

# **DE KLINISCHE RELEVANTIE VAN HET OPSPOREN VAN MINIMALE ZIEKTEREST BIJ ACUTE MYELOÏDE LEUKEMIE**

**Febe Demeurisse**

Stamnummer: 01309146

Promotor: Prof. dr. Jan Philippé

Copromotor: Apr. biol. Barbara Denys

Masterproef voorgelegd in het kader tot het behalen van de graad Master of Medicine in de Geneeskunde

Academiejaar: 2016 - 2018



# **DE KLINISCHE RELEVANTIE VAN HET OPSPOREN VAN MINIMALE ZIEKTEREST BIJ ACUTE MYELOÏDE LEUKEMIE**

**Febe Demeurisse**

Stamnummer: 01309146

Promotor: Prof. dr. Jan Philippé

Copromotor: Apr. biol. Barbara Denys

Masterproef voorgelegd in het kader tot het behalen van de graad Master of Medicine in de Geneeskunde

Academiejaar: 2016 - 2018





## Voorwoord

Na maanden mijn focus gelegd te hebben op het voltooien en schrijven van een boeiende, correcte en volledige masterproef, ben ik beland aan het schrijven van mijn voorwoord. Het laatste onderdeel dat me nog gescheiden houdt van de ontlading en mij dichterbij het einde van de opleiding “Master in de Geneeskunde” brengt. Een overweldigend gevoel dat mij laat beseffen dat ik steeds dichterbij de titel basisarts kom.

Deze masterproef is tot stand gekomen dankzij de steun en hulp van een aantal personen. Allereerst wil ik een welgemeende dankjewel vermelden voor mijn promotor Prof. dr. Jan Philippé. Keer op keer kon ik bij hem terecht voor allerhande onduidelijkheden. Telkens nam hij de tijd voor mij en formuleerde enthousiast op al mijn (soms onzinnige) vragen een breed antwoord. Tevens mijn copromotor Apr. Klin. Biol. Barbara Denys verdient een dankbetuiging. Als ik langskwam bij mijn promotor luisterde zij altijd oplettend mee om haar eigen kritische bedenkingen mee te delen, dankjewel daarvoor.

Verder wil ik ook graag mijn ouders, zus, schoonbroer en broer vernoemen. Mijn ouders omdat ze mij blijven steunen zijn in de moeilijke periodes en steeds in mij zijn blijven geloven. Ze hebben mijn carrière tot arts sterk bevorderd door te zijn wie ze zijn. Mijn zus en mijn schoonbroer Jens hebben mij bijgestaan met hun wetenschappelijke kennis en ervaring met het schrijven van grote werkstukken. ‘De kleinen’ Warre wist ook goed genoeg wanneer ik even nood had om alleen te zijn of net als ik nood had aan een babbel.

En als laatste, ‘mijnen loetie’. Bedankt om een lach op mijn gezicht te toveren bij elk dipje!

Met in het vooruitzicht mijn Erasmus in Porto, zou ik zeggen: *“Muito obrigada”!*



## **Inhoudstabel**

Afkortingenlijst .....	1
Abstract.....	1
Doelstelling.....	1
<b>1. Inleiding.....</b>	<b>3</b>
1.1. Acute myeloïde leukemie (AML) .....	3
1.1.1. Definitie .....	3
1.1.2. Kliniek.....	3
1.1.3. Pathogenese .....	4
1.1.4. Classificatie volgens de World Health Organization (WHO).....	5
1.1.5. Prognostische parameters in AML.....	7
1.1.6. Risicostratificatie bij AML .....	11
1.1.7. Therapiekeuze .....	14
1.1.8. Therapierespons.....	16
1.2. Het concept 'minimale residuele ziekte' .....	16
1.2.1. Definitie .....	16
1.2.2. Methoden MRD-detectie.....	18
1.2.3. Implementatie MRD in de klinische praktijk.....	18
<b>2. Methoden MRD-detectie .....</b>	<b>19</b>
2.1. Algemeen.....	19
2.2. MRD-detectietechnieken .....	20
2.2.1. Morfologie .....	20
2.2.2. Meerkleurenflowcytometrie .....	21
2.2.3. Polymerase kettingreactie .....	24
2.2.4. Cytogenetica.....	28
2.2.5. Next generation sequencing .....	28
2.3. Productspecificaties .....	31
<b>3. Moeilijkheden bij implementatie .....</b>	<b>33</b>
3.1. Heterogeniteit AML.....	33



3.2.	Vals-positieve en vals-negatieve resultaten .....	33
3.3.	Economisch aspect .....	34
3.4.	Technische sensitiviteit .....	34
3.5.	Terughoudendheid klinici.....	34
3.6.	Cytogenetische, immunofenotypische en moleculaire veranderingen .....	34
3.7.	Tijdstip van MRD-bepaling .....	37
<b>4.</b>	<b>Klinische relevantie MRD .....</b>	<b>39</b>
4.1.	Algemeen .....	39
4.2.	MRD-detectie om herval te voorspellen .....	39
4.3.	Therapiebewaking op geleide van MRD .....	40
4.4.	MRD bij AML met een laag, intermediair en hoog cytogenetisch risicoprofiel .....	41
4.5.	Invloed MRD pretransplant.....	41
4.6.	Invloed MRD posttransplant.....	43
4.7.	Welk level MRD is compatibel met MRD-negativiteit? .....	44
<b>5.</b>	<b>Conclusie .....</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>Referenties .....</b>	<b>48</b>

## Afkortingenlijst

<i>AML</i>	Acute myeloïde leukemie
<i>MRD</i>	Minimale residuele ziekte
<i>FLT3-ITD</i>	Fms-achtige tyrosine eiwitkinase 3 - internele tandem duplicatie
<i>NPM1</i>	Nucleophosmine 1
<i>WHO</i>	World Health Organization
<i>MDS</i>	Myelodysplasie
<i>CEBPA</i>	CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha
<i>RUNX1</i>	Runt-related transcription factor 1
<i>RUNX1T1</i>	RUNX1 translocation partner 1
<i>BCR</i>	Breakpoint Cluster Region Protein
<i>ABL1</i>	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
<i>CBF<math>\beta</math></i>	Core-Binding Factor beta subunit
<i>MYH11</i>	Myosin Heavy polypeptide 11
<i>RARA</i>	Retinoic Acid Receptor Alpha
<i>PML</i>	Promyelocytic Leukemia
<i>MLL</i>	Lysine Methyltransferase
<i>CR1/2</i>	Complete remissie ½
<i>CRp</i>	Incompleet plaatjesherstel
<i>CRi</i>	Incompleet herstel van het aantal bloedcellen
<i>JAK2</i>	Janus Kinase 2
<i>KIT</i>	Tyrosine-Protein Kinase Kit
<i>DNMT3A</i>	DNA (cytosine-5) - methyltransferase 3A
<i>IDH1/2</i>	Isocitrate Dehydrogenase 1/2
<i>TET2</i>	Tet methylcytosine dioxygenase 2
<i>WT1</i>	Wilms tumor 1
<i>CBF</i>	Core Binding Factor
<i>NRAS</i>	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
<i>ASXL1</i>	Additional Sex Combs Like 1
<i>SRSF2</i>	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2
<i>PTD</i>	Partiële Tandem Duplicatie

