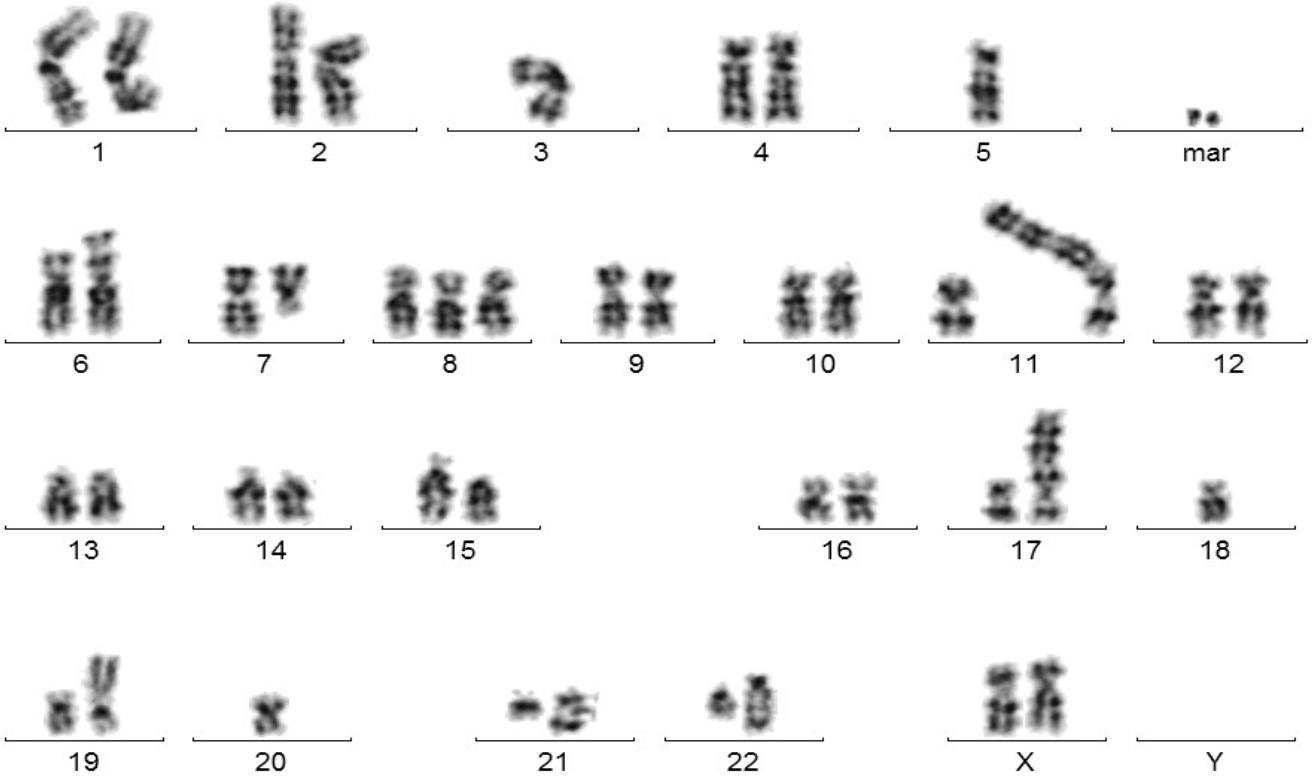


Abbildung 5: Beispiel eines komplexen Karyotyps mit multiplen zytogenetischen Aberrationen (Prof. Dr. Claudia Haferlach, MLL Münchner Leukämielabor)

1.2 Myelodysplastisches Syndrom

Das myelodysplastische Syndrom (MDS) ist eine Knochenmarkerkrankung vor allem älterer Menschen. Die Rate der Neuerkrankungen liegt jährlich weltweit bei etwa 4 pro 100.000 Einwohner (Haferlach et al., 2010, S. 2).
Das MDS geht von Blutstammzellen im Knochenmark aus, so dass es zu einer quantitativen und qualitativen Veränderung aller drei sich daraus entwickelnden Zellreihen der Hämotopoese (Erythropoese, Granulopoese und Thrombopoese) kommen kann.
Ursächlich können mutagene Noxen sein, die meist durch eine Langzeitschädigung des Knochenmarks zur Entwicklung des MDS führen. Organische Lösungsmittel, wie Benzol, häufiger aber eine vorausgegangene Bestrahlung und Zytostatika oder Immunsuppressiva zählen zu den bekannten Noxen (Müller-Thomas et al., 2009, S. 114). Im Falle eines kausalen Zusammenhangs eines MDS mit einer vorausgegangenen Chemotherapie oder Bestrahlung spricht man von „t-MDS“ (therapieassoziiertes MDDS). In über 90 Prozent der MDS-Erkrankungen ist jedoch eine auslösende Ursache nicht ermittelbar (Hofmann et al., 2011).
Sowohl klinisch, als auch zellbiologisch und prognostisch handelt es sich beim MDS um eine heterogene Krankheitsgruppe, die in verschiedene Subtypen eingeteilt wird. Für die Einteilung der verschiedenen Subtypen ist der Anteil an unreifen, nicht funktionsfähigen Zellen, den Blasten (sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut) von besonderer Bedeutung. Des Weiteren spielen Dysplasien, die Zahl der betroffenen Blutzellreihen und das Auftreten von Ringsideroblasten, welche Erythrozytenvorstufen mit eingeschlossenen Eisengranula darstellen (Abb. 6), eine entscheidende Rolle (Brunning et al., 2008, S. 88f.).

Zur Definition des Kriteriums „Dysplasie“ beim MDS werden nach heutigem Stand mindestens 10 Prozent dysplastische Zellen in einer Zelllinie gefordert (Erythropoese, Granulopoese, Megakaryopoese). Beispiele für Dysplasien sind in der Erythropoese etwa Karyorrhexis, megaloblastoide Veränderungen oder Kernbrücken. In der Granulopoese sind Pseudo-Pelger-Zellen oder etwa

Hypogranulation der Segmentkernigen als Beispiele für Dysplasien zu nennen. In der Megakaryopoese können sich z.B. Einzelkerne oder Mikroformen als Ausdruck einer Dysplasie finden (Brunning et al., 2008).

Die Diagnose eines MDS erfolgt heutzutage in der Regel nach der aktuellen WHO-Klassifikation von 2008 (Brunning et al., 2008). Es werden verschiedene Subtypen unterschieden, hier sind u.a. eine RCMD („refractory cytopenia with multilineage dysplasia“) zu nennen, bei welcher das Kriterium Dysplasie (in mindestens 10 Prozent der Zellen, sh. Oben) in zwei oder drei Zellreihen erfüllt ist, zu nennen. Bei diesem MDS-Subtyp findet sich keine Blastenvermehrung. Fälle, in welchen nur die Erythropoese betroffen ist, werden als RA klassifiziert („refractory anemia“). Sehr selten sind eine RT („refractory thrombocytopenia“) oder RN („refractory neutropenia“). Fälle mit Blastenvermehrung werden als RAEB benannt („refractory anemia with excess blasts). Beim MDS RAEB-1 findet man 5-9 Prozent Blasten im Knochenmark , beim MDS RAEB-2 beträgt der Blastenanteil 10-19 Prozent im Knochenmark (Brunning et al., 2008).

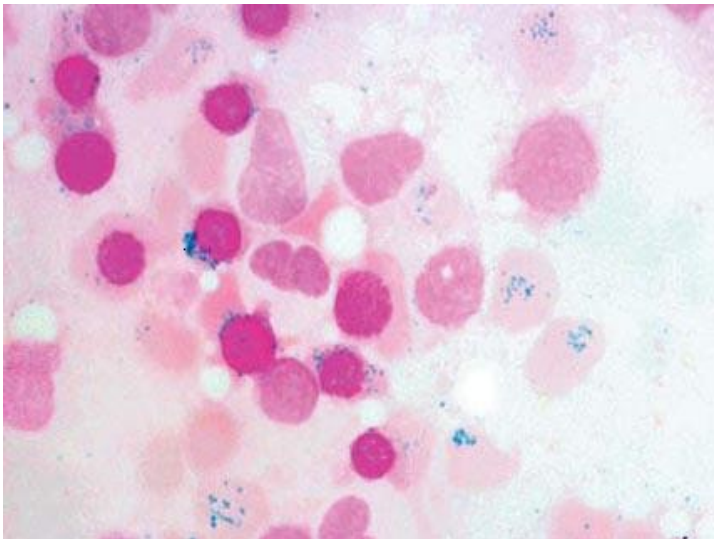


Abbildung 6: Nachweis von Ringsideroblasten in der Eisenfärbung (Haferlach et al., 2010, S. 29)

Für die Diagnosestellung und zur Beurteilung des Anteils der Blasten werden eine zytomorphologische Knochenmarkuntersuchung und eine Erhebung der peripheren Blutzellwerte durchgeführt.
Somit kommt auch hier der zytomorphologischen Beurteilung von Knochenmarkausstrichen eine besondere Bedeutung für die Diagnosestellung eines Falles von MDS zu. Es gilt zu bemerken, dass die Sicherung der Diagnose eines MDS in vielen Fällen sehr diffizil ist und großer Erfahrung bedarf, da sich dysplastische Veränderungen auch bei toxischen Prozessen beispielsweise finden können, so dass oftmals auch mehrere Untersuchungen notwendig sind, bis man eine endgültige Aussage treffen kann.
Des Weiteren können selbst gesunde Individuen Dysplasien in der Hämatopoese aufweisen (Bain, 1996).
Wegweisend sind Zytopenien im peripheren Blut; darüber hinaus kommt es zu einer Verminderung reifer hämatopoetischer Zellen, da aus der Erkrankung der Blutstammzellen eine Reifungsstörung der Blutzellen resultiert. Eine zunehmende Blastenvermehrung, die bis zu einer Transformation in eine sekundäre AML (s-AML) reichen kann, führt gleichzeitig zu einer normalen bis erhöhten Zelldichte im Knochenmark (Müller-Thomas et al., 2009, S. 115).
Zusätzlich soll in jedem Fall eine zytogenetische Untersuchung durchgeführt werden, da über 50 Prozent der Patienten mit MDS chromosomale Veränderungen zeigen (Haase et al., 2007).
Die zytogenetischen Veränderungen haben für die Therapie und Prognose der Patienten Relevanz.

Die Klinik der an einem MDS erkrankten Patienten ist sehr unterschiedlich. Viele Patienten zeigen bei Diagnosestellung keine Symptome, so dass die Diagnose einem Zufallsbefund entspricht - beispielsweise im Rahmen einer Routine-Blutuntersuchung (Müller-Thomas et al., 2009, S. 125). Als Folge der gestörten Erythropoese kommt es häufig zur Ausbildung einer Anämie, die zu Müdigkeit, körperlicher Schwäche und Belastungsdyspnoe führt. Infekt- und Blutungskomplikationen können - bedingt durch eine Störung der Granulozytopoese und der Thrombozytopoese - auftreten.

Zur Einschätzung der Prognose der Patienten mit MDS wurde ein internationaler Risikoscore „International Prognostic Scoring System“ (IPSS) eingeführt, der den Blastenanteil im Knochenmark, die Anzahl der peripher betroffenen Zellreihen mit Zytopenien und die Zytogenetik berücksichtigt (Greenberg et al., 1997, S. 2085). Vor kurzem wurde eine revidierte Fassung des IPSS vorgestellt, der sogenannte „Revised IPSS” (IPSS-R) (Greenberg et al., 2012).
Je nach Einstufung im IPSS bzw. IPSS-R ist es möglich, die Patienten in verschiedene Risikogruppen einzuteilen, welche Hinweise für das Überleben und das Transformationsrisiko in eine s-AML ergeben.

Patienten mit einem niedrigen Transformationsrisiko werden vor allem supportiv behandelt. Beispiele sind die Gabe von Eythrozytenkonzentraten bei einer ausgeprägten Anämie oder die Antibiotikatherapie bei Infektionen. Patienten in einem fortgeschrittenen Stadium des MDS oder Patienten mit einem ungünstigen Risikoprofil nach Blastenanteil und Zytogenetik sind potentielle Kandidaten für eine allogene HSZT. Außerdem ist bei diesen Patienten eine Gabe des Medikaments Azacytidin, ein Analogon des Nukleosids Cytidin, möglich. Über die Hemmung der DNA-Synthese der sich vor allem schnell teilenden Zellen wirkt Azacytidin als antineoplastisches Mittel und verlängert die Überlebenszeit der Patienten im Vergleich zu herkömmlichen Behandlungsschemata signifikant (Fenaux et al., 2010, S. 562).

1.3 Allogene hämatologische Stammzelltransplantation (HSZT)

1.3.1 Indikation zur allogenen HSZT

Die Entscheidung zur Durchführung einer allogenen HSZT ist in jedem Einzelfall ein sorgfältiges Abwägen zwischen dem Risikoprofil des Patienten, dem Stadium der Erkrankung und dem Risiko transplantationsassoziierter Komplikationen. Ziel ist es, ein Gleichgewicht zwischen dem kurativen Potential

und den Risiken der allogenen HSZT zu erreichen (Schmid et al., 2009, S. 214f.).

1.3.2 Spendersuche und Wirkungsweise der allogenen HSZT

Um dem erkrankten Patienten körperfremde Stammzellen transplantieren zu können, d.h. eine allogene HSZT durchzuführen, muss zunächst ein für den Patienten geeigneter Stammzellspender (Donor) gefunden werden. Die Suche nach dem geeigneten Donor richtet sich vor allem nach den HLA-Merkmalen.
„HLA“ steht als englische Abkürzung für „human leukocyte antigen“ und umschreibt individuelle Oberflächenmerkmale und -eigenschaften der Leukozyten (Tallen und Kühl, 2010). Diese Oberflächenmerkmale, auch Antigene genannt, spielen im menschlichen Immunsystem eine Rolle, da sie u.a. zur Unterscheidung von Eigen- und Fremdgewebe dienen. Um eine mögliche immunologische Abwehrreaktion und die damit verbundenen Komplikationen so gering wie möglich zu halten, sollten Donor und Patient möglichst HLA-kompatibel sein, sich in den Oberflächenmerkmalen der Leukozyten also möglichst stark ähneln (Schmid et al., 2009, S. 211f.). Zunächst typisiert man die HLA-Merkmale der Geschwister des Patienten. Die Oberflächenmerkmale der Leukozyten werden jeweils von Mutter und Vater zu gleichen Teilen vererbt. Die Wahrscheinlichkeit, dass die HLA-Merkmale zwischen nicht eineiigen Geschwistern übereinstimmen, sie also HLA-identisch sind, beträgt somit 25 Prozent (Tallen und Kühl, 2010). Sollte man unter den Verwandten keinen passenden Familienspender finden, so sucht man im nächsten Schritt national und auch international nach einem HLA-kompatiblen Fremdspender. In Deutschland wird diese Suche durch das „Zentrale Knochenmarkspender-Register Deutschlands“ (ZKRD) koordiniert. Das ZKRD vergleicht die HLA-Merkmale des Patienten mit denjenigen der Spender. Die Erfolgsrate der Fremdspendersuche liegt bei über 80 Prozent (Schmid et al., 2009, S. 212).
Mit der allogenen HSZT verfolgt man das Ziel des „Graft-versus-Leukämie-

Effekts“, d.h. die immunologische Bekämpfung der verbliebenen Leukämiezellen durch die übertragenen Donorimmunzellen. Andererseits führt die Übertragung von Donorimmunzellen zu einer Abwehrreaktion der Donorzellen gegen gesunde Zellen des Empfänger-Organismus. Diese immunologische Reaktion nennt man „Graft-versus-Host-Disease“ (GvHD; Mumm, 2008).
Beim MDS beruht der Effekt einer allogenen HSZT nach der Eradikation der Patienten-eigenen (meist insuffizienten) Hämatopoese auf der Rekonstitution einer effektiven Hämatopoese. Gelingt dies, kommt es zu einer Normalisierung der peripheren Blutparameter sowie zu einer Terminierung des Transfusionsbedarfs (allerdings erst in ausreichendem zeitlichem Abstand zur allogenen HSZT).