<i>EVI1</i>	Ecotropic Virus Integration Site 1 Protein Homolog
<i>CN-AML</i>	Cytogenetically Normal AML
<i>OS</i>	Overall Survival
<i>TP53</i>	Tumor Protein p53
<i>ELN</i>	European Leukemia Net
<i>TRM</i>	Therapiegerelateerde Mortaliteit
<i>DNA</i>	Desoxyribonucleïnezuur
<i>allo</i>	Allogeen
<i>auto</i>	Autogeen
<i>HSCT</i>	Hematopoëtische Stamceltransplantatie
<i>GVLE</i>	Graft-Versus-Leukemie-Effect
<i>GVHD</i>	Graft-Versus-Host-Disease
<i>CD</i>	Cluster of Differentiation
<i>PCR</i>	Polymerase Chain Reaction
<i>NGS</i>	Next Generation Sequencing
<i>MFC</i>	Multiparamater Flowcytometrie
<i>ALL</i>	Acute Lymfoïde Leukemie
<i>CML</i>	Chronische Myeloïde Leukemie
<i>LAIP</i>	Leukemie-geassocieerd Immunofenotype
<i>HLA</i>	Humaan Leukocytenantigeen
<i>NK</i>	Natural Killer Cell
<i>LSC</i>	Leukemische Stamcellen
<i>APL</i>	Acute Promyelocyten Leukemie
<i>FISH</i>	Fluorescentie In Situ Hybridisatie
<i>NB</i>	Navelstrengbloed
<i>MUD</i>	Matched Unrelated Donors
<i>MMUD</i>	Mismatched Unrelated Donors
<i>DLI</i>	Donor Lymfocyten Infusie
<i>IL-2</i>	Interleukine 2

## Abstract

December,  
2017

### Bevindingen

Acute myeloïde leukemie (AML) is een heterogene hematologische maligniteit waarbij de detectie van een minimale residuele ziekterest (MRD) de risicostratificatie en therapiekeuze kan optimaliseren en zo prognose kan verbeteren. MRD-detectie kan herhal vroegtijdig voorspellen en keuze tot transplantatie bekrachtigen. Sensitievere detectiemethoden dan morfologie zijn ontwikkeld zoals meerkleurenflowcytometrie, polymerase kettingreactie, cytogenetica en '*next generation sequencing*'. Ondanks deze vooruitgang zijn er tal van moeilijkheden bij implementatie. De heterogeniteit belemmert samen met de mogelijke shifts in immunofenotype, cytogenetica en moleculaire afwijkingen het ontwikkelen van één betrouwbare MRD-analyse per patiënt. Verder is er een sterke nood aan standaardisatie van de MRD-procedure op vlak van tijdstip, grenswaarde, staaltype, ...

### Sleutelwoorden

Acute myeloïde leukemie, leukemie, minimale residuele ziekte, morfologie, meerkleurenflowcytometrie, polymerase kettingreactie, cytogenetica, '*next generation sequencing*', prognose, klinische relevantie

## Doelstelling

Acute myeloïde leukemie is een hematologische maligniteit waarvan de kennis de laatste jaren een grote vooruitgang heeft geboekt door het ontrafelen van de genetische basis. Door de sterke heterogeniteit van AML is dit een vakgebied dat steeds evolueert. Een belangrijke nieuwigheid met betrekking tot follow-up is de bepaling van een minimale residuele ziekterest. Mijn rol in deze masterproef is om de literatuur over MRD bij AML van (hoofdzakelijk) de laatste jaren aandachtig en kritisch door te nemen. Hierdoor wil ik tot een conclusie komen omtrent de klinische relevantie van MRD bij AML in de hedendaagse geneeskunde. Ik wil de bevindingen van verschillende studies vergelijken en zo de belangrijkste vooruitgang in dit kader van AML als hematologische maligniteit neerpennen. Verder wil ik te weten komen hoe MRD opgespoord wordt, wat MRD in de toekomst nog te bieden heeft en waar de knelpunten zich bevinden. Dit alles aangereikt in een volledig, leerrijk en duidelijk beeld van de ziekte AML en MRD.



## 1. Inleiding

### 1.1. Acute myeloïde leukemie (AML)

#### 1.1.1. Definitie

Leukemie, witte bloedcelkanker kan men onderverdelen in lymfatische en myeloïde leukemie, beide kunnen acuut of chronisch zijn (1). Acute myeloïde leukemie is een heterogene bloedziekte met variabele moleculaire en cytogenetische afwijkingen. Tot meer dan 100 verschillende gebalanceerde chromosomale translocaties kunnen voorkomen (2, 3). De detectie van chromosomale afwijkingen door cytogenetische analyse is daarom van uiterst belang in diagnostiek en therapeutische besliskunde (4). Deze afwijkingen kunnen gecorreleerd worden met een betere of slechte prognose (5). AML is bovendien de meest voorkomende acute agressieve maligniteit bij volwassenen en gaat gepaard met overmatige proliferatie van myeloblasten en daaropvolgend infiltratie in en falen van het beenmerg (6, 7). Er wordt geschat dat er bij ongeveer 4,1 op 100 000 volwassenen per jaar de diagnose AML wordt gesteld met een gemiddelde leeftijd van 67 jaar op het ogenblik van diagnose (5).

De therapie is over de laatste 40 jaar weinig gewijzigd en de prognose blijft bij de meerderheid van de patiënten slecht ondanks de ontdekking van nieuwe cytogenetische en genetische afwijkingen als de internele tandem duplicatie van het Fms-achtige tyrosine eiwitkinase 3 (FLT3-ITD) en de mutatie van het Nucleofosmine 1-gen (NPM1). Deze kunnen de prognose bij het grootste deel van de patiënten voorspellen. Met de leeftijd neemt de frequentie van AML bovendien toe (5, 8). Ongeveer 60 à 70% van de volwassenen AML-patiënten (18 tot 65 jaar) zal complete remissie bekomen. Hiervan zal 50 tot 70% hervallen binnen de 3 jaar (9).

#### 1.1.2. Kliniek

Net zoals non-Hodgkinlymfoom start AML zonder specifieke verschijnselen. Bij de helft van de patiënten is vermoeidheid de eerste klacht. Gewichtsverlies en anorexie komen ook veelvuldig voor. 10% presenteert zich met onverklaarde koorts. De patiënt presenteert zich naast vermoeidheid, koorts, gewichtsverlies en anorexie met immuundeficiëntie, stollingsstoornissen en uitzonderlijk met gingivahypertrofie en/of gingivabloeding. Zeldzaam zijn de stollingsstoornissen, botpijn, lymfeklierzwellings, onverklaard zweten, hoesten en hoofdpijn. Heel sporadisch komen er klachten te wijten aan de tumormassa naar voor, zogenaamde chloromen. Zij kunnen wijzen op het begin van AML en worden hoofdzakelijk gezien bij patiënten met een translocatie (8;21). Bij lichamelijk onderzoek komt hepatomegalie, splenomegalie, lymfadenopathie met weekheid van het borstbeen frequent voor (1, 10).

AML typeert zich in het labo door op 2-3 weken opgekomen anemie en thrombopenie waaraan ook de klachten kunnen gelinkt worden. Men vindt naast anemie en thrombopenie, meestal een klassieke hyperleukocytose met circulerende myeloblasten (ten minste 30% in bloed,

beenmerg of beide) zonder verdere voorlopers noch rijpe cellen, secundaire hyperuricemie en hoog lactaatdehydrogenase. Indien het een secundaire AML betreft, vindt men ook pancytopenie uit de voorafgaande myelodysplasie (1, 10).

### 1.1.3. Pathogenese

Ruim 30 jaar weet men dat genomische afwijkingen een belangrijke rol spelen in de leukemogenese van AML en cytogenetische veranderingen zijn goed ontwikkelde diagnostische en prognostische merkers geworden. Recent hebben deze inzichten geleid tot een betere ziekteclassificatie, klinische zorg en nieuwe therapeutische aanpak. Ondanks het feit dat het aantal coderende mutaties bij AML lager is dan bij andere humane kankers, is de diversiteit van combinaties die de heterogeniteit veroorzaakt in fenotype en klinische uitkomst enorm (11).