1.3.3 Vorbehandlung zur allogenen HSZT (Konditionierung)

Ist ein passender Stammzellspender gefunden, so durchläuft der Patient vor der Aufnahme zur Transplantation eine Reihe von Voruntersuchungen. Diese Untersuchungen haben das Ziel, den aktuellen Gesundheitszustand des Patienten zu beurteilen, um etwaige Risiken für die Transplantation zu detektieren (z.B. kardiologische oder pulmonale chronische Erkrankungen). Werden diese Risiken vorab detektiert, ist eine bessere Einschätzung des Transplantationsrisikos möglich. Darüber hinaus können notwendige Therapien für Komorbiditäten rechtzeitig eingeleitet werden.
Im weiteren Verlauf erhält der Patient unmittelbar vor der eigentlichen HSZT eine Chemotherapie, man spricht von der Konditionierung. Individuell zur Erkrankung und zum aktuellen Gesundheitszustand des Patienten werden hierzu unterschiedliche Medikamente, die in verschiedenen Protokollen zusammengefasst sind, eingesetzt. Prinzipiell können Konditionierungsregimes verschiedener Intensität angewendet werden. Somit variiert die Dauer der Konditionierung zwischen drei und zehn Tagen.
Das Risiko, ein Rezidiv der Erkrankung nach der HSZT zu erleiden, ist umso

geringer, je besser die Eradikation der verbliebenen Leukämiezellen vor der Transplantation der allogenen Stammzellen gelingt.
Die Eradikation sämtlicher hämatologischer Zellen durch eine hochdosierte Chemotherapie zieht zwingend eine Transplantation von gesunden Donorstammzellen nach sich, da ansonsten ein Überleben nicht möglich wäre. Man unterscheidet myeloablative Konditionierungsregimes („myeloablative chemotherapy“, MAC) von der sogenannten dosisreduzierten Konditionierung („reduced intensity conditioning“, RIC). Dabei werden durch eine geringere Dosis an Chemotherapeutika unerwünschte Nebenwirkungen der Konditionierung verringert und somit deren Verträglichkeit verbessert. Dosisreduzierte Chemotherapien werden zum Beispiel bei älteren Patienten oder bei Patienten in reduziertem Allgemeinzustand bevorzugt. Der erwünschte Effekt der Eradikation leukämischer Zellen ist jedoch im Vergleich zur myeloablativen Chemotherapie geringer (Schwerdtfeger, 2003).
Je nach Konditionierungsprotokoll ist es möglich, die Chemotherapie mit einer Ganzkörperbestrahlung zu kombinieren. Diese Bestrahlung erhöht zusätzlich die Wahrscheinlichkeit, dass alle erkranken Zellen abgetötet werden.
Außerdem erhalten die Patienten während der Konditionierung oftmals Anti-Thymozytenglobulin (ATG), welches zur Depletion von Immunzellen im Patienten führt. Darüber hinaus wird auch das Transplantat immundepletiert, da ATG eine Halbwertszeit von mehreren Tagen aufweist. Diese Zerstörung von Immunzellen im Graft verringert das Risiko einer Graft-versus-Host-Disease.

Darüber hinaus erhalten alle Patienten eine immunsuppressive Therapie, welche kurz vor der allogenen HSZT begonnen wird. Diese wird in der Regel auf der Basis eines Calcineurin-Antagonisten, z.B. Ciclosporin, durchgeführt, der die Proliferation und Aktivität von Immunzellen unterdrückt.

1.3.4 Stammzellgewinnung

Nach der Konditionierung kommt es zur eigentlichen Transplantation, wofür Stammzellen des Spenders gewonnen werden müssen. Blutstammzellen sind unspezialisierte Zellen, welche die Potenz zur Bildung ausgereifter hämatopoetischer Zellen fortdauernd behalten.

Diese Stammzellen kann man beim Spender zum Beispiel direkt aus dem Knochenmark gewinnen. Dies ist allerdings mit einer Vollnarkose für den Spender verbunden. Alternativ und ein heutzutage häufiger angewandtes Verfahren ist die Gewinnung der Stammzellen aus dem peripheren Blut des Spenders. Hierfür ist eine „Stammzellmobilisierung“ nötig, die durch einen Wachstumsfaktor bewirkt wird. Der Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierende Faktor (G-CSF) bewirkt, dass die Blutbildung angeregt wird und sich somit die Stammzellen vermehren. Darüber hinaus lösen sich die Stammzellen aus dem Knochenmark und treten vermehrt in den Blutkreislauf ein. Aus dem peripheren Venenblut des Spenders kann man nun die Stammzellen selektieren, was man als Leukapherese bezeichnet (Schmid et al., 2009, S. 208).

Eine weitere Möglichkeit ist die Gewinnung von Stammzellen aus Nabelschnurblut („cord blood“). Die Menge an Stammzellen aus dieser Quelle ist jedoch gering (Schmid et al., 2009, S. 208).

Die gewonnenen Stammzellen werden dem Patienten nun, vergleichbar mit einer Bluttransfusion, in das periphere Blut übertragen, von wo sie dann in das Knochenmark gelangen. Es folgt nun die sogenannte Aplasie-Phase. Sobald das Transplantat angewachsen ist und sich im peripheren Blut wieder ausreichend Leukozyten bzw. auch Granulozyten finden, spricht man vom „Engraftment“. In vielen Zentren wird Engraftment als das Erreichen von mindestens 500 Granulozyten/µL im peripheren Blut definiert. Oftmals spricht man von Leukozytengraftment jedoch auch ab einer Gesamtleukozytenzahl von mindestens 1.000/µL im peripheren Blut. Letztere Definition wird auch in der Klinik für Stammzelltransplantation verwendet.

1.4 Komplikationen nach allogener HSZT

Die allogene HSZT ist eine komplexe Therapieform, die eine intensive Betreuung der Patienten im Transplantationsverlauf sowie eine aufwändige Nachsorge nach sich zieht. Zudem muss mit vielfältigen unerwünschten Nebenwirkungen und Komplikationen gerechnet werden, die im schlimmsten Fall tödlich verlaufen können.

Die transplantationsassoziierte Mortalität von ca. 10 Prozent im ersten Jahr der Transplantation ist im Vergleich zur Mortalität bei einer konservativen Leukämietherapie ausschließlich mit Chemotherapie deutlich höher (Braess et al., 2009, S. 35). Die allogene HSZT hat jedoch einen stärkeren kurativen bzw. antileukämischen Effekt.

In der Zeit der Knochenmarkaplasie ist das Risiko infektiöser Komplikationen besonders hoch (Rödel, 2012).

Auch die GvHD, bei der sich die Spenderimmunzellen gegen Körpergewebe des Patienten richten, stellt eine ernst zu nehmende Komplikation dar. Diese Reaktion kann in unterschiedlichen Schweregraden verlaufen. Betroffen sind die Haut, der Gastrointestinaltrakt oder die Leber. Das Risiko einer akuten GvHD wird bei einem HLA-identischen Geschwisterspender auf 30 bis 40 Prozent der Fälle eingeschätzt (Schmid et al., 2009, S. 218).

Von einer akuten GvHD spricht man, wenn die Reaktion vor dem 100. Tag nach der HSZT eintritt. Bei einem späteren Beginn spricht man von der chronischen GvHD. Diese kann sich direkt aus der akuten GvHD entwickeln. Möglich ist jedoch auch, dass sie nach einer beschwerdefreien Phase oder auch ohne vorangegangene akute GvHD auftritt (Schmid, 2009, S. 218). Eine chronische GvHD tritt besonders häufig z.B. bei vorangegangener akuter GvHD, höherem Lebensalter von Spender oder Empfänger, HLA-Inkompatibilität und einer zweiten HSZT auf (Mumm, 2008).

1.5 Therapeutische Möglichkeiten bei einem Rezidiv nach allogener HSZT

Trotz erfolgter allogener HSZT kann es zu einem Rezidiv der Erkrankung kommen (Abb. 7). Die betroffenen Patienten haben eine sehr ungünstige Prognose, vor allem, wenn sich das Rezidiv innerhalb der ersten sechs Monate nach einer allogenen HSZT entwickelt (Hänel, 2008).

Umso wichtiger ist die Therapie dieser Patienten.

Es besteht die Möglichkeit, dem Patienten in dieser Situation Donorlymphozyten („donor lymphocyte infusion“, DLI) zu infundieren. Davon erhofft man sich eine weitere immunologische Bekämpfung der verbliebenen Leukämiezellen durch die Donorzellen. Man nutzt den Graft-versus-Leukämie-Effekt. Bei Patienten mit einer AML ist durch eine DLI-Gabe jedoch nur in wenigen Fällen eine längerfristige Krankheitsfreiheit zu erzielen (Hänel, 2008).

Eine neuere Option stellt die Kombination demethylierender Medikamente mit Donorlymphozyten dar. Ferner können Zytostatika mit Donolymphozyten kombiniert werden (Hänel, 2008).

Vor allem für jüngere Patienten mit einem AML-Rezidiv nach erster allogener HSZT kann sich die Option einer zweiten allogenen HSZT anbieten. Hier kommt sowohl der Spender der ersten Transplantation, als auch ein differenter Donor in Frage. Allerdings ist die transplantations-assoziierte Mortalität bei einer Zeittransplantation höher, so dass diese Option nur im Einzelfall zum Tragen kommt (Hänel, 2008).

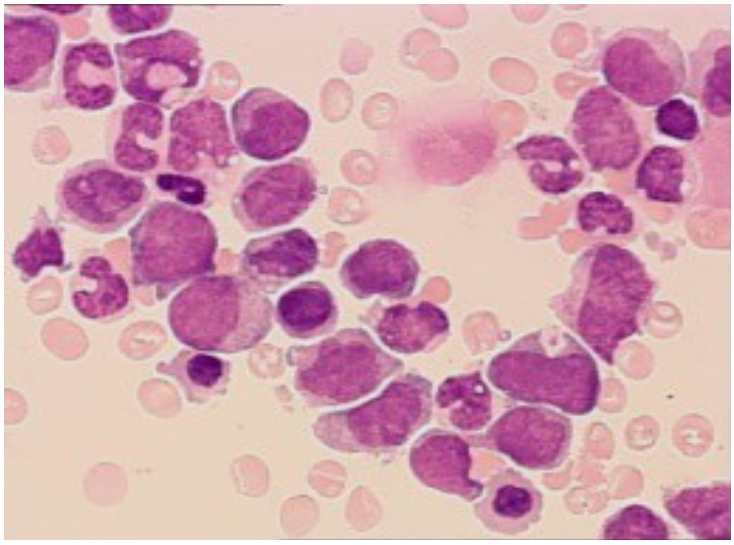


Abbildung 7: Nachweis eines Rezidivs; Blastenvermehrung in der Verlaufskontrolle bei einem Patienten mit AML in der Knochenmark-Zytomorphologie (Prof. Dr. Dr. Torsten Haferlach, MLL Münchner Leukämielabor)

1.6 Nachsorge nach allogener HSZT - Zellularität, Blasten und Dysplasie

Vor allem im ersten Jahr, aber auch darüber hinaus, sind nach der allogenen HSZT regelmäßige Nachuntersuchungen notwendig. Unter anderem ist das Ziel dieser Kontrollen, ein drohendes Rezidiv möglichst frühzeitig zu erkennen.

Bei den ambulanten Wiedervorstellungen sind regelmäßige Blutbildkontrollen erforderlich, in größeren Abständen wird auch eine Knochenmarkpunktion durchgeführt. Knochenmarkpunktionen erfolgen in der Regel aus dem Beckenkamm. So können die verschiedenen hämatologischen Reihen im Knochenmark beurteilt werden, wobei für die Diagnose und Kontrolle einer AML in der Regel eine Knochenmarkaspiration ausreicht. Im Unterschied zur Analyse der Blutwerte ermöglicht die Knochenmarkpunktion auch eine Beurteilung der hämatopoetischen Vorläuferzellen, weshalb sie auch in der

Nachsorge stammzelltransplantierter Patienten eingesetzt wird.
Bei der mikroskopischen Untersuchung von Knochenmarkgewebe bei Patienten mit gesicherter/gesichertem oder vermuteter/vermutetem AML bzw. MDS oder aber auch im Verlauf der Erkrankung wird zunächst auf die Gesamtzellularität und die Zellularität der einzelnen Blutzelllinien - Granulopoese, Erythropoese und Megakaryopoese - geachtet. Dabei sind vor allem die Erkrankung, das aktuelle Krankheitsstadium und das Alter des Patienten zu berücksichtigen (Tuzuner et al., 1994b). Mit zunehmendem Alter nimmt die Zellularität im Knochenmark ab. Die Gesamtzellularität im Knochenmark lässt sich am besten in der Übersichtsvergrößerung erfassen (x10). Im Falle eines hypozellulären Knochenmarks kommt es zu einer Reduktion der Hämatopoese-haltigen Areale durch eine Zunahme des Fettmarks in den ausgestrichenen Arealen. In den Bröckeln kann sich eine verminderte Zellularität durch eine bessere Sichtbarkeit des Knochenmarkstromas äußern, und die Zellen normaler Hämatopoese sind reduziert. Bei gesteigerter Zellularität sind in den ausgestrichenen Arealen die Anteile von Fettmark reduziert, und die Bröckel sind „gepackt voll“ mit Zellen.
Hinsichtlich der Megakaryopoese sieht man normalerweise in der Übersichtsvergrößerung in einem Blickfeld 4-6 Zellen. Die Granulopoese zur Erythropoese verhält sich normalerweise im Verhältnis 2:1 bis 3:1.
Außerdem wertet man den Anteil von Blasten aus, welcher im gesunden Knochenmark unter 5 Prozent liegt (Cheson et al., 2003). Der Prozentanteil an Blasten wird auf alle kernhaltigen Zellen im Knochenmark bezogen.
Oftmals bereitet jedoch die Abgrenzung reaktiver Blastenvermehrungen, z.B. bei Infektionen, von einer Blastenvermehrung bei beginnendem Rezidiv Probleme (Steiger, 2008). Somit kann es ratsam sein, bei einer grenzwertigen Blastenvermehrung (um 5%) im Knochenmark eine enge Verlaufskontrolle anzustreben.
Darüber hinaus gilt es bei der mikroskopischen Untersuchung der Knochenmarkproben auf Dysplasien zu achten.
Zeichen einer Dysplasie in der Granulopoese sind neben einem hypogranulierten Zytoplasma u.a. hyposegmentierte Zellkerne (sogenannte Pseudo-Pelger-Zellen, Abb. 8), bizarr segmentierte Zellkerne, eine gestörte

Kern-Plasma Relation und größenveränderte Stabkernige (sog. Riesenstäbe). Dysplasien in der Erythropoese zeigen sich durch megaloblastoide Veränderungen, Karyorrhexis (Abb. 9), eine gestörte Kern-Plasma Relation und andere Zellkern-Unregelmäßigkeiten bzw. Zellkern-Fragmentationen. Mikromegakaryozyten (Abb. 10), große Megakaryozyten mit nicht-gelappten Zellkernen und Zellkernvervielfältigungen zählen zu den Dysplasiezeichen in der Megakaryopoese (Brunning et al., 2008, S. 90).

Die Dysplasie hämatopoetischer Zellen ist vor allem für das MDS charakteristisch. Für die Festlegung des Charakteristikums „Dysplasie“ gilt für die Diagnose eines MDS ein Anteil von mindestens 10 Prozent dysplastischer Zellen in einer Zellreihe als notwendig (Brunning et al., 2008, S. 90). Zu beachten ist jedoch, dass die Dysplasie hämatopoetischer Zellen auch durch andere Einflüsse, wie knochenmarktoxische Medikamente, ausgelöst werden kann. Als Beispiele sind hier gerade für die spezifische Situation der Posttransplantationsphase Virustatika und Immunsuppressiva zu nennen.

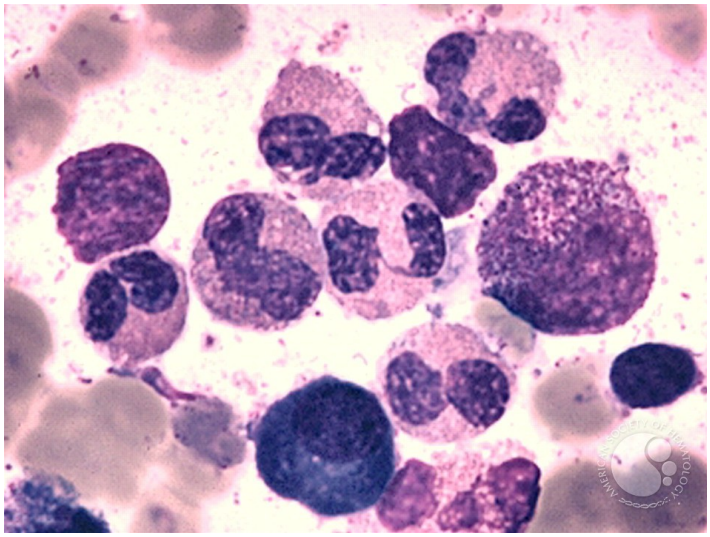


Abbildung 8: Pseudo-Pelger-Zellen bei einem Fall von MDS (Maslak und McKenzie, 2002a)

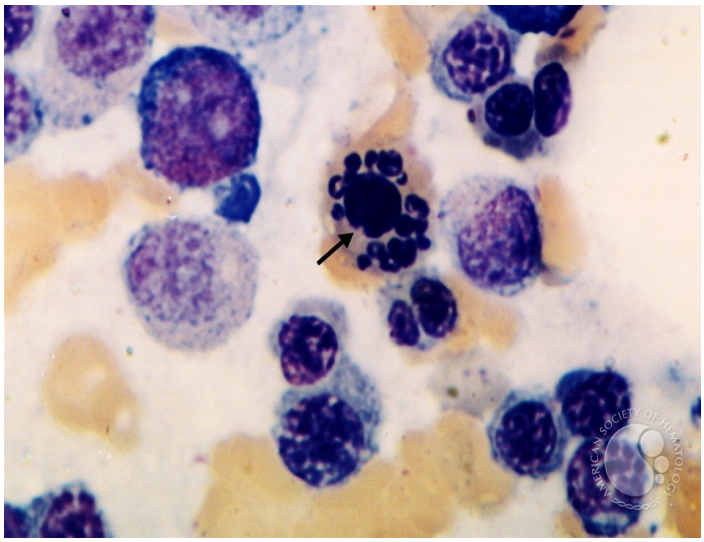


Abbildung 9: Karyorrhexis in einer erythropoetischen Vorläuferzelle bei MDS (Fradera, 2008)

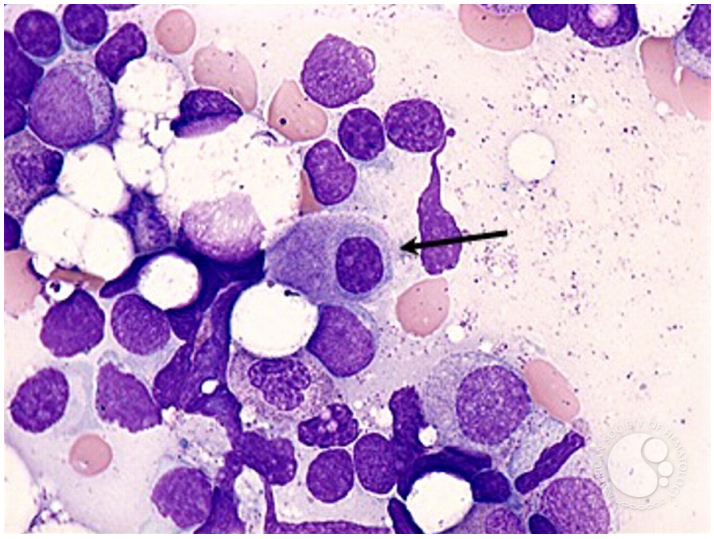


Abbildung 10: Mikromegakaryozyt mit rundem Einzelkern bei MDS (Maslak, 2002b)

1.7 Stammzelltransplantation am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Die Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) ist eines der wichtigsten und größten Zentren für allogene HSZT in Deutschland und Europa.
Jährlich werden hier ca. 185 Patienten stammzelltransplantiert. Zunächst unter der Leitung von Prof. Dr. med. A. Zander, anschließend unter dem heutigen Klinikdirektor Prof. Dr. med. N. Kröger wurden seit 1990 über 2.000 Stammzelltransplantationen vom Fremd- oder Familienspender durchgeführt.
Die pädiatrische Seite der allogenen Stammzelltransplantation wird von Prof. Dr. med. I. Müller geleitet (früher: Prof. Dr. med. R. Erttmann und Prof. Dr. H. Kabisch).
Die Transplantationsnachsorge bei Kindern wird in der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie im UKE unter Einbezug weiterer Fach- und Oberärzte durchgeführt.
Langjährige Erfahrungen, intensive Forschungstätigkeiten sowie hohe Qualitätsstandards und ein multidisziplinäres engagiertes Team sorgen für eine hohe Patientenzufriedenheit (Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, 2013).
Forschungsschwerpunkte sind u.a. die allogene HSZT bei Patienten mit Myelofibrose, MDS und Multiplem Myelom.

1.8 Design der Studie

Als kurative Behandlungsmöglichkeit für Patienten mit einer AML oder einem MDS steht generell eine allogene HSZT zur Verfügung. Nach einer HSZT besteht allerdings immer noch das Risiko eines Rezidivs, weshalb regelmäßige Knochenmarkpunktionen durchgeführt werden, um dieses frühzeitig zu erkennen. Auch wenn diese Diagnostik ein Routineverfahren ist, gibt es bisher nur wenige systematische Untersuchungen dazu, ob die Zytomorphologie einen

Stellenwert nicht nur zur Rezidivfeststellung, sondern auch zur Prädiktion eines Rezidivs hat.
Prinzipiell sind die Gesamtzellularität, die Zellularität in den drei hämatopoetischen Reihen (Granulopoese, Erythropoese und Megakaryopoese) sowie die Dysplasie in den einzelnen hämatologischen Reihen Parameter, welche vor der klinischen Manifestation eines Rezidivs verändert sein könnten.
Die vorliegende Arbeit prüft, ob die Analyse der Zellularität (reduziert, normal und erhöht) und der Ausprägungsgrad beim Auftreten von Dysplasien entscheidende Hinweise auf eine Rezidiventstehung nach der allogenen HSZT liefern können. Dies wurde retrospektiv an den Patienten der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation am UKE geprüft. Für die zytomorphologische Auswertung wurden die mikroskopischen Knochenmarkpräparate von 145 Patienten mit AML und MDS, die von Januar 2005 bis April 2010 transplantiert wurden, hinsichtlich dieser Kriterien untersucht. Einbezogen wurden die Punktionen am 30. und 100. Tag nach erfolgter allogener HSZT. Die Ergebnisse der zytomorphologischen Auswertung wurden dann mit den klinischen Verläufen der Patienten korreliert.

2. Material und Methoden

2.1 Einschlusskriterien

In die Analyse werden Patienten mit der Diagnose einer AML oder einem MDS, die von Januar 2005 bis April 2010 in der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation am UKE transplantiert wurden, eingeschlossen.
Es gilt zu bemerken, dass 35-50% der Patienten mit einer AML oder mit einem MDS transplantierten Patienten ein Rezidiv der Grunderkrankung in der Posttransplantationsphase entwickeln. In der Mehrheit der Fälle entwickeln die Patienten das Rezidiv in den ersten zwei Jahren post-transplant, wobei auch Spätrezidive möglich sind.
Außerdem muss die Knochenmarkzytomorphologie von mindestens einem

Zeitpunkt nach allogener HSZT - am Tag 30 (mit einem Spielraum von 7 Tagen) und/oder am Tag 100 (mit einem Spielraum von 14 Tagen) - zur Verfügung stehen. Des Weiteren dürfen bei diesen Patienten nach allogener HSZT die Blasten im Knochenmark einen Anteil von 5 Prozent nicht überschreiten („blast clearance"; Cheson et al., 2003).
Patienten mit einer persistierenden Erkrankung oder einem Frührezidiv, die am Tag 30 mehr als 5 Prozent Myeloblasten im Knochenmark aufweisen, werden ausgeschlossen. Bei Patienten, die einen Rückfall zwischen Tag 30 und Tag 100 entwickelten, wurde nur der Tag 30 ausgewertet. Wir bezogen außerdem in die Analyse nur Patienten mit gelungener Knochenmarkaspiration und Vorhandensein von Bröckeln auf den Ausstrichen ein.

2.2 Zytomorphologie

Die Zytomorphologie wurde anhand von Knochenmarkaspiraten ausgewertet, die in der May-Grünwald-Giemsa Technik gefärbt wurden. Dabei wurde zum einen die gesamte Zellularität des Aspirats beurteilt, zum anderen die Zellularität der verschiedenen hämatopoetischen Reihen (Granulopoese, Erythropoese und Megakaryopoese). Es wurden die Kategorien reduzierte, normale oder gesteigerte Zellularität vergeben (Tuzuner und Bennett, 1994a), wobei das Alter der Patienten berücksichtigt wurde (Tuzuner et al., 1994b).

Außerdem wurde die Dysplasie in den hämatopoetischen Reihen Granulopoese, Erythropoese und Megakaryopoese nach den Kriterien von Goasguen et al. (1992) und der WHO (Brunning et al., 2008) beurteilt.
Als Dysplasiekriterien waren u.a. folgende zu nennen: hypogranuliertes Zytoplasma, Pseudo-Pelger-Zellen, bizarr segmentierte Zellkerne, eine gestörte Kern-Plasma Relation und größenveränderte Stabkernige (sog. Riesenstäbe) in der Granulopoese, sowie megaloblastoide Veränderungen, Karyorrhexis, Zellkern-Fragmentationen, Zytoplasmabrücken und eine gestörte Kern-Plasma Relation in der Erythropoese, ferner Mikromegakaryozyten, große

Megakaryozyten mit nicht-gelappten Zellkernen und Zellkernvervielfältigungen in der Megakaryopoese (Brunning et al., 2008, S. 90).

Für die Einstufung einer dysplastischen Zelllinie wurde zunächst eine Schwelle von 10 Prozent, dann von 50 Prozent dysplastischer Zellen gesetzt. Das Vorhandensein von mindestens 10 Prozent dysplastischen Zellen wurde als erster Grenzwert gesetzt, da dies der Grenzwert für das Kriterium „Dysplasie“ beim MDS darstellt. In einem zweiten Ansatz wurden 50 Prozent dysplastische Zellen als Grenzwert gewählt, um zu prüfen, ob die Wahl eines höheren Schwellenwerts zu einer stärkeren Beeinflussung der Prognose führt.
In jeder Knochenmarkprobe wurden 200 kernhaltige Zellen ausgewertet.
Knochenmarkaspirate, in denen die Dysplasie aufgrund geringer Zellularität nicht in mindestens zwei hämatopoetischen Linien ausgewertet werden konnte, wurden als „nicht-informativ“ eingestuft.
Die zytomorphologische Befundung wurde unter Verblindung der Untersucher im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt.

2.3 Weitere Definitionen

Das zytogenetische Risikoprofil der AML-Patienten wurde nach den Kriterien des Medical Research Council (MRC) bestimmt. Die Patienten wurden in die Risikogruppen günstig, intermediär, und ungünstig eingeteilt (Grimwade et al., 2010). Die zytogenetischen Risikoprofile der MDS-Patienten wurden nach dem IPSS bestimmt; auch hier erfolgte eine Einteilung in die Gruppen günstig, intermediär, und ungünstig (Greenberg et al., 1997). Somit erfolgte die Zuordnung zu einer zytogenetischen Risikogruppe für beide Patientengruppen (AML und MDS) in dieser Arbeit nach getrennten Kriterien, entsprechend den Klassifikationssystemen für die jeweilige Entität (MRC für AML, IPSS für MDS).

Die Konditionierungsintensität (myeloablativ, MAC versus dosisreduziert, RIC) wurde entsprechend den Richtlinien der European Group for Blood and Marrow

Transplantation (EBMT) definiert (EBMT, 2013, S. 128ff.).

Mit Hilfe der Kriterien von Glucksberg et al. (1974) wurde eine akute GvHD in vier Schweregrade eingeteilt.
Trat bei einem Patienten nach allogener HSZT eine chronische GvHD auf, wurde sie in „begrenzt“ („limited“) oder „ausgeprägt“ („extensive“) eingeteilt (Shulman et al., 1980).

2.4 Datenerfassung und Statistik

Die Patienteninformationen stammen aus Akten der Stations- und Ambulanzarchive der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation am UKE. Des Weiteren wurden die krankenhauseigenen elektronischen Krankenakten „Soarian“ der Patienten ausgewertet. Im Rahmen ihrer Einverständniserklärung zur allogenen HSZT gaben die Patienten auch ihre Zustimmung zur wissenschaftlichen Auswertung der Transplantationsdaten.
Kategorische Variablen wurden mit Hilfe des χ^2-Tests verglichen. Das Gesamtüberleben („overall survival“, OS) und das ereignisfreie Überleben („event-free survival“, EFS) wurden mit der Kaplan-Meier Methode bestimmt. Der Vergleich des OS wurde anhand des log-rank Tests durchgeführt. Für die statistische Auswertung wurde SPSS in der Version 18.0 (IBM, New York, USA) verwendet. Für die ermittelten p-Werte galt ein Signifikanzlevel von 0,05.

3. Ergebnisse

3.1 Patientencharakteristika

Ausgewertet wurden die Knochenmarkaspirate von insgesamt 145 Patienten im Alter zwischen 16 und 72 Jahren (Median 54,6 Jahre) aus, welche an einer AML (n=111) oder an einem MDS (n= 34) litten.

Zwischen Tag 30 und Tag 100 erlitten 15 Patienten ein Rezidiv ihrer Erkrankung, so dass sie aus der Auswertung am Untersuchungstag 100 ausgeschlossen werden mussten (für die Analyse wurden nur Patienten in hämatologischer kompletter Remission berücksichtigt).

81 Patienten (55,9 %) waren männlichen, 64 (44,1 %) weiblichen Geschlechts.

134 Patienten (92,4 %) erhielten eine erste allogene HSZT, 10 (6,9 %) eine zweite und ein Patient (0,7 %) die dritte Transplantation. Alle Patienten erhielten ihre Transplantation bzw. Transplantationen im Zeitraum Januar 2005 bis April 2010 am UKE.

Daten zum zytomorphologischen Remissionsstatus im Knochenmark vor Transplantation waren von 106 Patienten vorhanden: für 98/111 Patienten mit AML und für 8/34 mit MDS. 56 (52,8 %) der 106 Patienten mit bekanntem Remissionsstatus befanden sich unmittelbar vor der allogenen HSZT in kompletter Remission, 50 Patienten (47,2 %) erreichten keine komplette Remission vor der Transplantation.