Humane AML-evolutie is een meerstapsproces. Men veronderstelt dat gedurende een lange latentieperiode er parallelle evolutie is van verschillende klonen die de diagnose van AML voorafgaan. In deze periode verkrijgen hematopoëtische stam- of progenitorcellen, somatische mutaties maar zij blijven nog gedifferentieerd. Onderzoek toont aan dat cellen van gezonde personen dezelfde mutaties dragen als preleukemische stam- of progenitorcellen. Daaruit wordt besloten dat deze gemuteerde cellen voor klonale bloedaanmaak kunnen zorgen. Als deze preleukemische cellen chemotherapie overleven, kunnen ze blijven bestaan tijdens remissie. Hun aanwezigheid leidt dan niet noodzakelijk tot herval want patiënten kunnen een lange termijnoverleving hebben met klonale bloedaanmaak. Daartegenover kunnen deze cellen nieuwe mutaties verwerven en zo kan herval voortkomen uit een preleukemische kloon, zelfs jaren na remissie (12).

De leukemische fase van AML begint na het verkrijgen van een leukemische mutatie maar voor presentatie, dus nog tijdens de latentieperiode. De fase van presentatie wordt gezien als de fase met het beenmergfalen. In de leukemische periode hebben cellen al een duidelijk abnormale differentiatie maar het beenmerg blijft nog intact doordat er welbepaalde tijd nodig is vooraleer de bloedaanmaak verstoord wordt door massieve klonale expansie. Het is belangrijk dat men begrijpt dat de biologie van AML gevormd wordt door de omgeving waarin de tumor ontstaat (beenmerg, perifere bloed, immuunstelsel). Gelijke tumorcellen ontwikkelen verschillend in een verschillende omgeving. Hieruit volgt dat de ontwikkeling ook sterk afhankelijk is van de chemotherapie waaraan de tumor wordt blootgesteld. Herval geeft in feite een fenotype van de tumor weer dat blootgesteld is aan welbepaalde behandelingen. Er vindt selectie plaats van specifieke fenotypes die een selectief voordeel hebben bij een welbepaalde omgeving/behandeling. Men ziet dat de latentieperiode tot herval bij de subtypes van AML vrij gelijkaardig is doordat de verschillende cellen samenkomen tot een meer homogene populatie

met gelijkaardige biologie en kinetiek omdat ze allemaal chemotherapie overleven en aan gelijkaardige druk zijn blootgesteld (12).

Kortom is acute leukemie het gevolg van diverse chromosomale afwijkingen met geassocieerde prognose die klonale proliferatie van jonge witte bloedcelvoorlopers met uitrijpingsstop als gevolg hebben. Dit kan acuut primair optreden of secundair na chemotherapie, bestraling, voorafgaande bloedziekte, blootstelling aan benzeen, vluchtige stoffen, herbi- en pesticiden, plastics, rubber, olieproducten, sigarettenrook en verf. Syndromen met een teveel van 1 of meerdere chromosomen (syndroom van Down, syndroom van Klinefelter) en erfelijke aandoeningen met extreme breekbaarheid van chromosomen (Fanconi-anemie) hebben een hoger risico op AML. Desondanks blijft in de meeste gevallen de oorzaak onbekend (1, 5, 10).

#### 1.1.4. Classificatie volgens de World Health Organization (WHO)

De WHO classificatie van 2008 compartimenteert deze sterk heterogene aandoening in 4 verschillende klassen (13). De hoofdonderverdeling geschiedt tussen AML met recurrente genetische afwijkingen, AML met myelodysplasie (MDS)-gerelateerde wijzigingen, therapiegerelateerde AML en niet anders gespecificeerde AML (14). In 2016 is er een revisie verschenen op basis van de ontdekking van nieuwe moleculaire kenmerken en verbeterde karakteristieken. Mutaties in FLT3, NPM1 en '*CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha*' (CEBPA)-genen zijn toen erkend als voorspellers van respons op inductie- en consolidatietherapie bij cytogenetische normale AML-patiënten onder de 60 jaar en toegevoegd. Op grond hiervan worden de 2 provisionele entiteiten toegevoegd in 2008: AML met gemuteerd NPM1 en AML met biallelische CEBPA-mutaties, niet meer als provisioneel bestempeld. Men spreekt over biallelische mutaties omdat een nieuwe bevinding toont dat enkel dit gecorreleerd is met een betere prognose, dus geen enkelvoudige mutaties (4, 15, 16).

Daarenboven zijn er twee nieuwe voorlopige entiteiten toegevoegd in 2016: AML met gemuteerd '*Runt-related transcription factor 1*' (RUNX1) en AML met het Philadelphiachromosoom BCR-ABL1. AML met gemuteerd RUNX1 vormt een biologische groep met een mogelijks slechtere prognose dan andere subtypes. AML met BCR-ABL1 is een zeldzame entiteit die het gevolg kan zijn van tyrosine kinase inhibitorentherapie. Heden ten dage definieert de WHO nog steeds AML-subtypes op basis van recurrente cytogenetische en moleculaire afwijkingen. De majeure categorieën van hun classificatie zijn niet significant gewijzigd sinds 2008 (4<sup>de</sup> editie van de classificatie). *Tabel 1* geeft een overzicht weer van de huidige WHO-classificatie van 2016 (16).



Tabel 1: WHO-classificatie 2016 van acute myeloïde leukemie en gerelateerde neoplasmata (16)

Acute myeloïde leukemie en gerelateerde neoplasmata
<b>1. AML met recurrenente genetische afwijkingen</b>
AML met t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1
AML met inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);CBFβ-MYH11
APL met PML-RARA
AML met t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A
AML met t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214
AML met inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
AML (megakaryoblastisch) met t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1
AML met gemuteerd NPM1
AML met biallelische CEBPA-mutatie
Provisionele entiteiten: AML met BCR-ABL1 en AML met gemuteerd RUNX1
<b>2. AML met myelodysplasie-gerelateerde wijzigingen</b>
<b>3. Therapiegerelateerde AML</b>
<b>4. Niet anders gespecificeerde AML</b>
AML met minimale differentiatie
AML zonder maturatie
AML met maturatie
Acute myelomonocytische leukemie
Acute monoblastische/monocytische leukemie
Zuivere erythroïde leukemie
Acute megakaryoblastaire leukemie
Acute basofiele leukemie
Acute panmyelose met myelofibrose

- *AML met recurrenente genetische afwijkingen*

Deze categorie bevat verscheidene subtypes waaronder AML met NPM1-mutatie, AML met biallelische CEBPA-mutatie, AML met RUNX1-mutatie en AML met BCR-ABL1. AML met gebalanceerde herschikkingen behoort tevens tot AML met recurrenente genetische afwijkingen. Acht gebalanceerde translocaties en inversies worden hier geïnccludeerd. Vele andere translocaties bestaan en initiëren leukemie maar definiëren geen ziekte-entiteit omdat ze erg zeldzaam zijn (11). De 4 majeure afwijkingen in deze groep zijn herschikkingen van genen die coderen voor transcriptiefactoren met name RUNX1, CBFβ, RARA en MLL (17). Bij RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11 en PML-RARA is het genetische bewijs voldoende voor diagnose.

Voor de andere entiteiten in deze klasse moeten er 20% of meer blasten aanwezig zijn in het perifere bloed of beenmerg om de diagnose te weerhouden (14).