Der Karyotyp war bei 139 Patienten bekannt. Bei den Patienten mit AML hatten nach MRC-Kriterien 7 (5,0%) einen günstigen Karyotyp, 64 (46,0%) einen intermediären und 35 (25,2%) einen ungünstigen Karyotyp (Grimwade et al., 2010). Bei den Patienten mit MDS hatten nach IPSS-Kriterien (Greenberg et al., 1997) keiner einen günstigen, 27 (19,4%) einen intermediären und 6 (4,3%) einen ungünstigen Karyotyp. Fasste man unter Berücksichtigung der verschiedenen zytogenetischen Klassifikationssysteme für die Patienten mit AML (welche nach MRC Kriterien klassifiziert wurden) und die Patienten mit MDS (welche nach IPSS klassifiziert wurden), beide Patientengruppen zusammen, hatten insgesamt 7 Patienten (5,0 %) einen prognostisch günstigen, 91 (65,5 %) einen intermediären und 41 Patienten (29,5 %) einen

ungünstigen Karyotyp.

Tabelle 1: Darstellung der Patientencharakteristika

Parameter	**n (%)**
Patientenanzahl gesamte Kohorte	145
Biologische Charakteristika	
Alter der Patienten	16,8 bis 72,7 Jahre
Medianes Alter der Patienten	54,6 Jahre
Anzahl der allogenen HSZT pro Patient	
1. HSZT	134 (92,4 %)
2. HSZT	10 (6,9 %)
3. HSZT	1 (0,7 %)
Entitäten	
Patienten mit AML	111
Patienten mit MDS	34
Remisssionsstatus vor allogener HSZT	
Remissionsstatus bekannt	106 (100,0 %)
komplette Remission	56 (52,8 %)
keine komplette Remission	50 (47,2 %)
Zytogenetische Risikogruppe	
Karyotyp bekannt	139 (100,0 %)
Günstig	7 (5,0 %)
Intermediär	91 (65,5 %)
Ungünstig	41 (29,5 %)

Die Patienten mit einer AML (n=111) zeigten in 73 Fällen (65,8 %) eine neu aufgetretene AML (de novo), 38 Patienten (34,2 %) hatten eine s-AML nach chronischen myeloischen Neoplasien.

Das Krankheitsstadium war bei 106 Patienten mit einer AML bekannt; 70 AML-Patienten (66,0 %) befanden sich vor der allogenen HSZT in der Erstmanifestation, 29 (27,4 %) im ersten Rezidiv und sieben AML-Patienten (6,6 %) im zweiten Rezidiv der Erkrankung.
Die morphologischen FAB-Subtypen waren bei 95 AML-Patienten bekannt; M0: n=6 (6,3 %), M1: n=22 (23,2 %), M2: n=32 (33,7 %), M4: n=12 (12,6 %), M4eo: n=5 (5,3 %), M5: n=6 (6,3 %), M5a: n=8 (8,4 %), M5b: n=3 (3,2 %), M7: n=1 (1,1 %).

Die 34 MDS-Patienten waren wie folgt zu klassifizieren: drei Patienten (8,8 %) hatten eine refraktäre Anämie (RA), ein Patient (2,9 %) eine refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS), vier Patienten (11,8 %) eine refraktäre Zytopenie mit Mehrliniendysplasie (RCMD), sechs Patienten (17,6 %) eine refraktäre Anämie mit Blastenexzess (RAEB-1), fünfzehn (44,1 %) eine RAEB-2 und fünf Patienten (14,7 %) eine chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML).

Tabelle 2: Darstellung weiterer Erkrankungscharakteristika

Parameter	**n (%)**
AML-Genese	
Genese bekannt	111 (100,0 %)
de novo AML	73 (65,8 %)
sekundäre AML	38 (34,2 %)
Stadium der AML vor Transplantation	
Stadium bekannt	106 (100,0 %)
Erstmanifestation	70 (66,0 %)
1. Rezidiv	29 (27,4 %)
2. Rezidiv	7 (6,6 %)
FAB-Subtypen der AML	
FAB bekannt	95 (100,0 %)
AML M0	6 (6,3 %)

Parameter	n (%)
AML M1	22 (23,2 %)
AML M2	32 (33,7 %)
AML M4	12 (12,6 %)
AML M4eo	5 (5,3 %)
AML M5	6 (6,3 %)
AML M5a	8 (8,4 %)
AML M5b	3 (3,2 %)
AML M7	1 (1,1 %)
MDS-Subtypen	
Subtyp bekannt	34 (100,0 %)
RA	3 (8,8 %)
RARS	1 (2,9 %)
RCMD	4 (11,8 %)
RAEB-1	6 (17,6 %)
RAEB-2	15 (44,1 %)
CMML	5 (14,7 %)

3.2 Transplantationscharakteristika

Stammzellquelle waren periphere Blutstammzellen in 138 Fällen (95,8 %), wohingegen vier Patienten (2,8 %) Knochenmark erhielten. Zwei Patienten (1,4 %) erhielten „cord blood“. Der Spendertyp war bei 144 Patienten bekannt.
32 (22,9 %) Patienten erhielten eine HSZT vom verwandten Spender, 108 (77,1 %) hatten einen unverwandten Spender.
Angaben zur HLA-Konstellation waren für 144 Transplantationen vorhanden. 88 Patienten (61,1 %) erhielten eine HLA-passende HSZT. Eine HLA-mismatch-Konstellation fand sich bei 56 Transplantationen (38,9 %).
83 Spender (58,0 %) waren männlich, 58 (40,6 %) weiblich.
Die Spender waren in 86 von 141 Fällen (61,0 %) geschlechtsident. Von vier Spendern war das Geschlecht nicht bekannt, hierbei diente zweimal „cord blood“ als Stammzellspende.

Patient und Spender hatten in 32 Fällen (22,2 %) kein Zytomegalie-Virus (CMV), d.h. sie waren CMV-negativ. In 76 Fällen (52,8 %) waren Spender und Empfänger CMV-positiv. In 16 Fällen (11,1 %) waren die Spender CMV-positiv, die Patienten jedoch CMV-negativ; in 20 Fällen (13,9 %) waren umgekehrt die Spender CMV-negativ und die Patienten CMV-positiv. In einem Fall lag der CMV-Status nicht vor.

Insgesamt gab es bei 60 von 141 evaluierbaren Fällen (42,6 %) eine Blutgruppenübereinstimmungen zwischen Spender und Empfänger.

Eine MAC erhielten 44 (31,0 %), eine RIC 98 Patienten (69,0 %). Von drei Patienten standen diese Daten nicht zur Verfügung.

Zusätzlich bekamen 35 von 144 auswertbaren Patienten (24,3 %) eine Ganzkörperbestrahlung im Rahmen der Konditionierung.

Von 143 Patienten, bei welchen die Daten vorlagen, erhielten 89 (62,2 %) Antithymozytenglobulin.

Eine schwere akute GvHD (Grade II bis IV) bekamen 50 von 144 Patienten (34,7 %) mit vorhandenen Daten. 52 von 138 evaluierbaren Patienten (37,7 %) erlitten eine chronische GvHD.

Tabelle 3: Darstellung der Transplantationscharakteristika

Parameter	**n (%)**
Donortyp	
Spendertyp bekannt	140 (100,0 %)
verwandter Spender	32 (22,7 %)
unverwandter Spender	108 (77,1 %)
Geschlecht bekannt	141 (100,0 %)
Männlich	83 (58,0 %)
Weiblich	58 (40,6 %)
Alter der Spender	19,1 bis 78,2 Jahre
Medianes Alter der Spender	40,4 Jahre
Stammzellquelle	
Stammzellquelle bekannt	144 (100,0 %)

Parameter	n (%)
peripheres Blut	138 (95,8 %)
Knochenmark	4 (2,8 %)
Nabelschnurblut	2 (1,4 %)
HLA-Kompatibilität	
HLA-Konstellation bekannt	144 (100,0 %)
HLA match	88 (61,1 %)
HLA mismatch	56 (38,9 %)
Intensität der Konditionierung	
Konditionierungsintensität bekannt	142 (100,0 %)
Myeloablativ (MAC)	44 (31,0 %)
Dosisreduziert (RIC)	98 (69,0 %)
Ganzkörperbestrahlung bekannt	144 (100,0 %)
Ganzkörperbestrahlung erhalten	35 (24,3 %)
GVHD	
Akute GvHD bekannt	144 (100,0 %)
Akute GvHD (Grade II bis IV)	50 (34,7 %)
Chronische GvHD bekannt	138 (100,0 %)
Chronische GvHD	52 (37,7 %)

3.3 Zellularität nach allogener HSZT

Knochenmarkaspirate standen am Tag 30 nach der Transplantation von 91 der insgesamt 145 Patienten (62,8 %) zur Verfügung. Für den Tag 100 nach allogener HSZT waren die Knochenmarkaspirate von noch 130 der 145 Patienten auswertbar, da 15 Patienten zwischen Tag 30 und Tag 100 ein Rezidiv erlitten hatten und aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden mussten.

Ein Knochenmarkaspirat am Tag 100 nach allogener HSZT war in 99 der 130 Fälle (76,2 %) vorhanden.

3.3.1 Zellularität am Untersuchungstag 30 nach allogener HSZT

Die Gesamtzellularität konnte in 90 von 91 Fällen am Tag 30 nach allogener HSZT ausgewertet werden. Eine normale Zellularität war bei 41 (45,6 %), eine reduzierte Zellularität bei 31 (34,4 %) und eine gesteigerte Zellularität bei 18 (20,0 %) dieser 90 Patienten zu beobachten.
Die Zellularität in der Granulopoese war normal bei 42 (47,2 %), reduziert bei 29 (32,6 %) und gesteigert bei 18 (20,2 %) von 89 hierzu auswertbaren Patienten. In der Erythropoese war die Zelldichte normal bei 40 (44,9 %), reduziert bei 41 (46,1 %) und gesteigert bei acht (9,0 %) dieser 89 Patienten. Die Zellularität in der Megakaryopoese war normal bei 26 (29,2 %), reduziert bei 44 (49,4 %) und gesteigert bei 19 (21,3 %) der 89 Patienten.

3.3.2 Zellularität am Untersuchungstag 100 nach allogener HSZT

Am Tag 100 nach allogener HSZT konnte eine normale Zellularität bei 45 (53,6 %), eine reduzierte Zelldichte bei 33 (39,3 %) und eine gesteigerte Zellularität bei sechs (7,1 %) von 84 Patienten beobachtet werden. Die Zellularität in der Granulopoese war normal bei 42 (50,0 %), reduziert bei 36 (42,9 %) und gesteigert bei sechs (7,1 %) dieser 84 Patienten. In der Erythropoese war die Zelldichte normal bei 39 (46,4 %), reduziert bei 26 (31,0 %) und gesteigert bei 19 (22,6 %) der 84 Patienten. Die Zellularität in der Megakaryopoese war normal bei 35 (41,7 %), reduziert bei 34 (40,5 %) und gesteigert bei 15 (17,9 %) der 84 Patienten.

Tabelle 4: Darstellung der Zellularität

Parameter	**n (%)**
Tag 30 nach allogener HSZT	
Patientenanzahl	145 (100,0 %)

Parameter	**n (%)**
Knochenmarkaspirate vorhanden	91 (62,8 %)
Gesamtzellularität auswertbar	90 (100,0 %)
Gesamtzellularität gesteigert	18 (20,0 %)
Gesamtzellularität normal	41 (45,6 %)
Gesamtzellularität reduziert	31 (34,4 %)
Zellularität in einzelnen Zellreihen auswertbar	89 (100,0 %)
Granulopoese gesteigert	18 (20,2 %)
Granulopoese normal	42 (47,2 %)
Granulopoese reduziert	29 (32,6 %)
Erythropoese gesteigert	8 (9,0 %)
Erythropoese normal	40 (44,9 %)
Erythropoese reduziert	41 (46,1 %)
Megakaryopoese gesteigert	19 (21,3 %)
Megakaryopoese normal	26 (29,2 %)
Megakaryopoese reduziert	44 (49,4 %)
Tag 100 nach allogener HSZT	
Patientenanzahl	130 (100,0 %)
Knochenmarkaspirate vorhanden	99 (76,2 %)
Gesamtzellularität und Zellularität in einzelnen Zellreihen auswertbar	84 (100,0 %)
Gesamtzellularität gesteigert	6 (7,1 %)
Gesamtzellularität normal	45 (53,6 %)
Gesamtzellularität reduziert	33 (39,3 %)
Granulopoese gesteigert	6 (7,1 %)
Granulopoese normal	42 (50,0 %)
Granulopoese reduziert	36 (42,9 %)
Erythropoese gesteigert	19 (22,6 %)
Erythropoese normal	39 (46,4 %)
Erythropoese reduziert	26 (31,0 %)
Megakaryopoese gesteigert	15 (17,9 %)
Megakaryopoese normal	35 (41,7 %)
Megakaryopoese reduziert	34 (40,5 %)

3.4 Dysplasie nach allogener HSZT

3.4.1 Dysplasie am Untersuchungstag 30 nach allogener HSZT

Anhand der Kriterien der WHO (Brunning et. al., 2008) und der Kriterien von Goasguen et. al. (1992) wurde eine Bewertung der Dysplasie in den verschiedenen hämatologischen Reihen durchgeführt.

Am Tag 30 nach allogener HSZT wurden dysplastische Merkmale in ≥10 Prozent der Zellen am häufigsten in der Megakaryopoese bei 29 von 55 auswertbaren Patienten (52,7 %) beobachtet. In der Erythropoese waren dysplastische Merkmale in ≥10 Prozent der Zellen bei 19 von 62 Patienten (30,6 %) vorhanden, in der Granulopoese bei 18 von 70 auswertbaren Fällen (25,7 %).

Mit einer neu festgesetzten Schwelle von ≥50 Prozent dysplastischen Zellen zeigten sich Dysplasien am Tag 30 nach allogener HSZT in der Megakaryopoese bei vier von 55 auswertbaren Patienten (7,3 %). In der Granulopoese fanden sich dysplastische Zellen (≥50 %) bei zwei von 70 Patienten (2,9 %) und in Erythropoese bei einem von 64 auswertbaren Fällen (1,6 %).

Insgesamt konnte man eine Dysplasie am häufigsten in der Megakaryopoese, häufig in der Erythropoese und seltener in der Granulopoese ermitteln.

3.4.2 Dysplasie am Untersuchungstag 100 nach allogener HSZT

Am Tag 100 nach allogener HSZT wurden bei 46 von 70 zur Megakaryopoese auswertbaren Patienten (65,7 %) dysplastische Zellen in ≥10 Prozent der Zellen gefunden. In der Erythropoese zeigten 32 von 72 (44,4 %) und in der Granulopoese 24 von 75 auswertbaren Fällen (32,0 %) dysplastische Merkmale in ≥10 Prozent der Zellen.

Unter Verwendung des Grenzwerts von ≥50 Prozent Zellen zur Definition einer dysplastischen hämatopoetischen Reihe zeigten am Tag 100 nach allogener

HSZT 14 von 70 auswertbaren Patienten (20,0 %) in der Megakaryopoese Dysplasiezeichen. In der Erythropoese zeigte einer von 72 Fällen (1,4 %), ebenso in der Granulopoese einer von 75 (1,3 %) auswertbaren Fällen dysplastische Merkmale in ≥50 Prozent der Zellen.
Insgesamt konnte man auch am Untersuchungstag 100 eine Dysplasie am häufigsten in der Megakaryopoese, häufig in der Erythropoese und seltener in der Granulopoese ermitteln.

Tabelle 5: Darstellung der Dysplasie

Parameter	**n (%)**
Tag 30 nach allogener HSZT	
≥10 % Dysplasie	
Granulopoese auswertbar	70 (100,0 %)
Granulopoese	18 (25,7 %)
Erythropoese auswertbar	62 (100,0 %)
Erythropoese	19 (30,6 %)
Megakaryopoese auswertbar	55 (100,0 %)
Megakaryopoese	29 (52,7 %)
≥50 % Dysplasie	
Granulopoese auswertbar	70 (100,0 %)
Granulopoese	2 (2,9 %)
Erythropoese auswertbar	64 (100,0 %)
Erythropoese	1 (1,6 %)
Megakaryopoese auswertbar	55 (100,0 %)
Megakaryopoese	4 (7,3 %)
Tag 100 nach allogener HSZT	
≥10 % Dysplasie	
Granulopoese auswertbar	75 (100,0 %)
Granulopoese	24 (32,0 %)
Erythropoese auswertbar	72 (100,0 %)
Erythropoese	32 (44,4 %)

Parameter	n (%)
Megakaryopoese auswertbar	70 (100,0 %)
Megakaryopoese	46 (65,7 %)
≥50 % Dysplasie	
Granulopoese auswertbar	75 (100,0 %)
Granulopoese	1 (1,3 %)
Erythropoese auswertbar	72 (100,0 %)
Erythropoese	1 (1,4 %)
Megakaryopoese auswertbar	70 (100,0 %)
Megakaryopoese	14 (20,0 %)

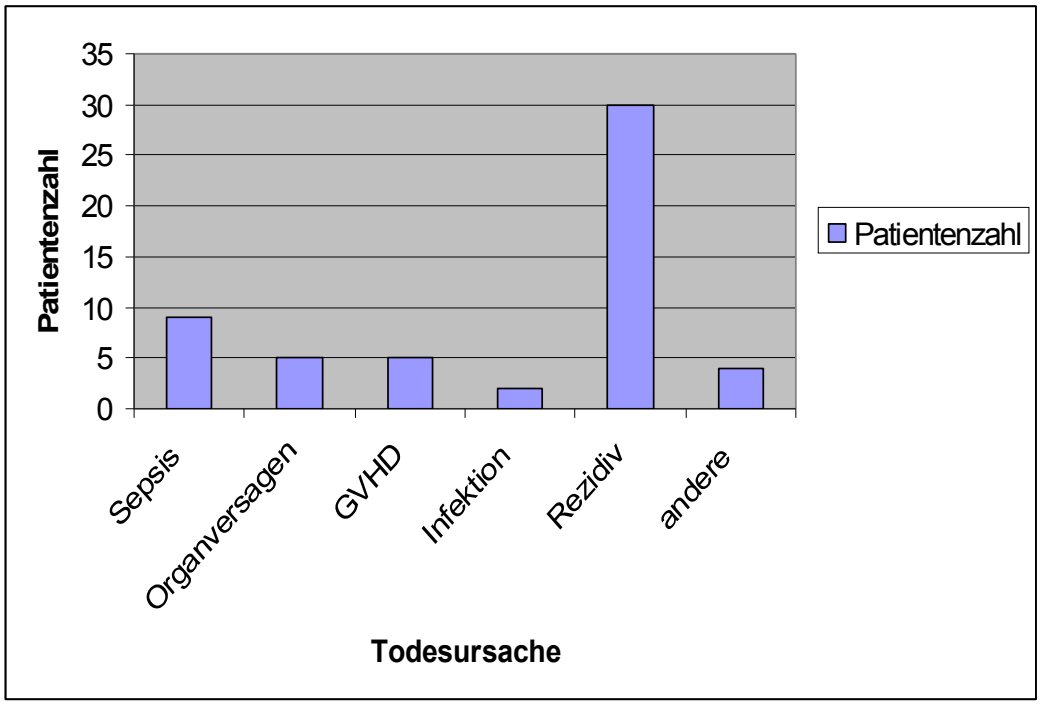
3.5 Klinische Ergebnisse

Die mediane Nachbeobachtungszeit („follow-up“) betrug 14,4 Monate (Minimum: 1,2 Monate, Maximum: 70,2 Monate). Das mediane Gesamtüberleben (OS) betrug 14,4 Monate (Minimum 1,2 Monate; Maximum 70,0 Monate). Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug 16,0 Monate (Minimum 1,2 Monate; Maximum 70 Monate). Es erlitten 38 von 130 Patienten (29,2 %) ein Rezidiv (Intervall zur HSZT: Minimum 1,2 Monate; Maximum 55,3 Monate).

56 von 129 Patienten (43,4 %), deren Krankheitsverlauf analysiert werden konnte, verstarben. Die Todesursache war in 30 Fällen (53,6 %) ein Rezidiv der hämatologischen Grunderkrankung. Transplantationsassoziierte Todesursachen waren in 26 der Fälle (46,4 %) zu verzeichnen.

Bei neun Patienten (16,1 %) führte eine Sepsis, bei fünf Patienten (8,9 %) ein Organversagen, bei weiteren fünf Patienten (8,9 %) eine GvHD, bei zwei Patienten (3,6 %) eine Infektion, bei vier Patienten (7,1 %) eine andere Ursache (z.B. intrazerebrale Blutung, Herz-Kreislauf-Versagen) und bei 30 Patienten (53,6 %) ein Rezidiv zum Tod (Abb. 11). Bei einem Patienten konnte die Todesursache nicht ermittelt werden.

Abbildung 11: Übersicht über die Todesursachen



3.6 Korrelation zwischen der Gesamtzellularität und dem Überleben

In einem weiteren Schritt wurde eine Korrelation der Überlebensdaten mit den zytomorphologischen Parametern durchgeführt. Bezogen auf die Untersuchung am Tag 30 nach allogener HSZT betrug das mediane Überleben bei reduzierter Gesamtzellularität nur 12,5 Monate. Eine gesteigerte Zellularität war mit einem medianen Überleben (OS) von 14,4 Monaten assoziiert. Bestand bei den Patienten eine normale Gesamtzellularität, so wurde das mediane Überleben nicht erreicht (p=n.s.).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei reduzierter Gesamtzellularität 6,8 Monate, bei gesteigerter Zellularität waren es 9,3 Monate, bei normaler Zellularität wurde der Median nicht erreicht (p=0,041, Abb. 12).

Die Gesamtzellularität an Tag 100 nach allogener HSZT zeigte folgende Bezüge: Bei reduzierter und normaler Gesamtzellularität erreichte das

Gesamtüberleben (OS) den Median nicht, bei gesteigerter Zellularität betrug es 28,1 Monate (p=n.s.).

Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei einer reduzierten Gesamtzellularität 29,6 Monate, bei einer gesteigerten Zellularität 27,5 Monate, und bei normaler Zellularität wurde der Median nicht erreicht (p=n.s.).

Die Korrelation zwischen der Gesamtzellularität und dem Überleben ist des Weiteren in Tabelle 6 dargestellt.

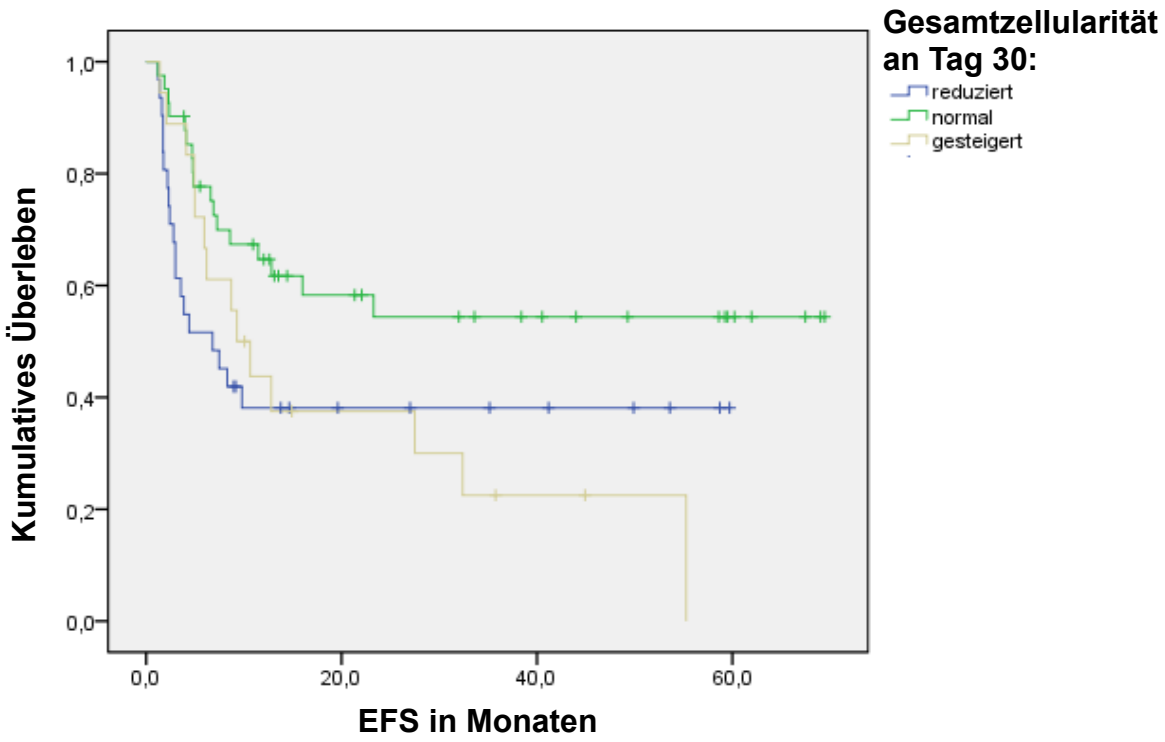


Abbildung 12: Korrelation zwischen der Gesamtzellularität an Untersuchungstag 30 und dem medianen ereignisfreien Überleben (EFS) in der Kaplan-Meier Darstellung

3.7 Korrelation zwischen der Zellularität der Granulopoese und dem Überleben

Das mediane Überleben (OS) betrug in der Untersuchung am Tag 30 nach allogener HSZT bei reduzierter Zellularität in der Granulopoese 12,5 Monate, bei einer gesteigerten Zellularität 28,1 Monate und bei einer normalen Zellularität 23,3 Monate (p=n.s.).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei reduzierter Zellularität in der Granulopoese 6,8 Monate und bei gesteigerter Zellularität 10,7 Monate. Bei normaler Zellularität wurde der Median nicht erreicht (p=n.s.).

Das mediane Überleben (OS) zeigte in den Untersuchungen an Tag 100 nach allogener HSZT bei gesteigerter Zellularität in der Granulopoese 28,1 Monate. Bei reduzierter und normaler Gesamtzellularität erreichte das Gesamtüberleben den Median nicht (p=n.s.).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei einer reduzierten Zellularität in der Granulopoese 29,6 Monate, bei einer gesteigerten Zellularität 27,5 Monate, und bei normaler Zellularität wurde der Median nicht erreicht (p=n.s.).
Die Korrelation zwischen der Zellularität der Granulopoese und dem Überleben ist des Weiteren in Tabelle 6 dargestellt.

3.8 Korrelation zwischen der Zellularität der Erythropoese und dem Überleben

Bezogen auf die Untersuchung am Tag 30 nach allogener HSZT betrug das mediane Überleben (OS) bei reduzierter Zellularität in der Erythropoese 13,0 Monate, bei gesteigerter Zellularität 7,1 Monate und bei normaler Zellularität 28,1 Monate (p=n.s.).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) zeigte bei reduzierter Zellularität in der Erythropoese 8,6 Monate, bei gesteigerter Zellularität 5,9 Monate, bei

normaler Zellularität 27,5 Monate (p=n.s.).
Das mediane Überleben (OS) zeigte in den Untersuchungen an Tag 100 nach allogener HSZT bei reduzierter Zellularität in der Erythropoese 28,1 Monate. Bei gesteigerter und normaler Zellularität erreichte das Überleben den Median nicht (p=0,075).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei einer reduzierten Zellularität in der Erythropoese 27,5 Monate, bei gesteigerter und normaler Zellularität wurde der Median nicht erreicht (p=n.s.).
Die Korrelation zwischen der Zellularität der Erythropoese und dem Überleben ist des Weiteren in Tabelle 6 dargestellt.

3.9 Korrelation zwischen der Zellularität der Megakaryopoese und dem Überleben

Bezogen auf die Untersuchung am Tag 30 nach allogener HSZT betrug das mediane Überleben (OS) bei reduzierter Zellularität in der Megakaryopoese 9,0 Monate, bei gesteigerter Zellularität 28,1 Monate, und bei normaler Zellularität wurde der Median nicht erreicht (p=n.s.).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) zeigte bei reduzierter Zellularität in der Megakaryopoese 6,9 Monate, bei gesteigerter Zellularität 23,3 Monate, und bei normaler Zellularität wurde der Median nicht erreicht (p=0,085).

Die Zellularität der Megakaryopoese an Tag 100 nach allogener HSZT zeigte folgende Bezüge: Bei gesteigerter und normaler Zellularität erreichte das Gesamtüberleben (OS) den Median nicht, bei reduzierter Zellularität betrug es 31,5 Monate (p=0,041, Abb. 13).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei einer reduzierten Zellularität 12,8 Monate, bei gesteigerter und normaler Zellularität wurde der Median nicht erreicht (p=n.s.).
Die Korrelation zwischen der Zellularität der Megakaryopoese und dem Überleben ist des Weiteren in Tabelle 6 dargestellt.

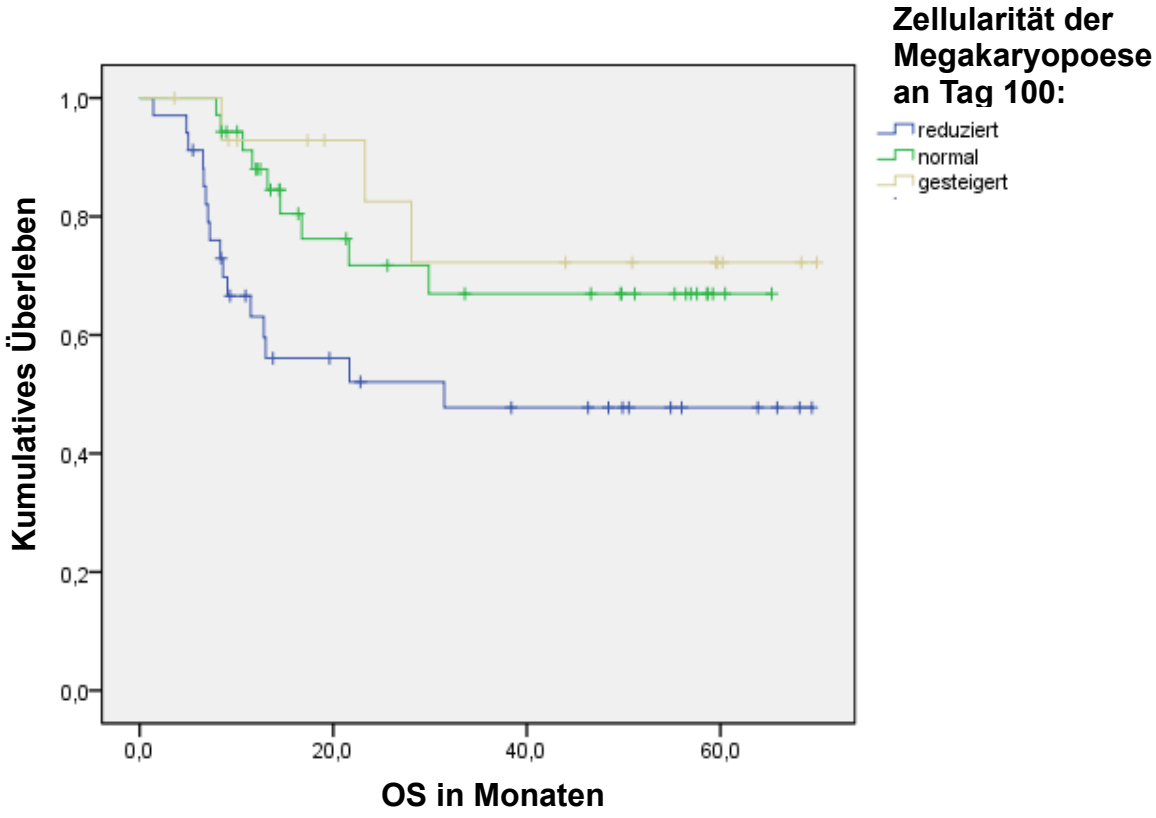


Abbildung 13: Korrelation zwischen der Zellularität in der Megakaryopoese an Tag 100 und dem medianen Überleben (OS) in der Kaplan-Meier Darstellung

	Tag 30					Tag 100				
Parameter	**Patienten-anzahl**	**OS (Monate)**	**p**	**EFS (Monate)**	**p**	**Patienten-anzahl**	**OS (Monate)**	**p**	**EFS (Monate)**	**p**
Gesamtzellularität										
gesteigert	18	14,4	0.114	9,3	**0.041**	6	28,1	0.312	27,5	0.210
normal	41	n.r.		n.r.		45	n.r.		n.r.	
reduziert	31	12,5		6,8		33	n.r.		29,6	
Total	90	20,3		12,8		84	n.r.		n.r.	
Granulopoese										
gesteigert	18	28,1	0.219	10,7	0.106	6	28,1	0.256	27,5	0.190
normal	42	23,3		n.r.		42	n.r.		n.r.	
reduziert	29	12,5		6,8		36	n.r.		29,6	
Total	89	16,8		12,8		84	n.r.		n.r.	
Erythropoese										
gesteigert	8	7,1	0.433	5,9	0.295	19	n.r.	0.075	n.r.	0.149
normal	40	28,1		27,5		39	n.r.		n.r.	
reduziert	41	13,0		8,6		26	28,1		27,5	
Total	89	16,8		12,8		84	n.r.		n.r.	
Megakaryopoese										
gesteigert	19	28,1	0.201	23,3	0.085	15	n.r.	**0.041**	n.r.	0.144
normal	26	n.r.		n.r.		35	n.r.		n.r.	
reduziert	44	9,0		6,9		34	31,5		12,8	
Total	89	16,8		12,8		84	n.r.		n.r.	