De aanwezigheid van meerlijnsdysplasie (de aanwezigheid van 50% of meer dysplastische cellen in minstens 2 cellijnen) met een mutatie van NPM1 of biallelisch gemuteerd CEBPA wordt niet geklasseerd bij AML met MDS-gerelateerde wijzigingen, maar bij AML met recurrente genetische afwijkingen. Indien deze mutaties ontbreken, is de morfologische detectie van meerlijnsdysplasie een zwakke prognostische indicator maar voldoende voor inclusie in de categorie AML met MDS-gerelateerde wijzigingen (16).

- *AML met MDS-gerelateerde wijzigingen*

Dit concept is voor het eerst toegevoegd aan de WHO-classificatie in 2001 en wordt omschreven door  $\geq 20\%$  blasten en dysplasie in  $\geq 50\%$  van de cellen in minstens 2 myeloïde cellijnen. Er zijn nu 18 cytogenetische afwijkingen waarvan de aanwezigheid voldoende is om de diagnose van deze categorie te stellen, zelfs als de morfologische vereisten voor dysplasie niet voldaan zijn (4). AML met MDS-gerelateerde wijzigingen wordt gekenmerkt door MDS-achtige kenmerken, ongunstige cytogenetische afwijkingen, overexpressie van een multidrugresistente glycoproteïne en een slechte therapierespons (14).

- *Therapiegerelateerde AML*

Therapiegerelateerde AML komt het meest voor bij patiënten die gealkyleerde agentia en/of radiatie of topoisomerase II-inhibitoren hebben ontvangen. 90% van deze patiënten heeft identieke cytogenetische afwijkingen zoals bij MDS-gerelateerde AML of in AML met recurrente genetische afwijkingen. Patiënten met een therapiegerelateerde AML hebben een significante slechtere uitkomst in vergelijking met patiënten met AML met dezelfde genetische afwijkingen maar niet therapiegerelateerd (14).

- *Niet verder gespecificeerde AML*

Deze laatste categorie bevat alle gevallen die niet voldoen aan de criteria van de andere categorieën. Deze maken 25 tot 30% van alle AML-gevallen uit (14).

#### 1.1.5. Prognostische parameters in AML

MRD-positieve en -negatieve patiënten verschillen in heel wat factoren naast MRD, die de uitkomst kunnen voorspellen, zoals het cytogenetische en genetisch profiel. Er zijn ook verschillen aangetoond in het herstel van het aantal bloedcellen of het karyotype (18). Zowel cytogenetische als moleculaire markers als patiëntgerelateerde factoren als MRD geven onafhankelijke prognostische informatie (13, 19). De factoren die voor de behandeling bepaald worden zoals het cytogenetisch en genetisch profiel zijn gecorreleerd met de kans op herstel. Hun prognostische waarde na therapie is wel lager gebleken in vergelijking met deze van MRD en de kwaliteit van respons. Indien patiënten met consolidatiechemotherapie behandeld

worden, zonder allogene stamceltransplantatie in complete remissie 1 (CR1) is het risico op herval meer dan 90% indien MRD, incompleet plaatjesherstel (CRp) of incompleet herstel van het aantal bloedcellen (CRi) aanwezig is (20).

- *Gemuteerde genen*

Moleculaire aberraties zoals mutaties in CEBPA en NPM1 of FLT3-ITD zijn ook van prognostisch belang (21). Mutaties in de genen FLT3, JAK2, RAS en KIT die coderen voor eiwitten in signaaltransductiecascade kunnen vereist zijn voor de proliferatie of overleving van de maligne kloon. Zo zal RUNX1-RUNX1T1 een slechtere uitkomst hebben indien gemuteerd KIT aanwezig is. In cytogenetische normale en abnormale AML, zijn deze genetische afwijkingen geassocieerd met klinische, morfologische en fenotypische kenmerken die identificatie van een specifiek subtype toelaten of dienen als krachtige voorspellers van de uitkomst (14).

De eerst blootgelegde prognostische belangrijke mutatie is de internele tandem duplicatie (ITD) die betrekking heeft tot het juxtamembraandomein van het Fms-achtige tyrosine eiwitkinase 3: FLT3-ITD. Hierdoor wordt de receptor, actief betrokken in bloedaanmaak, constitutief geactiveerd. Dit vormt een gegeerd doelwit voor therapie. De presentatie van een internele tandemduplicatie voorspelt een significant verhoogd risico op herval en een kortere remissie, gecorreleerd met de ITD allelische ratio (5, 11, 13). Zo zullen patiënten met een NPM1-mutatie en een lage FLT3-ITD-ratio een vergelijkbare uitkomst hebben met FLT3-ITD-negatieve NPM1-gemuteerde patiënten. De frequentie is ongeveer 20% onder AML-patiënten en daalt bij ouderen. Deze mutatie kan geassocieerd zijn met NPM1-mutatie, wat mee de prognose bepaalt (11). Veranderingen in het FLT3 mutatiepatroon tussen diagnose en herval kan een beperking zijn om FLT3 als moleculaire merker voor MRD-detectie toe te passen (22, 23).

De myeloïde transcriptiefactor CEBPA is gemuteerd in ongeveer 10% van de patiënten, voornamelijk biallelisch (13). De frequentie daalt met de leeftijd. Biallelisch duidt dat de ene mutatie het aminoterminele einde van 1 allel beïnvloedt en dat de andere mutatie zich op het carboxyterminale einde van het ander allel bevindt. Patiënten met biallelische CEBPA-mutatie hebben minder simultane mutaties met een slechter prognose zoals FLT3-ITD en zijn alleenstaand (zonder FLT3 of NPM1 mutaties) geassocieerd met een gunstigere uitkomst (4, 11).

AML met een NPM1-mutatie komt voor in ongeveer 30% van de patiënten en is hiermee de grootste klasse. Deze mutatie is eerder een secundaire gebeurtenis en treedt eerder laat op in de leukemogenese t.o.v. gemuteerd DNMT3A of IDH1. 75% van hen draagt ook mutaties in genen die coderen voor DNA methylatie of hydromethylatie namelijk DNMT3A, IDH1, IDH2 en



RUNX1-mutaties vindt men bij circa 5-20% van de patiënten en zijn geassocieerd met een slechtere prognose, zeker in associatie met ASXL1 of SRSF2-mutatie. Men vindt ook een correlatie met het mannelijke geslacht, resistentie t.o.v. inductietherapie en verminderde overleving. Dit is een provisionele AML-entiteit in de categorie AML met recurrente genetische afwijkingen in de WHO-revisie van 2016. De frequentie neemt toe met de leeftijd (11).

Mutaties in het ASXL1-gen en IDH1-gen komen voor bij klonale hematopoïese bij gezonde oudere personen maar treden ook vroeg op in de leukemogenese. De frequentie van ASXL1-mutatie neemt toe met de leeftijd en is gecorreleerd met het mannelijke geslacht, lage remissie-aantallen en inferieure uitkomst, onafhankelijk van andere prognostische factoren (4, 11). Partiële tandem duplicatie van MLL (MLL-PTD) en overexpressie van EVI1 bieden ook onafhankelijk nadelige prognostische informatie, net zoals FLT3-ITD en gemuteerd DNMT3A (13). KIT-mutaties bij patiënten met t(8;21) of inv(16)/t(16;16) geeft een bijkomende nadelige impact op de prognose (4).

- *Cytogenetische afwijkingen*

Cytogenetica is één van de meest krachtige onafhankelijke prognostische factoren in AML (26). 'Cytogenetically normal AML' (CN-AML) is de grootste cytogenetische subgroep bij volwassen AML-patiënten, namelijk 50% van de gevallen (15). Er worden dus afwijkingen bij 50 tot 60% van de patiënten gevonden. Er zijn alreeds 8 gebalanceerde translocaties en inversies opgenomen in de categorie AML met recurrente genetische afwijkingen. t(8;21)(q22;22.1); RUNX1-RUNX1T1, inv(16)(p13.1q22); CBFβ-MYH11, t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 of translocaties leidend tot PML-RARA fusietranscripten zijn geassocieerd met een laag risico en betere prognose. PML-RARA is geassocieerd met een goede uitkomst door therapie met arsenisch trioxide en/of gebaseerd op all-trans-retinoïnezuur. De frequentie stijgt met de leeftijd net zoals bij RUNX-RUNX1. RUNX-RUNX1 is tevens geassocieerd met een goede uitkomst in afwezigheid van concomitante KIT-lokalisaties. CBFβ-MYH11 komt ook frequenter voor bij ouderen en is geassocieerd met een betere prognose (11). In tegenstelling hiermee, zijn andere cytogenetische afwijkingen zoals monosomie 7, FLT3-ITD, t(6;9), megakaryoblastaire leukemie, therapiegerelateerde AML, MDS-gerelateerde AML of een complex karyotype <sup>1</sup> geassocieerd met een hoog risico en nadelige prognose (4).

Op basis van cytogenetische afwijkingen worden patiënten ingedeeld in een lage, intermediaire en hoge risicogroep. Hoog risicopatiënten zijn diegene die na inductiechemotherapie geen complete remissie bekomen (2). Verschillende onderzoeksgroepen hanteren verschillende indelingen op basis van cytogenetisch risico. Dit

---

<sup>1</sup> De aanwezigheid van ≥3 cytogenetische afwijkingen in afwezigheid van recurrente translocaties of inversies gedefinieerd door de WHO-classificatie (4)

kan mede de oorzaak zijn van variaties in therapie binnen 1 studie en tussen verschillende studies en van variatie in de uitkomst bij verschillende subtypes AML. Het is daarom van uitermate belang dat cytogenetische classificatie van AML eenduidig is om vergelijkingen tussen verschillende studies mogelijk te maken (13). Inconsistentie tussen de verschillende verdelingen kan bovendien interfereren met de uitkomst van transplantatiebeslissingen (3).

- *Herstel van het aantal bloedcellen*

Voorafgaand aan het ontdekken van de voorspellende waarde van MRD had men een andere posttherapeutische parameter om prognostische waarde van morfologische CR te voorspellen, namelijk incompleet herstel van het aantal bloedcellen (CRi) en incompleet plaatjesherstel (CRp). Chen demonstreert dat AML-patiënten in CR met een normaal aantal bloedcellen een lagere MRD-last hebben dan CRp of CRi. Dit is hoogstwaarschijnlijk te wijten aan verzwakt herstel van de bloedaanmaak door residuele ziekterest. Maar CRp verliest zijn prognostische waarde als MRD in rekening wordt gebracht (27).

- *Andere*

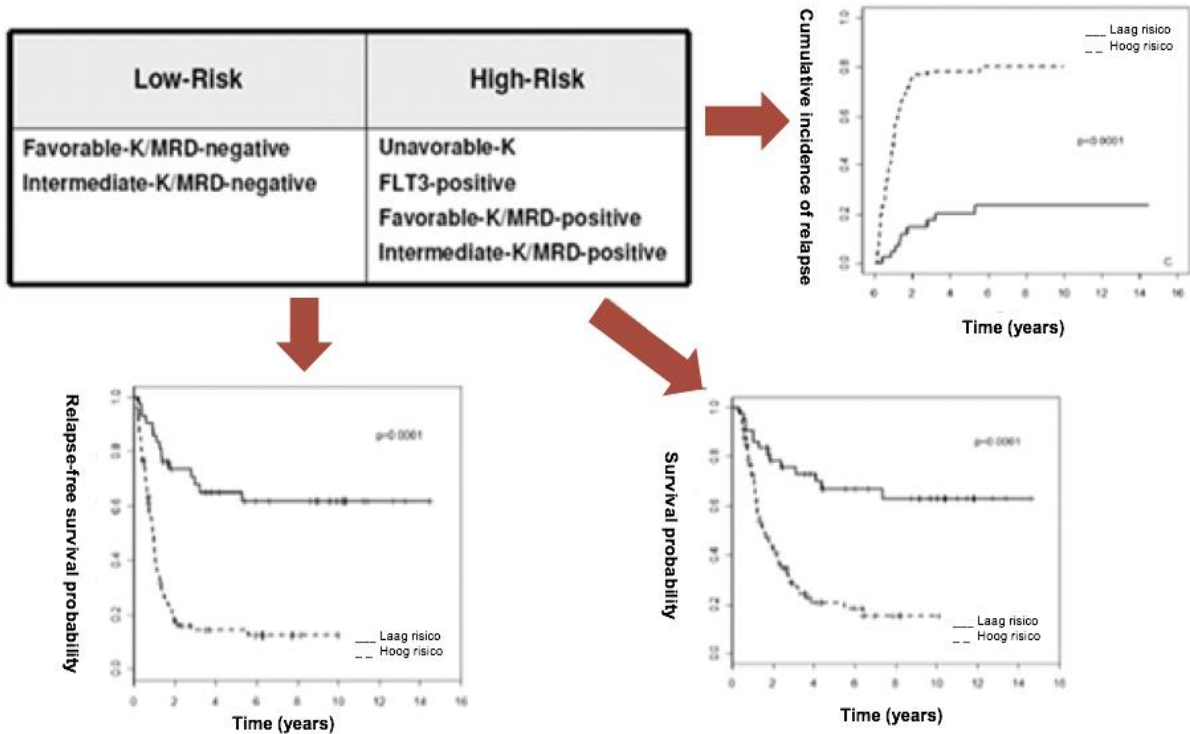
Genomische laesies voorspellen overleving in 2/3 van de gevallen, het resterende 1/3 wordt verklaard door demografische, klinische en therapiegerelateerde variabelen. Nochtans zijn de modellen die al deze factoren in rekening brengen slechts in 75-80% van de gevallen correct. Dit bevestigt de nood aan prognostische factoren voor en na therapie zoals de aanwezigheid van MRD (24). Naast de cytogenetica en moleculaire kenmerken als prognostische parameters heeft ook de leeftijd een voorspellende waarde. Oplopende leeftijd, zelfs na in rekening brengen van andere risicofactoren zoals cytogenetica, is geassocieerd met een ongunstige prognose. Het is daarenboven belangrijk om de fitheid van een patiënt in te schatten voor het opstarten van intensieve therapie. Leukocytose voorspelt tevens een minder goede uitkomst (21). Noemenswaardig is dat de genomische afwijkingen bij ouderen lijken te verschillen van deze van jonge patiënten. Meer ongunstige genomische afwijkingen komen voor met een toegenomen incidentie van TP53 mutaties, chromosomale aneuploidie of beide en minder gunstige zoals biallelische CEBPA-mutaties of gebalanceerde translocaties (11).

#### 1.1.6. Risicostratificatie bij AML

Risicostratificatie is het indelen van patiënten in verschillende categorieën met een verschillende therapiestrategie. Elementen zoals patiëntgerelateerde factoren, genetische afwijkingen in leukemische blasten, cytogenetica en vroege respons op therapie zijn belangrijk bij deze indeling (6). Tot voor kort werd enkel het cytogenetisch profiel gebruikt voor stratificatie. Door hedendaagse vooruitgang in 'sequencing' krijgt moleculaire informatie tevens een belangrijke plaats hierin (3). De therapierespons voor de risicogroepen verschilt sterk, voornamelijk bij intermediair risicopatiënten omdat zij de grootste hoeveelheid

subcategorieën hebben. Hierom is er nood aan extra prognostische factoren die onder andere therapierespons beschrijven (7).