Tabelle 6: Korrelation zwischen der Gesamtzellularität und der Zellularität in den drei hämatopoetischen Reihen (Granulopoese, Erythropoese und Megakaryopoese) mit dem Überleben

3.10 Korrelation zwischen der Dysplasie in der Granulopoese und dem Überleben

3.10.1 Korrelation bezogen auf einen Grenzwert von 10 Prozent Dysplasie

In einem weiteren Schritt wurde das Überleben mit den Dysplasiebefunden in den verschiedenen hämatologischen Reihen korreliert. Bei Verwendung eines Grenzwerts von mindestens 10 Prozent dysplastischen Zellen zur Definition von „Dysplasie“ ergaben sich folgende Bezüge am Tag 30 nach allogener HSZT:
Das mediane Überleben (OS) betrug bei Patienten mit Nachweis von Dysplasie in der Granulopoese 28,1 Monate im Vergleich zu 16,8 Monaten bei Patienten ohne Dysplasie in der Granulopoese (p=n.s.).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei Patienten ohne Dysplasie in der Granulopoese 12,8 Monate, bei Nachweis von Dysplasie wurde der Median nicht erreicht (p=n.s.).

Bezogen auf die Untersuchung am Tag 100 nach allogener HSZT betrug das mediane Überleben (OS) bei Patienten mit Dysplasie in der Granulopoese 28,1 Monate, bei Patienten ohne Dysplasie erreichte das Gesamtüberleben den Median nicht (p=n.s.).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei Patienten mit Dysplasie in der Granulopoese 27,5 Monate, bei Patienten ohne Dysplasie wurde der Median nicht erreicht (p=n.s.).
Die Korrelation zwischen der Dysplasie (Grenzwert 10 Prozent aller Zellen in einer hämatopoetischen Reihe) in der Granulopoese und dem Überleben ist in Tabelle 7a dargestellt.

3.10.2 Korrelation bezogen auf einen Grenzwert von 50 Prozent Dysplasie

Bei Verwendung eines neu gesetzten Grenzwerts von mindestens 50 Prozent dysplastischen Zellen in der Granulopoese ergaben sich folgende Ergebnisse am Tag 30 nach allogener HSZT:
Das mediane Überleben (OS) zeigte in den Untersuchungen bei <50 Prozent

Dysplasie in der Granulopoese 23,3 Monate und bei ≥50 Prozent dysplastische Zellen 5,0 Monate (p=n.s.).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei <50 Prozent Dysplasie in der Granulopoese 23,3 Monate und bei ≥50 Prozent Dysplasie 5,0 Monate (p=n.s.).

Bezogen auf die Untersuchung am Tag 100 nach allogener HSZT wurde der Median des Gesamtüberlebens (OS) weder bei <50 Prozent, noch bei ≥50 Prozent Dysplasie in der Granulopoese erreicht (p=n.s.).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei ≥50 Prozent Dysplasie 16,1 Monate, bei <50 Prozent Dysplasie wurde der Median nicht erreicht (p=n.s.).
Die Korrelation zwischen der Dysplasie (Grenzwert 50 Prozent) in der Granulopoese und dem Überleben ist in Tabelle 7b dargestellt.

3.11 Korrelation zwischen der Dysplasie in der Erythropoese und dem Überleben

3.11.1 Korrelation bezogen auf einen Grenzwert von 10 Prozent Dysplasie

Das mediane Gesamtüberleben (OS) zeigte in den Untersuchungen an Tag 30 nach allogener HSZT bei Patienten ohne Dysplasie (Grenzwert 10 Prozent aller Zellen in einer hämatopoetischen Reihe) in der Erythropoese 29,2 Monate, bei Patienten mit Dysplasie 20,3 Monate (p=n.s.).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei Patienten ohne Dysplasie in der Erythropoese 27,5 Monate im Vergleich zu 16,0 Monaten (p=n.s.) bei Patienten mit Dysplasie.

Bezogen auf die Untersuchung am Tag 100 nach allogener HSZT betrug das mediane Gesamtüberleben (OS) bei Patienten mit Dysplasie in der Erythropoese 28,1 Monate, bei Patienten ohne Dysplasie erreichte das Gesamtüberleben den Median nicht (p=n.s.).

Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei Patienten mit Dysplasie in der Erythropoese 27,5 Monate, bei Patienten ohne Dysplasie wurde der Median nicht erreicht (p=0,064).
Die Korrelation zwischen der Dysplasie in der Erythropoese und dem Überleben bezogen auf den Grenzwert von 10 Prozent Dysplasie ist des Weiteren in Tabelle 7a dargestellt.

3.11.2 Korrelation bezogen auf einen Grenzwert von 50 Prozent Dysplasie

Bezogen auf die Untersuchung am Tag 30 nach allogener HSZT wurde der Median des Gesamtüberlebens (OS) weder bei <50 Prozent, noch bei ≥50 Prozent Dysplasie in der Erythropoese erreicht (p=n.s.).
Auch der Median des ereignisfreien Überlebens (EFS) wurde bei <50 Prozent und ≥50 Prozent Dysplasie in der Erythropoese nicht erreicht (p=n.s.).

Das mediane Überleben (OS) zeigte in den Untersuchungen an Tag 100 nach allogener HSZT bei ≥50 Prozent Dysplasie in der Erythropoese 28,1 Monate, bei <50 Prozent Dysplasie erreichte das Gesamtüberleben den Median nicht (p=n.s.).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei ≥50 Prozent Dysplasie in der Erythropoese 27,5 Monate, bei <50 Prozent Dysplasie wurde der Median nicht erreicht (p<0,001).
Die Korrelation zwischen der Dysplasie in der Erythropoese und dem Überleben bezogen auf den Grenzwert von 50 Prozent Dysplasie ist in Tabelle 7b dargestellt.

3.12 Korrelation zwischen der Dysplasie in der Megakaryopoese und dem Überleben

3.12.1 Korrelation bezogen auf einen Grenzwert von 10 Prozent Dysplasie

Das mediane Überleben (OS) zeigte in den Untersuchungen an Tag 30 nach allogener HSZT bei Patienten ohne Dysplasie (Grenzwert 10 Prozent aller Zellen in einer hämatopoetischen Reihe) in der Megakaryopoese 23,3 Monate, bei Patienten mit dysplastischen Zellen wurde der Median des Gesamtüberlebens nicht erreicht (p=n.s.).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei Patienten ohne Dysplasie in der Megakaryopoese 32,4 Monate, bei Patienten mit Dysplasie wurde der Median nicht erreicht (p=n.s.).

Bezogen auf die Untersuchung am Tag 100 nach allogener HSZT wurde der Median des Gesamtüberlebens (OS) weder bei Patienten mit, noch ohne Dysplasie in der Megakaryopoese erreicht (p=n.s.).
Auch der Median des ereignisfreien Überlebens (EFS) wurde bei Patienten mit und ohne Dysplasie in der Megakaryopoese erreicht (p=n.s.).
Die Korrelation zwischen der Dysplasie in der Megakaryopoese und dem Überleben bezogen auf den Grenzwert von 10 Prozent Dysplasie ist in Tabelle 7a dargestellt.

3.12.2 Korrelation bezogen auf einen Grenzwert von 50 Prozent Dysplasie

Das mediane Überleben (OS) zeigte in den Untersuchungen an Tag 30 nach allogener HSZT bei <50 Prozent Dysplasie in der Megakaryopoese 37,7 Monate, bei ≥50 Prozent Dysplasie erreichte das Gesamtüberleben den Median nicht (p=n.s.).
Das mediane ereignisfreie Überleben (EFS) betrug bei <50 Prozent Dysplasie in der Megakaryopoese 55,3 Monate, bei ≥50 Prozent Dysplasie wurde der Median nicht erreicht (p=n.s.).

Bezogen auf die Untersuchung am Tag 100 nach allogener HSZT wurde der Median des Gesamtüberlebens (OS) weder bei <50 Prozent, noch bei ≥50 Prozent Dysplasie in der Megakaryopoese erreicht (p=n.s.).
Auch der Median des ereignisfreien Überlebens (EFS) wurde bei <50 Prozent und ≥50 Prozent Dysplasie nicht erreicht (p=n.s.).
Die Korrelation zwischen der Dysplasie in der Megakaryopoese und dem Überleben bezogen auf den Grenzwert von 50 Prozent Dysplasie ist des Weiteren in Tabelle 7b dargestellt.

	Tag 30					Tag 100				
Parameter	**Patienten-anzahl**	**OS (Monate)**	**p**	**EFS (Monate)**	**p**	**Patienten-anzahl**	**OS (Monate)**	**p**	**EFS (Monate)**	**p**
Dysplasie (auf alle Zellen bezogen)										
Granulopoese										
<10%	52	16,8		12,8		51	n.r.		n.r.	
≥10%	18	28,1	0,301	n.r.	0,180	24	28,1	0,263	27,5	0,185
Total	70	23,3		23,3		75	n.r.		n.r.	
Erythropoese										
<10%	43	29,2		27,5		40	n.r.		n.r.	
≥10%	19	20,3	0,715	16,0	0,575	32	28,1	0,142	27,5	0,064
Total	62	29,2		27,5		72	n.r.		n.r.	
Megakaryopoese										
<10%	26	23,3		32,4		24	n.r.		n.r.	
≥10%	29	n.r.	0,799	n.r.	0,564	46	n.r.	0,492	n.r.	0,629
Total	55	37,7		55,3		70	n.r.		n.r.	

Tabelle 7a: Korrelation zwischen der Dysplasie der drei Zelllinien Granulopoese, Erythropoese und Megakaryopoese mit dem Überleben. Das Kriterium „Dysplasie“ war hier bei Nachweis von mindestens 10 Prozent dysplastischen Zellen in einer hämatopoetischen Reihe erfüllt.

	Tag 30					Tag 100				
Parameter	**Patienten-anzahl**	**OS (Monate)**	**p**	**EFS (Monate)**	**p**	**Patienten-anzahl**	**OS (Monate)**	**p**	**EFS (Monate)**	**p**
Dysplasie (auf alle Zellen bezogen)										
Granulopoese										
<50%	68	23,3		23,3		74	n.r.		n.r.	
≥50%	2	5,0	0,796	5,0	0,943	1	n.r.	0,584	16,1	0,304
Total	70	23,3		23,3		75	n.r.		n.r.	
Erythropoese										
<50%	63	n.r.		n.r.		71	n.r.		n.r.	
≥50%	1	n.r.	0,453	n.r.	0,44	1	28,1	0,380	27,5	**<0,001**
Total	64	29,2		27,5		72	n.r.		n.r.	
Megakaryopoese										
<50%	51	37,7		55,3		56	n.r.		n.r.	
≥50%	4	n.r.	0,814	n.r.	0,730	14	n.r.	0,377	n.r.	0,419
Total	55	37,7		55,3		70	n.r.		n.r.	

Tabelle 7b: Korrelation zwischen der Dysplasie der drei Zelllinien Granulopoese, Erythropoese und Megakaryopoese mit dem Überleben. Das Kriterium „Dysplasie“ war hier bei Nachweis von mindestens 50 Prozent dysplastischen Zellen in einer hämatopoetischen Reihe erfüllt.

3.13 Evaluation unterschiedlicher Prognoseparameter in der Cox-Regressionsanalyse

Des Weiteren wurde in einem univariaten Modell (Cox-Regressionsanalyse) der Einfluss weiterer potentieller Prognoseparameter untersucht: „Patientenalter“, „1. versus 2. HSZT“, „AML versus MDS“, „Intervall (Monate) zwischen Erstdiagnose und HSZT“, „Zytogenetische Risikogruppe“, „Hämatologischer Remissionsstatus vor HSZT“, „CMV-Status des Patienten“, „Therapie vor HSZT“, „MAC versus RIC“, „ATG ja/nein“ und „zytogenetische Risikogruppe“.

Signifikant für das Gesamtüberleben (OS) waren in der univariaten Analyse nur die Parameter „1. versus 2. HSZT“ (p=0,009) und „Hämatologischer Remissionsstatus vor HSZT“ (p=0,012).
Beide Parameter zeigten auch in der multivariaten Auswertung einen signifikanten Wert: „1. versus 2. HSZT“ (p=0,030) und „Hämatologischer Remissionsstatus vor HSZT“ (p=0,013). Somit zeigten sich diese Parameter als unabhängige Prognoseparameter. Alle anderen untersuchten Prognoseparameter zeigten bereits in der univariaten Analyse keinen signifikanten Einfluss in Bezug auf das Gesamtüberleben (Tabelle 6).

Die Parameter „1. versus 2. HSZT“ (p=0,005), „Hämatologischer Remissionsstatus vor HSZT“ (p=0,012) und „ATG ja/nein“ (p=0,032) zeigten in der univariaten Analyse in Bezug auf das ereignisfreie Überleben Signifikanzen. Bei der multivariaten Auswertung ergaben nur die beiden Parameter „1. versus 2. HSZT“ (p=0,025) und „Hämatologischer Remissionsstatus vor HSZT“ (p=0,018) signifikante Werte im Sinne unabhängiger Prognoseparameter. Der Parameter „ATG ja/nein“ erreichte einen p-Wert von 0,299 (Tabelle 8).