MRD-meting kan vroeg in het ziekteproces de initiële therapierespons aantonen. De diepte van remissie na inductietherapie geeft onafhankelijke prognostische informatie zodat men binnen de cytogenetische risicogroepen een nieuwe onderverdeling kan maken tussen patiënten met een verschillend risico op herval. Deze gegevens kan men aanwenden bij de keuze van consolidatietherapie (13). Bijgevolg voegt de MRD-status binnen elke risicogroep onafhankelijke prognostische informatie toe (27). In een studie van Buccisano wordt een risicobeoordeling tot stand gebracht waarbij pretherapeutische prognostische factoren zoals cytogenetica en posttherapeutische factoren zoals MRD na consolidatietherapie, gecombineerd worden. Men bekomt 2 groepen: patiënten met een laag risico met een gunstig of intermediair karyotype die MRD-negatief zijn en patiënten met een hoog risico met een ongunstig, gunstig of intermediair karyotype of FLT3-ITD die MRD-positief zijn. De eerste groep heeft een beduidend betere OS, hervalvrije overleving en cumulatieve incidentie van herval. De MRD-status verfijnt zodus de risicobeoordeling door onafhankelijke prognostische informatie aan te brengen in de cytogenetische risicogroepen. Dit besluit wordt weergegeven in *Figuur 2* (28).



Figuur 2: Risicobeoordeling na combinatie pre- en posttherapeutische prognostische parameters (28)

De European Leukemia Net (ELN) risicostratificatie heeft nieuwe moleculaire genetische inzichten verworven en onderscheidt nu 3 verschillende groepen: laag, intermediair en ongunstig risico, weergegeven in *Tabel 2* (11). Het vorige 4-groepensysteem is verlaten omdat intermediair I en II prognostisch niet te onderscheiden was bij ouderen (24).

Tabel 2: De European Leukemia Net risicoclassificatie onderscheidt 3 cytogenetische risicocategorieën (11)

Risicoprofiel	Genetische afwijking
<b>Laag risico</b>	t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) of t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 Gemuteerd NPM1 zonder FLT3-ITD of met FLT3-ITD met laag allelische ratio (<0,5) (zonder nadelige genetische afwijkingen) Biallelisch gemuteerd CEBPA
<b>Intermediair risico</b>	Gemuteerd NPM1 met FLT3-ITD met hoog allelische ratio (>0,5) Wild-type NPM1 zonder FLT3-ITD of met FLT3-ITD met laag allelische ratio (<0,5) (zonder nadelige genetische afwijkingen) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A <sup>1</sup> Cytogenetische afwijkingen niet geclassificeerd met laag of ongunstig risicoprofiel
<b>Ongunstig risico</b>	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); KMT2A herschikt t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) of t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,MECOM(EVI1) -5 of del(5q); -7; -17/abn(17p) Complex karyotype <sup>2</sup> , monosomaal karyotype <sup>3</sup> Wild-type NPM1 met FLT3-ITD met hoog allelische ratio (>0,5) Gemuteerd RUNX1 <sup>4</sup> Gemuteerd ASXL1 <sup>4</sup> Gemuteerd TP53 <sup>5</sup>

<sup>1</sup> De aanwezigheid van t(9;11)(p21.3;q23.3) heeft voorrang boven zeldzame, gelijktijdige nadelige genetische mutaties

<sup>2</sup> Gedefinieerd door 3 of meer niet-gerelateerde chromosomale afwijkingen in de afwezigheid van een door WHO-vastgelegde recurrente translocatie of inversie (t(8;21), inv(16) of t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) of t(3;3); AML met BCR-ABL1)

<sup>3</sup> Gedefinieerd door de aanwezigheid van 1 enkele monosomie behalve verlies van X of Y in combinatie met minstens 1 additionele monosomie of structurele chromosoomafwijking (behalve CBF-leukemie)

<sup>4</sup> Deze merkers worden niet gebruikt als ongunstige prognostische factor als ze gelijktijdig voorkomen met laag risicoprofiel AML-subtypes

<sup>5</sup> TP53 mutaties hebben een significante correlatie met AML met een complex en monosomaal karyotype



### 1.1.7. Therapiekeuze

Het streefdoel bij AML is het normaliseren van het aantal blasten in het beenmerg met behulp van inductie-, consolidatie-, onderhoud- en eventueel re-inductie en intensificatiechemotherapie bij MRD (10). Ondanks dat vele patiënten respons bieden op inductiechemotherapie komt herval frequent voor. Dit is dan ook de belangrijkste factor voor therapeutisch falen (25). Inschatten van de kans op therapiegerelateerde mortaliteit (TRM) na intensieve therapie is het meest relevant bij oudere patiënten maar leeftijd is niet de belangrijkste predictor van TRM. TRM daalt dankzij de betere zorg en de betere gezondheid van oudere patiënten. Leeftijd alleen mag dus niet gezien worden als de beslissende determinant van therapie (24). Het relatieve risico op herval geeft de voorkeur aan ofwel chemotherapie ofwel transplantatie (29).

- *Chemotherapie*

Inductietherapie houdt een polychemotherapie in met langdurige hospitalisatie in omgekeerde isolatie met voeding via de bloedbaan, fysiotherapie/activatie, beschermende antibiotica en indien nodig transfusie van rode bloedcellen en bloedplaatjes. Er wordt meestal gebruikgemaakt van cytarabine dat de DNA-vorming verstoort en een tweede chemotherapeuticum dat DNA-breuken initieert zoals anthracycline. Bij de consolidatie wordt dit regime herhaald. Hierna kan men onderhoudsbehandeling toepassen, dit gebeurt voornamelijk bij ouderen (1, 10). Chemotherapie werkt in op de sneldelende weefsels waardoor ook haren, huid en darmepitheel getroffen worden met als mogelijke gevolgen: haaruitval, huidproblemen, misselijkheid en darmstoornissen (1). Anthracycline en cytarabine hebben een duidelijke plaats in de behandeling van AML. Abnormale lever- of nierfunctie moet gezien worden in het geheel met andere comorbiditeiten en wijst niet steeds op onmogelijkheid tot intensieve therapie (24).

- *Hematopoëtische stamceltransplantatie (HSCT)*

Myeloablatieve allogene HSCT (allo-HSCT) is een optie in morfologische CR bekomen met chemotherapie en mogelijks curatief (18). Hierbij wordt beenmerg van een eerstegraads bloedverwant gebruikt (1). Patiënten met een standaard risico AML met een geschikte broer of zus als donor komen ook in aanmerking voor deze transplantatie (26). Niet-verwanten kunnen ook beenmerg doneren indien er voldoende overeenkomsten zijn (1). De resultaten zijn wel steeds afhankelijk van een goede matching (19). Allo-HSCT is een ideale consolidatietherapie omdat het aantal residuele cellen gereduceerd wordt door het graft-versus-leukemie-effect (GVLE). Er is evidentie dat bij patiënten met intermediair en hoog risico AML in eerste complete remissie dit de kans op herval doet dalen en de hervalvrije overleving en OS verhoogt. Allogene HSCT is daarom de 'voorkeursbehandeling' in alle hoog risicopatiënten en een majeur deel van de intermediair risicopatiënten (2, 26, 30, 31). Bij laag

risicopatiënten is allogene HSCT niet de eerste keuze als therapie. Niet-myeloablatieve of gereduceerde-intensiteit regimes laten allogene HSCT toe in patiënten tot 75 jaar (24). Bij autologe transplantatie (auto-HSCT) wordt het beenmerg van de patiënt onder volledige verdoving grotendeels vernietigd door verschillende kuren met cytostatica. Nadien wordt het resterend beenmerg ingevroren. Vervolgens krijgt de patiënt een laatste kuur met heel hoge dosissen chemotherapie, gecombineerd met of gevolgd door bestraling. Hierna dient men het bewaarde beenmerg terug toe (1).

Bij het overwegen van transplantatie moeten baten zoals kans op genezing en nadelen zoals TRM, in evenwicht zijn (2). Indien de kans op herval groter is dan 35%, dan beschouwt men transplantatie als een rechtvaardige beslissing in CR1 (3, 32). Persisterende ziekterest na chemotherapie is gecorreleerd met snellere ziekteprogressie en is evenzeer een indicatie voor HSCT (19). De prognose van AML is beter na allogene dan autologe HSCT indien er pre-transplant MRD wordt ontdekt (18). De bezorgdheid is groot om bij autologe transplantatie verborgen residuele blasten terug te infuseren bij de patiënt (22). De angst bij allogene transplantatie is dan weer de graft-versus-host-reactie waarbij organen zoals lever, huid, maag, darmen en longen kunnen beschadigd worden. Men beschouwt dit als een groter probleem dan afstoting omdat afstoting kan onderdrukt worden. Als GVHD optreedt is de kans op sterfte 25% in de eerste 3 maanden (1). De mortaliteit bij HSCT te wijten aan graft-versus-host-disease (GVHD), toxiciteit door voorafbestaande orgaandysfunctie en infectie als gevolg van chemotherapie, is afgenomen tot minder dan 15% en de meerderheid van AML-patiënten recupereert hiervan (19). Ondanks een sterke vooruitgang in ondersteunende zorg, kennis en gebruik van immunosuppressiva en infectiebestrijding blijft herval de grootste aanleiding tot mislukken van allogene transplantatie (2). Zodoende is een belangrijke nuancering dat stamceltransplantatie zeker niet altijd curatief is (19).

- *Doelwittherapie*

Heel wat doelgerichte therapieën zijn veelbelovend bij AML. Men denkt hierbij aan proteïne kinase inhibitoren, epigenetische modulators, immuun checkpoint inhibitoren, cellulaire immunotherapie, mitochondriale inhibitoren en therapieën die specifiek oncogene proteïnen inhiberen. DNMT3A en IDH1/2-mutaties worden typisch vroeg verworven waardoor succesvolle inhibitie kan leiden tot eradicatie van de kloon. Mutaties in receptor tyrosine kinasen (FLT3) of RAS-siginaaltransductiecascade verschijnen later. In deze gevallen zal de inhibitie vaak enkel betrekking hebben op een subkloon (11). FLT3-ITD mutatie-inhibitoren worden ook al intensief bestudeerd (5).

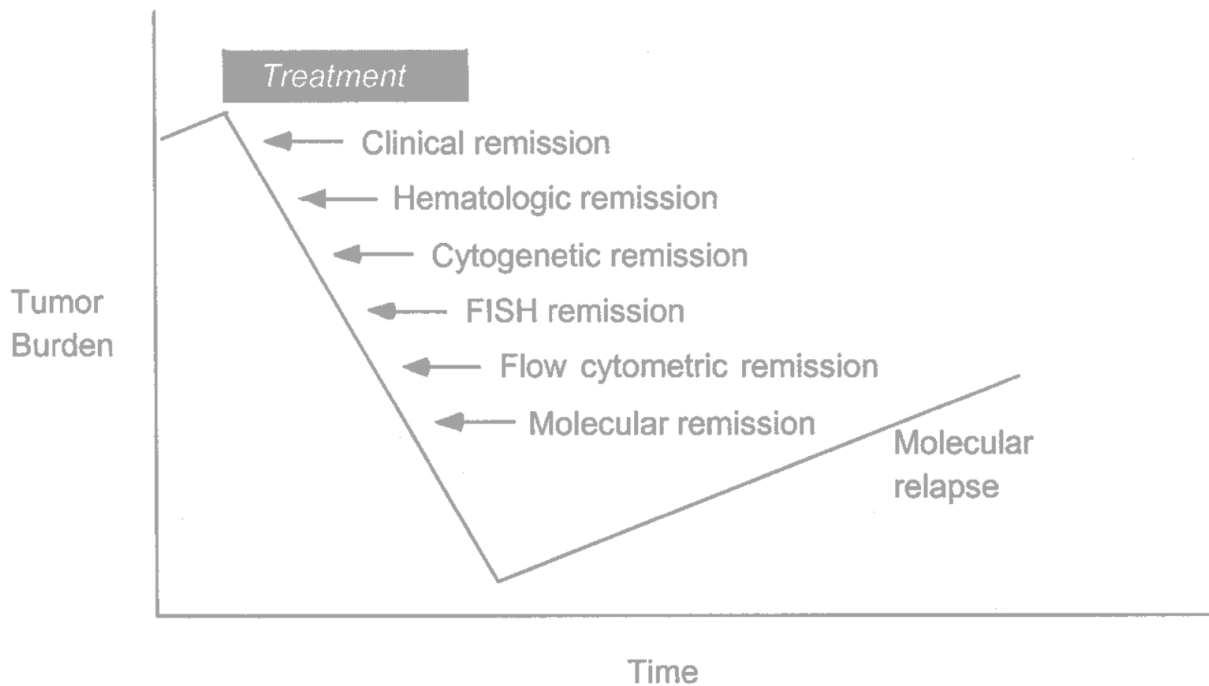
### 1.1.8. Therapierespons

Therapierespons wordt gemeten om de intensiteit van daaropvolgende therapie te bepalen en kandidaten voor HSCT te selecteren (23). Prognostische kenmerken die aanwezig zijn van bij diagnose zoals cytogenetische afwijkingen, genetische mutaties en immunofenotypische karakteristieken voorspellen de verschijning van MRD na behandeling. Residuele cellen kunnen refractair worden ten opzichte van een therapie. Het MRD-gehalte zal dan stijgen ondanks dat de patiënt nog in morfologische remissie verkeert (2). MRD is m.a.w. een krachtige onafhankelijke voorspeller van de prognose, toont verschillen in therapierespons aan en kan herhal vroeg opsporen (30). Actueel is de risicostratificatie en daaraan verbonden therapiekeuze nog steeds grotendeels gesteund op morfologische analyse van het blastenpercentage in beenmergaspiraten na inductietherapie, een beperkt panel aan moleculaire merkers en cytogenetisch onderzoek (3). Ondanks de agressieve multiagentia chemotherapie en allogene stamceltransplantatie blijft herhal frequent, tot 1-3 jaar na complete remissie. Zowaar bij AML met een laag risico is herhal aanwezig in 30 tot 40% (5). Niettegenstaande het hoge remissiecijfer is de 5-jaarsoverleving slechts 30 à 40% (7).

## 1.2. Het concept 'minimale residuele ziekte'

### 1.2.1. Definitie

Remissie wordt gedefinieerd als minder dan 5% blasten zonder opspoorbare 'Auer rods' in een beenmergstaal. Dit beenmergstaal moet meer dan 20% cellulariteit en maturiteit hebben van alle bloedcellijnen in het beenmergstaal, gecombineerd met de afwezigheid van extramedullaire leukemie en leukemische blasten in een perifeer bloedstaal met een neutrofielenaantal van meer dan  $1,5 \times 10^9/L$  en een plaatjesaantal van meer dan  $100 \times 10^9/L$  (5). Voorheen is voornamelijk het begrip morfologische remissie gehanteerd, maar naar verloop van tijd heeft men gemerkt dat dit geen 'ware' remissie is (33). Patiënten kunnen nog steeds circulerende zieke cellen hebben onder het morfologisch detectieniveau (29). 50% van de patiënten die CR bereiken, hervalt, hoogstwaarschijnlijk door deze resterende verborgen blasten (7). Volgens Daisuke zou het dus beter zijn om remissie te baseren op de minimale residuele ziektestatus. Zo kan men ook de huidige algoritmes voor verdere therapie hierop uitbouwen (33). In *Figuur 3* worden de verschillende gradaties van remissie weergegeven bekomen door de verschillende gevoeligheden van MRD-detectietechnieken in het laboratorium (34).