Parameter	Gesamtüberleben (OS)		Ereignisfreies Überleben (EFS)	
	univariat (p)	**multivariat (p)**	**univariat (p)**	**multivariat (p)**
Zytogenetische Risikogruppe	0,403	-	0,450	-
Patientenalter	0,502	-	0,431	-
1. versus 2. HSZT	**0,009**	**0,030**	**0,005**	**0,025**
AML versus MDS	0,168	-	0,247	-
Intervall (Monate) zwischen Erstdiagnose und HSZT	0,516	-	0,339	-
Hämatologischer Remissionsstatus vor HSZT	**0,012**	**0,013**	**0,012**	**0,018**
CMV-Status des Patienten	0,179	-	0,219	-
Therapie vor HSZT	0,569	-	0,312	-
MAC versus RIC	0,064	-	0,798	-
ATG ja/nein	0,065	-	**0,032**	0,299

Tabelle 8: Darstellung der uni- und multivariaten Cox-Regressionsanalyse auf das Gesamtüberleben und das ereignisfreie Überleben

4. Diskussion

Die frühzeitige Identifikation von Patienten mit einem erhöhten Rezidivrisiko ist ein wesentlicher Bestandteil der Behandlung von AML- und MDS-Patienten nach allogener HSZT. Die 2-Jahres-Gesamt-Überlebensrate beträgt bei Patienten, welche ein Rezidiv nach erstmaliger HSZT erlitten haben, trotz optimaler Therapie weniger als 20 Prozent (Christopeit et al., 2009).

Derzeit gibt es jedoch nur wenige Studien zu spezifischen Parametern, wie z.B. zur *NPM1*-Mutation, und deren Aussagekraft hinsichtlich des Rezidivrisikos.
Hinzu kommt, dass die verschiedenen Parameter zum Teil auf bestimmte Patientensubgruppen limitiert sind (z.B. *NPM1*-Mutation) und ihr Nachweis einer mangelnden Spezifität unterliegen kann.

Ergibt sich bei einem Patienten nach allogener HSZT ein Hinweis für ein erhöhtes Rezidivrisiko - z.B. im Sinne einer persistierenden „minimal residual disease“ (MRD)-Last, ist es denkbar, präemptive Maßnahmen zu beginnen, um die klinische Manifestation des Rezidivs zu verhindern oder zumindest zu verzögern. Es stehen hier prinzipiell die Gabe von Donorlymphozyten, demethylierender Agentien, eine Kombination aus beiden oder eine zweite HSZT zur Verfügung.
Kandidaten für eine präemptive Intervention z.B. mit Donorlymphozyten können auch Patienten mit einer Hochrisikokonstellation vor HSZT sein, wie Patienten mit einem komplexen Karyotyp oder einer *FLT3*-ITD-Mutation bei der AML, oder Patienten mit einem fortgeschrittenen MDS (Dominietto et. al., 2007).

Da insbesondere zum prognostischen Wert von zytomorphologischen Parametern bei AML- und MDS-Erkrankung nach allogener HSZT keine systematischen Studien vorliegen, prüft die vorliegende Arbeit den prognostischen Einfluss der in der klinischen Praxis vergleichsweise einfach zu erhebenden Parameter Dysplasie, Gesamtzellularität und Zellularität der drei einzelnen hämatopoetischen Zelllinien – Granulopoese, Erythropoese und Megakaryopoese – hinsichtlich des Gesamtüberlebens und des ereignisfreien Überlebens in der Posttransplantationsphase. In Hinblick auf diese

zytomorphologischen Parameter wurde bisher nur berichtet, dass Dysplasie „häufig und unspezifisch“ nach HSZT auftritt (van Marion et al., 2006).

Die vorliegende Analyse zeigt, dass die Zytomorphologie der Knochenmarkaspirate in der frühen Posttransplantationsphase in der Tat von einer hohen Rate einer aberranten Gesamtzellularität charakterisiert ist.
Eine aberrante Gesamtzellularität zeigte sich am Tag 30 nach allogener HSZT in 54,4 Prozent der Fälle. Auch bei der Auswertung der einzelnen hämatopoetischen Zelllinien war eine aberrante Zellularität in mehr als der Hälfte der Fälle nachweisbar. Besonders ist hier die aberrante Zellularität der Megakaryopoese zu erwähnen (70,7 Prozent aller untersuchten Fälle).
Auch am Tag 100 nach allogener HSZT waren sowohl eine aberrante Gesamtzellularität (46,4 Prozent aller Fälle), als auch eine aberrante Zellularität in den einzelnen Zellreihen häufige Phänomene, wobei erneut die Megakaryopoese (58,4 Prozent aller Fälle) am häufigsten betroffen war.
Ein genauerer Blick auf das Verhältnis zwischen reduzierter und gesteigerter aberranter Zellularität zeigte, dass sowohl in der Gesamtzellularität, als auch in den einzelnen Zelllinien die Zellularität häufiger reduziert als gesteigert war. Dies galt für beide Zeitpunkte, Tag 30 und Tag 100.

Darüber hinaus weist die vorliegende Arbeit nach, dass Dysplasie ein häufiges Phänomen zu beiden Untersuchungszeitpunkten war.
Dysplasie in mindestens 10 Prozent der Zellen traten besonders häufig in der Megakaryopoese auf: am Tag 30 in 52,7 Prozent aller Fälle, am Tag 100 in 65,7 Prozent aller Fälle. Auch Erythropoese und Granulopoese waren häufig betroffen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass aberrante Zellularität sowie Dysplasie bei AML- und MDS-Patienten nach allogener HSZT häufig auftreten.

Außerdem zeigte sich in der ersten Knochenmarkpunktion nach HSZT eine Korrelation zwischen einer reduzierten Gesamtzellularität und dem kürzesten Überleben ($p=0.114$). Dies galt auch gesondert für die Granulopoese ($p=0.219$) und Megakaryopoese ($p=0.201$).

Diese Ergebnisse zeigen sich zum gleichen Zeitpunkt nach HSZT ganz ähnlich bei der Betrachtung des ereignisfreien Überlebens. Auch für die Granulopoese und Megakaryopoese korrelierte eine reduzierte Zellularität unmittelbar mit dem kürzesten ereignisfreien Überleben, wobei ein annähernd signifikanter Wert in der Megakaryopoese erreicht wurde (p=0,085).
Es zeigte sich sogar, dass eine reduzierte Gesamtzellularität am Untersuchungstag 30 nach allogener HSZT signifikant mit dem kürzesten ereignisfreien Überleben assoziiert war (p= 0,041).
Am Untersuchungstag 100 geht eine reduzierte Zellularität in der Erythropoese annähernd signifikant mit dem kürzesten Gesamtüberleben (p=0,075), in der Megakaryopoese signifikant (p=0,041) mit dem kürzesten Gesamtüberleben einher.

Da die Arbeit als Ereignis ein Rezidiv und den Tod des Patienten definiert hat (Rezidiv als Todesursache in der Arbeit 53,6 Prozent; Abb. 11), geht eine reduzierte Gesamtzellularität somit auch mit einem erhöhten Rezidivrisiko einher.
Infektionen in der Posttransplantationsphase könnten ebenfalls einen Einfluss auf die Zellularität nehmen bzw. mit einer reduzierten Zellularität einhergehen, was weiter zu untersuchen wäre. Ein weiterer Einflussfaktor könnte die „Stammzelldosis“ bzw. die Zahl CD34+ Zellen im Graft bezogen auf das Körpergewicht des Empfängers sein, was allerdings in dieser Untersuchung nicht evaliert wurde.
Trotz dieser limitierenden Faktoren erlaubt diese Auswertung die Hypothese, dass die Beurteilung der Zellularität in der frühen Posttransplantationsphase einen wesentlichen Faktor zur Identifikation eines erhöhten Rezidivrisikos bei AML- und MDS-Patienten darstellt.

Es gilt noch zu bemerken, dass die Beurteilung von Knochenmarkausstrichen auch von der Ausstrichqualität abhängt. Darüber hinaus ist bei zu starker Aspiration eine Blutverdünnung möglich, was ebenfalls die Zellularität beeinflussen kann. Idealerweise wird für die Zytomorphologie die „erste“ Spritze verwendet. Erfolgt hier keine korrekte Beschriftung der für die Zytomorphologie gedachten Spritze durch den Punkteur, besteht die

Möglichkeit, dass für die Ausstriche suboptimales Probenmaterial aus einer der folgenden Spritzen verwendet wird. Bislang basiert die Erfassung der Zellularität in der Regel auf der Knochenmarkbiopsie bzw. Histologie. Allerdings wäre die Anfertigung von Knochenmarkbiopsien in der Posttransplantationsphase bei Patienten, welche eine Transplantation aufgrund einer AML oder eines MDS erhalten haben, in der Regel nicht eindeutig indiziert und die Patienten weisen oftmals eine Thrombozytopenie in dieser Phase auf. Somit ist eine Durchführung von Knochenmarkbiopsien in dieser Phase nicht wirklich möglich. Die oben aufgeführten Limitationen für diese Analyse sind aber vorhanden und müssen in jedem Fall bei der Interpretation bedacht werden.

Im Gegensatz zum prognostischen Potential der Zellularität für die Beurteilung eines erhöhten Rezidivrisikos war der Nachweis einer Dysplasie, unabhängig vom verwendeten Schwellenwert (10 Prozent oder 50 Prozent dysplastische Zellen in einer Zelllinie betroffen), in dieser Arbeit prognostisch nicht relevant.
Lediglich zwischen dem Parameter Dysplasie in der Erythropoese mit einem Schwellenwert von 50 Prozent aller Zellen in der betroffenen Reihe und dem medianen ereignisfreien Überleben am Untersuchungstag 100 zeigte sich eine signifikante Korrelation ($p<0,001$). Außerdem weist die vorliegende Arbeit einen nicht signifikanten Trend bei der Korrelation zwischen dem Parameter Dysplasie in der Erythropoese mit einem Schwellenwert von 10 Prozent aller Zellen in der betroffenen Reihe und dem medianen ereignisfreien Überleben am Untersuchungstag 100 nach ($p=0,064$).

In der Gesamtbewertung stellt das Kriterium Dysplasie in der vorliegenden Untersuchung jedoch keinen Parameter zur Identifikation eines erhöhten Rezidivrisikos bei AML- und MDS-Patienten in der Posttransplantationsphase dar.

Dies wird von früheren Untersuchungen aus dem konservativen Therapiesetting der AML bestätigt, die zeigten, dass unter dem Einfluss einer Chemotherapie die Dysplasie keinen Prognoseparameter darstellt (Haferlach et al., 2003; Wandt et al., 2008; Falini et al., 2010; Miesner et al., 2010). Auch die in der vorliegenden Untersuchung erfassten Patienten erhielten im Vorfeld der

HSZT im Rahmen der Konditionierung eine Chemotherapie.

Des Weiteren zeigten sich in der uni- und multivariaten Analyse signifikante Korrelationen weiterer Parameter in Bezug auf das Gesamtüberleben und das ereignisfreie Überleben, wie zum Beispiel „1./2. HSZT“ und der „Hämatologische Remissionsstatus vor HSZT“.

Zusammenfassend belegt die vorliegende Arbeit das häufige Auftreten einer aberranten Zellularität und der Dysplasie bei Patienten mit AML und MDS nach allogener HSZT. Ferner stellt die Zellularität einen prognostisch relevanten Parameter in der Posttransplantationsphase dar. Im Gegensatz dazu spielt die Dysplasie nur eine untergeordnete Rolle für die Identifikation gefährdeter Patienten in der Posttransplantationsphase.

4.1 Bewertung

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine rein retrospektive Arbeit, welche in einem einzigen Zentrum durchgeführt wurde. Die Patienten wurden nach der Verfügbarkeit der Knochenmarkaspirate nach allogener HSZT ausgewählt.
Ein weiterer limitierender Faktor für jede zytomorphologische Auswertung ist, dass die Beurteilung in einem gewissen Rahmen von der Qualität der Arbeit des Untersuchers abhängig ist.
Limitationen waren außerdem die zum Teil mangelnde Qualität der Knochenmarkaspirate, so dass nicht bei jedem Patienten alle Zelllinien hinsichtlich des Kriteriums Dysplasie beurteilt werden konnten. Darüber hinaus ließe sich prinzipiell die Zellularität in Knochenmarkbiopsien valider beurteilen, was aber im spezifischen Setting der Posttransplantationsbetreuung von Patienten mit AML und MDS schwierig umzusetzen wäre.

4.2 Ausblick

Auf der Grundlage der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind weitere Untersuchungen zu Parametern der Zytomorphologie, insbesondere zur Zellularität und Dysplasie und deren prognostischer Aussagekraft für die Posttransplantationsphase zu empfehlen. Multizentrische, prospektive Untersuchungen sollten die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen. Diese könnten - über die vorliegende Arbeit hinaus klären, ob die Beurteilung der Zellularität im Gesamten sowie innerhalb der einzelnen Zellreihen für die Prognose von Patienten mit einer AML oder einem MDS nach allogener HSZT relevant ist.
Des Weiteren sollte - unabhängig von dem Erfordernis weiterer Untersuchungen - bereits jetzt bei der Behandlung von stammzelltransplantierten Patienten am Untersuchungstag 30 nach allogener HSZT eine Beurteilung der Zellularität des Knochenmarkaspirats erfolgen.

5. Zusammenfassung

Bei Patienten mit einer AML und einem MDS besteht die kurative Therapieform einer allogenen HSZT. Im Rahmen des Transplantationsverlaufs und der intensiven Nachsorge ist es wichtig, ein erhöhtes Rezidivrisiko zu identifizieren.
Die vorliegende Arbeit prüft den prognostischen Wert der Parameter Dysplasie, Gesamtzellularität und Zellularität der drei einzelnen hämatopoetischen Zelllinien (Granulopoese, Erythropoese und Megakaryopoese) hinsichtlich des Gesamtüberlebens und des ereignisfreien Überlebens in der Posttransplantationsphase bei AML- und MDS-Patienten.

Die vorliegende Analyse weist nach, dass die Zellularität des Knochenmarks nach allogener HSZT bei AML- und MDS-Patienten häufig aberrant ist.
Es zeigte sich, dass zu beiden Untersuchungszeitpunkten (Tag 30 und Tag 100 nach allogener HSZT) eine aberrante Gesamtzellulärität in ungefähr der Hälfte der Fälle vorherrschend war. Hierbei war sowohl in der Gesamtzellularität, als auch in den einzelnen Zelllinien häufiger eine reduzierte als eine gesteigerte Zellularität nachweisbar.

Auch eine Dysplasie wurde in der Posttransplantationsphase bei AML- und MDS-Patienten häufig gefunden. So waren zum Beispiel in der Megakaryopoese am Tag 100 in 65,7 Prozent der Fälle 10 Prozent der Zellen dysplastisch.

Es stellte sich heraus, dass der Nachweis von Dysplasie in den einzelnen Zellreihen für die Beurteilung eines erhöhten Rezidivrisikos in dieser Arbeit prognostisch nicht relevant war.

Des Weiteren stellten die Arbeit fest, dass am Untersuchungstag 30 eine reduzierte Gesamtzellularität sowohl mit dem kürzesten Überleben korreliert, als auch mit dem kürzesten ereignisfreien Überleben signifikant assoziiert war (p=0,041). Als Ereignis definiert die Arbeit ein Rezidiv der Erkrankung oder den Tod des Patienten, so dass eine reduzierte Gesamtzellularität somit auch mit einem erhöhten Rezidivrisiko einhergeht.
Um die Identifikation von Risikopatienten zu verbessern empfiehlt die Arbeit daher im Rahmen der komplexen Nachbehandlung von Patienten mit AML und MDS nach allogener HSZT bereits am Tag 30 eine Beurteilung der Zellularität des Knochenmarks vorzunehmen.

6. Abkürzungsverzeichnis

AML	Akute myeloische Leukämie
ATG	Antithymozytenglobulin
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CMV	Zytomegalie-Virus
DLI	donor lymphocyte infusion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
EFS	event-free survival
FAB-Klassifikation	Klassifikation der French-American-British Cooperative Group
G-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierende Faktor
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HLA	human leukocyte antigen
HSZT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
inv	Inversion
IPSS	International Prognostic Scoring System
IPSS-R	Revised International Prognostic Scoring System
LDH	Lactatdehydrogenase
MAC	myeloablative chemotherapy
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MRC	Medical Research Council
MRD	minimal residual disease
n.r.	nicht bewertet
n.s.	nicht signifikant
OS	overall survival
RA	Refraktäre Anämie
RAEB-1	Refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten-1
RAEB-2	Refraktäre Anämie mit Exzess von Blasten-2
RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten
RCMD	Refraktäre Zytopenie mit Mehrliniendysplasie
RIC	reduced intensity conditioning
s-AML	sekundäre AML
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

WHO	World Health Organization
ZKRD	Zentrale Knochenmarkspender-Register Deutschlands

7. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Seite

7.1 Abbildungen

1: Vermehrung myelomonozytärer Blasten bei AML im peripheren Blut (Prof. Dr. Dr. Torsten Haferlach, MLL Münchner Leukämielabor) 4

2: Das zytomorphologische Korrelat zur inv(16)/CBFB-MYH11 mit pathologischen Eosinophilen mit dunklen Granula (AML FAB M4eo) 4

3: Karyotyp bei inv(16)/CBFB-MHY11 (Prof. Dr. Claudia Haferlach, MLL Münchner Leukämielabor) 5

4: Normaler männlicher Karyotyp (Ahsen und Rommel, 2012) 6

5: Beispiel eines komplexen Karyotyps mit multiplen zytogenetischen Aberrationen (Prof. Dr. Claudia Haferlach, MLL Münchner Leukämielabor) 7

6: Nachweis von Ringsideroblasten in der Eisenfärbung (Haferlach et al., 2010, S. 29) 9

7: Nachweis eines Rezidivs; Blastenvermehrung in der Verlaufskontrolle bei einem Patienten mit AML in der Knochenmark-Zytomorphologie (Prof. Dr. Dr. Torsten Haferlach, MLL Münchner Leukämielabor) 18

8: Pseudo-Pelger-Zellen bei einem Fall von MDS (Maslak und McKenzie, 2002a) 20

9: Karyorrhexis einer erythropoetischen Vorläuferzelle bei MDS (Fradera, 2008) 21

10: Mikromegakaryozyt mit rundem Einzelkern bei MDS (Maslak, 2002b) 21

11: Übersicht über die Todesursachen 38

12: Korrelation zwischen der Gesamtzellularität an Untersuchungstag 30 und dem medianen ereignisfreien Überleben (EFS) in der Kaplan-Meier Darstellung 39

13: Korrelation zwischen der Zellularität in der Megakaryopoese an Tag 100 und dem medianen Überleben (OS) in der Kaplan-Meier Darstellung 42

7.2 Tabellen

1: Darstellung der Patientencharakteristika 28

2: Darstellung weiterer Erkrankungscharakteristika 29

3: Darstellung der Transplantationscharakteristika 31

4: Darstellung der Zellularität 33

5: Darstellung der Dysplasie 36

6: Korrelation zwischen der Gesamtzellularität und der Zellularität in den drei hämatopoetischen Reihen (Granulopoese, Erythropoese und Megakaryopoese) mit dem Überleben 43

7a: Korrelation zwischen der Dysplasie der drei Zelllinien Granulopoese, Erythropoese und Megakaryopoese mit dem Überleben (mindestens 10 Prozent dysplastische Zellen in einer hämatopoetischen Reihe) 49

7b: Korrelation zwischen der Dysplasie der drei Zelllinien Granulopoese, Erythropoese und Megakaryopoese mit dem Überleben (mindestens 50 Prozent dysplastische Zellen in einer hämatopoetischen Reihe) 50

8: Darstellung der uni- und multivariaten Cox-Regressionsanalyse auf das Gesamtüberleben und das ereignisfreie Überleben 52

8. Literaturverzeichnis

Ahsen, Rommel (2012) Vorgeburtliche Diagnostik, Zentrum für Humangenetik Bremen, Universität Bremen; URL: http://www.humangenetik-bremen.de/VorgeburtlicheDiagnostik.html; Stand: 07.01.2013, 14:00.

Bain BJ. The bone marrow aspirate of healthy subjects. Br J Haematol. 1996; 94: 206-9.

Brunning RD, Orazi A, Germing U, Le Beau MM, Porwit A, Baumann I et al. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL et al. eds. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Ausgabe; IARC Press: Lyon, France, 2008, 88–93.

Braess J, Schneider F, Buske C et al. (2009) Akute myeloische Leukämie. In: Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Hiddemann W, Braess J (Hrg.) 3. Auflage. München: W. Zuckschwerdt Verlag.

Büchner T, Niederwieser D, Schaich M et al. (2013) Leitlinien der DGHO für die Diagnostik und Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie (AML); URL: http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/aml; Stand: 14.01.2013, 16:20.

Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH et al. Revised recommendations of the International Working Group for diagnosis,standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. Journal Of Clinical Oncology 2003; 21: 4642–4649.

Christopeit M, Feldmann U, Finke J, et al. Shift to a New Donor Does Not Improve the Outcome After Second Allogeneic Stem Cell Transplantation (alloSCT) in Acute Leukemia Relapse After a First Allosct - a Risk Factor Analysis by the German Stem Cell Registry (DRST). ASH Annual Meeting

Abstracts. 2009;114(22):3328.

Dominietto A, Pozzi S, Miglino M, et al. Donor lymphocyte infusions for the treatment of minimal residual disease in acute leukemia. Blood. 2007;109(11):5063-5064.

European Group of Blood and Marrow Transplantation (EBMT) (2013) MED-AB Forms Manual. A Guide to the completion of the EBMT. HSCT MED-AB Forms; URL: http://www.ebmt.org/Contents/Data-Management/Registrystructure/MED-ABdatacollectionforms/Documents/MED-ABFormsManual.pdf; Stand: 07.02.13; 9:00.

Falini B, Macijewski K, Weiss T, et al. Multilineage dysplasia has no impact on biologic, clinicopathologic, and prognostic features of AML with mutated nucleophosmin (NPM1). Blood. 2010;115(18):3776-3786.

Fenaux P, Mufti G, Hellström-Lindberg E, et al. Azacitidine Prolongs Overall Survival Compared With Conventional Care Regimens in Elderly Patients With Low Bone Marrow Blast Count Acute Myeloid Leukemia. Journal of Clinical Oncology. 2010; 28(4): 562-569.

Fradera J (2008) Erythroid karyorrhexis in myelodysplasia: bone marrow aspirate; URL: http://imagebank.hematology.org/AssetDetail.aspx?AssetID=3504&AssetType=Asset; Stand: 13.09.2012, 14:00.

Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Bruckner CD, Neiman PE, Clift RA, Lerner KG, Thomas ED. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. Transplantation. 1974; 18(4):295-304

Goasguen JE, Matsuo T, Cox C, Bennett JM. Evaluation of the dysmyelopoiesis in 336 patients with de novo acute myeloid leukemia: major importance of dysgranulopoiesis for remission and survival. Leukemia 1992; 6: 520–525.

Gökbuget N, Ganser A, Schlenk RF (2005) Akute Leukämien, Deutsche

Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie; URL: www.dgho.de/informationen/leitlinien/leukaemien/Akute%20Leukosen.pdf; Stand: 29.11.2011, 11:00.

Greenberg PL, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. Blood. 1997; 89(6):2079-88.

Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. Blood. 2012; 120(12):2454-65.

Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, Wheatley K, Harrison CJ, Burnett AK; National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. Blood 2010; 116(3):354-65.

Haase D, Germing U, Schanz J et al. New insights into the prognostic impact of the karyotyp in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. Blood. 2007; 110: 4385-4395.

Hänel M (2008) Therapie der rezidivierten und refraktären akuten myeloischen Leukämie; URL: http://www.onkodin.de/e2/e51675/e53188/e53739/index_ger.html; Stand:01.05.2011, 14:00.

Haferlach T, Schoch C, Löffler H, et al. Morphologic dysplasia in de novo acute myeloid leukemia (AML) is related to unfavorable cytogenetics but has no independent prognostic relevance under the conditions of intensive induction therapy: results of a multiparameter analysis from the German AML Cooperative Group studies. Journal Of Clinical Oncology. 2003;21(2):256-265.

Haferlach T, Bacher U, Gattermann N, Giagounidis A: Myelodysplastische Syndrome von A bis Z. 2. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 2010.

Hofmann WK, Platzbecker U, Mahlknecht U et al. (2011) Myelodysplastische Syndrome (MDS); URL: http://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/mds; Stand 14.01.2013, 16:30.

Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (2013); URL: http://www.uke.de/kliniken/knochenmarkstransplantation/index.php?id=7_0_0&as_link=http%3A//www.uke.de/kliniken/knochenmarkstransplantation/index.php&id_link=9_0_0&as_breadcrumb=%3Ca%20href%3D%22/index.php%22%3E%7C%20Home%3C/a%3E%20%3E%20%3Ca%20href%3D%22/zentren/index.php%22%3EZentren%3C/a%3E%20%3E%20%3Ca%20href%3D%22/zentren/onkologie/index.php%22%3EOnkologisches%20Zentrum%3C/a%3E%20%3E%20%3Ca%20href%3D%22/kliniken/knochenmarkstransplantation/index.php%22%3EInterdisziplin%E4re%20Klinik%20und%20Poliklinik%20f%FCr%20Stammzell transplantation%3C/a%3E%20%3E%20%20%20Aufgaben%20/%20Schwerpunkte; Stand: 15.01.2013, 14:15.

Larisch K (2012) Myelodysplastisches Syndrom; URL: http://www.netdoktor.de/Krankheiten/Myelodysplastisches-Syndrom/; Stand: 15.01.2013, 13:00.

Maslak P, McKenzie S (2002a) Cluster of pseudo Pelger-Huet neutrophils in the bone marrow aspirate of this patient with myelodysplastic syndrome. http://imagebank.hematology.org/AssetDetail.aspx?AssetID=1848&AssetType=Asset; Stand: 13.09.2012, 14:00.

Maslak P (2002b) Micromegakaryocyte seen in the bone marrow aspirate of a patient with MDS displays hypolobulation of the nucleus; URL: http://imagebank.hematology.org/AssetDetail.aspx?AssetID=1730&AssetType=Asset; Stand: 13.09.2012, 14:00.

Miesner M, Haferlach C, Bacher U, et al. Multilineage dysplasia (MLD) in acute myeloid leukemia (AML) correlates with MDS-related cytogenetic abnormalities and a prior history of MDS or MDS/MPN but has no independent prognostic relevance: a comparison of 408 cases classified as "AML not otherwise specified" (AML-NOS) or "AML with myelodysplasia-related changes" (AML-MRC). Blood. 2010;116(15):2742-2751.

Müller-Thomas C, Götze K, Schneider F, Braess J (2009) Myelodysplastische Syndrome (MDS). In: Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Hiddemann W, Braess J (Hrg.) 3. Auflage. München: W. Zuckschwerdt Verlag.

Mumm A (2008) Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host-Disease, GvHD) Klinik für Tumorbiologie Freiburg; URL: http://www.leukaemie-phoenix.de/lf_gvhd.html; Stand: 08.07.11, 16:00.

Renz-Polster, Krautzig: Basislehrbuch Innere Medizin. 4. Auflage. München, Jena: Elsevier Urban & Fischer, 2011, S. 306 ff.

Rödel S (2012) Die ersten Wochen nach der allogenen Blutstammzelltransplantation (PBSZT); URL: http://www.transplantation-verstehen.de/spezialthemen/allogene-blutstammzelltransplantation/das-erste-jahr/; Stand: 12.01.2013, 8:00.

Schmid C, Rank A, Kolb H-J (2009) Grundlagen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation. In: Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Hiddemann W, Braess J (Hrg.) 3. Auflage. München: W. Zuckschwerdt Verlag.

Schwerdtfeger R (2003) Transplantation mit reduzierter Konditionierung. KMT-Abteilung der Deutschen Klinik für Diagnostik Wiesbaden; URL: http://www.leukaemie-kmt.de/Behandlung/index.html; Stand: 04.05.2011, 8:00.

Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. Am J Med. 1980;69(2):204-17.

Steiger A (2008) Die Linksverschiebung; URL: http://www.mqnet.ch/bb/pafiledb/uploads/931a395480af61473a50b96811121f46.pdf; Stand 24.05.2012, 18:00.

Swerdlow, Campo, Harris, Jaffe et. al.: WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue. 4. Auflage. IARC, Lyon, 2008.

Tallen G, Kühl J (2010) Stammzelltransplantation, Spendersuche (HLA-Typisierung); URL: http://www.kinderkrebsinfo.de/e1812/e1946/e2054/e2126/e4971/e76588/index_ger.html; Stand: 04.05.11, 11:00.

Team der Knochenmark-/Stammzelltransplantation Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf: Ihr Weg durch die Knochenmark- und Stammzelltransplantation- eine Informationsbroschüre. 4. Auflage, 2010.

Tuzuner N, Bennett JM. Reference standards for bone marrow cellularity. Leuk Res. 1994A; 18(8):645-7.

Tuzuner N, Cox C, Rowe JM, Bennett JM. Bone marrow cellularity in myeloid stem cell disorders: impact of age correction. Leuk Res. 1994B;18(8):559-64.

van Marion AM, Thiele J, Kvasnicka HM, van den Tweel JG. Morphology of the bone marrow after stem cell transplantation. Histopathology. 2006;48(4):329-342.

Wandt H, Schakel U, Kroschinsky F, et al. MLD according to the WHO classification in AML has no correlation with age and no independent prognostic relevance as analyzed in 1766 patients. Blood. 2008;111(4):1855-1861.

9. Veröffentlichungen

Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie (DGHO) 2011, Basel, Poster des Artikels „Die Zellularität - nicht jedoch Dysplasiezeichen - sind in der Knochenmark-Zytomorphologie für die Prognose von Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML) in der Post-Transplantationsphase entscheidend", präsentierende Autorin: Bacher, Ulrike, Posternummer: P286

Christopeit M, Miersch K, Klyuchnikov E, Haferlach T, Binder M, Zabelina T, Ayuk F, Schafhausen P, Zander AR, Bokemeyer C, Kröger N, Bacher U. Evaluation of BM cytomorphology after allo-SCT in patients with AML. Bone Marrow Transplant. 2012; 47(12): 1538-1544

Christopeit M, Ocheni S, Haferlach T, Miersch K, Zabelina T, Klyuchnikov E, Binder M, Ayuk F, Schafhausen P, Zander AR, Bokemeyer C, Kröger N, Bacher U. Evaluation of BM cytomorphology after allo-SCT in patients with MDS. Bone Marrow Transplant. 2012; 1-2

10. Danksagung

Einen besonderen Dank für die sehr gute Betreuung, die außergewöhnliche Unterstützung und den motivierenden Zuspruch möchte ich an meine Doktormutter und Betreuerin Frau apl. Prof. Dr. med. Bacher richten.

Außerdem danke ich Prof. Dr. med. Zander und dem heutigen Klinikdirektor Prof. Dr. med. Kröger für die Unterstützung und Möglichkeit, innerhalb der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation diese Arbeit anfertigen zu dürfen.
Des Weiteren danke ich allen Medizintechnischen Assistenten in der Zytomorphologie und deren medizinischem Leiter Herr Dr. med. Schafhausen.

Auch möchte ich dem gesamten Team der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation - insbesondere dem Pflegepersonal der Ambulanz, Frau Zabelina und Herrn Dr. Ayuk - danken, ohne deren Hilfe und Zusammenarbeit eine Studie der Akten nicht möglich gewesen wäre.

11. Lebenslauf

entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

12. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....