Figuur 3: Laboratoriumtesten zijn in staat om residuele cellen op te sporen op verschillende niveaus. Er kunnen tot  $10^{12}$  leukemische cellen persisteren in een patiënt in hematologische remissie. Hieruit blijkt het belang van het gebruik van sensitievere methodes voor het opsporen van MRD. Stijgend gehalte laat vroege interventie toe zodat de excessieve celproliferatie tot een minimum wordt beperkt en de kans op secundaire genetische afwijkingen vermindert (34)

Minimale residuele ziekte wordt beschouwd als een verzameling cellen waarvan de antigenexpressie afwijkt van de normale patronen bij welbepaalde cellijnen op welbepaalde tijdstippen in de maturatie van normaal of herstellend beenmerg. Men kan verschillende vormen onderscheiden zoals antigenexpressie die normaal niet voorkomt op die cel in dat stadium (bijvoorbeeld aanwezigheid van CD2, CD7, CD19, CD20 en CD5), antigenoverexpressie, afwezige antigenexpressie en asynchrone antigenexpressie (5, 35). MRD is dus een kleine leukemische blastenpopulatie die ontsnapt aan de te lage sensitiviteit van routine morfologische investigatie (7). Men spreekt van minimaal omdat er geen klinische tekenen of symptomen zijn (22). Deze kleine celpopulatie verhoogt de kans op vroege detectie van de subklinische aantallen leukemische cellen die extra informatie kunnen verlenen over de prognose en klinische uitkomst (5).

De overblijvende leukemische blasten zijn de oorzaak van herval en moeten het doelwit worden van antileukemische therapie (27). Wanneer er in hematologisch normaal beenmerg een laag gehalte zieke cellen wordt gedetecteerd is de vraag of men dit moet beschouwen als moleculair herval of ziekte die overblijft als gevolg van incomplete remissie inductie. Men kijkt hiervoor naar het tijdsframe. Men spreekt van pseudo-MRD als er een primaire genetische afwijking aanwezig is maar geen 2<sup>e</sup> essentiële transformatie zoals RUNX1-RUNX1T1 of CBF $\beta$ -MYH11. Men vindt dus ook leukemische geassocieerde fusietranscripten in normale

bloedcellen (22). MRD-detectie wordt vandaag als onmisbaar beschouwd voor de detectie van AML-patiënten met een hoog risico op herval (5).

### 1.2.2. Methoden MRD-detectie

Er wordt vermoed dat herval bij AML gedeeltelijk gedreven wordt door minimale residuele ziekte die aanwezig blijft in een patiënt na therapie. Bijgevolg is er nood aan een gevoelige en objectieve methodologie voor MRD-opsporing (5). Monitoring van MRD kan met moleculaire technieken zoals kwantitatieve PCR en NGS maar ook met multiparameterflowcytometrie (MFC) of cytogenetisch onderzoek (11). Elke methodologie verschilt in zijn sensitiviteit en het aantal patiënten waarbij het gebruikt kan worden. MRD kan bepaald worden vroeg in het verloop van de ziekte zoals na inductie en consolidatietherapie om remissie na te gaan (24).

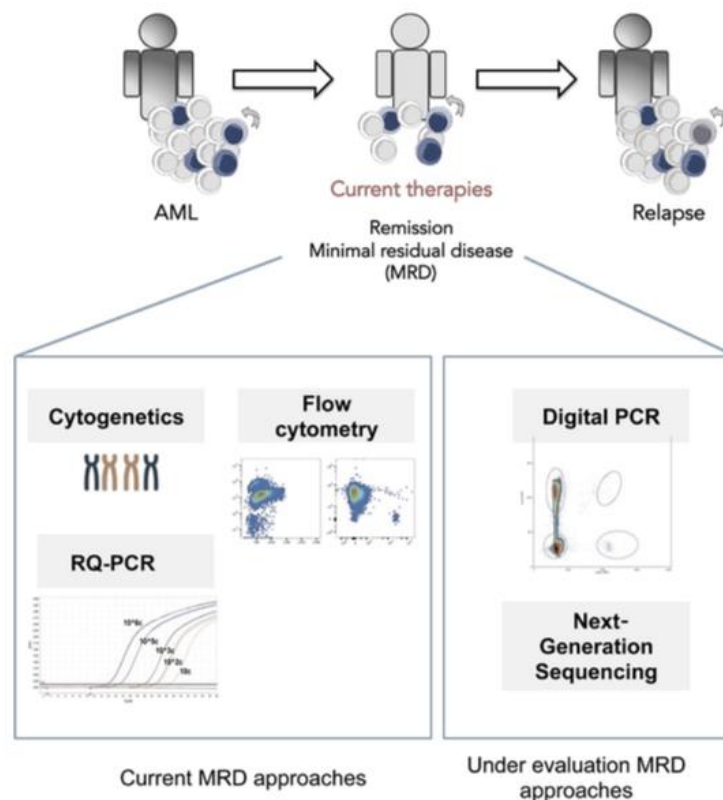
### 1.2.3. Implementatie MRD in de klinische praktijk

Het morfologisch microscopische onderzoek van beenmerguitstrijkjes is tegenwoordig nog de gouden standaard voor het evalueren van de respons op therapie in AML. Ondanks het bestaan van meer sensitieve en minder subjectieve technologieën die inzetten op het opsporen van kleine aantallen blasten in een grote fractie patiënten in CR met een hogere kans op herval. Bij ALL is er alreeds een sterke neiging tot stratificatie van patiënten in morfologische remissie op basis van MRD. Bij AML is de betrouwbaarheid van MRD voor therapeutisch management nog niet zo sterk aan de orde. Dit mede door te gering onderzoek in AML-gevallen, technische uitdagingen zoals het gebrek aan opvolgbare moleculaire doelwitten en een te gering assortiment aan medicatie gericht op MRD (27). De implementatie van MRD in de praktijk wordt verder belemmerd door variabiliteit in de analysemethoden en interlaboratoire voorkeuren. Een standaardanalyse voor elke AML-patiënt is bovendien quasi onmogelijk door het heterogeen karakter (3).

## 2. Methoden MRD-detectie

### 2.1. Algemeen

De klinische bruikbaarheid van MRD-detectie in chronische myeloïde leukemie (CML), gebruikmakend van het BCR-ABL fusietranscript is goed uitgewerkt. AML is veel complexer dan CML maar bevat ook een brede waaier aan genetische afwijkingen die aanleiding geven tot verschillende histologie, immunofenotypes en klinische respons. Hierdoor is er tot nog toe geen uniforme aanpak voor MRD-detectie in alle AML-patiënten. Tevens is er toenemende nood aan de ontwikkeling van methoden voor de detectie of kwantificatie van overblijvende leukemiecellen om de kans en het tijdstip van herval te voorspellen. De perfecte MRD-detectiemethode kan exact het aantal restcellen die in staat zijn om herval te veroorzaken, meten bij patiënten in morfologische complete remissie. Verscheidene methoden gebaseerd op immunofenotype, cytogenetische of moleculaire afwijkingen zijn ontwikkeld, weergegeven in *Figuur 4*, elk met eigen voordelen en nadelen. Echter komen er nog heel wat vals-positieve en vals-negatieve resultaten voor. Geen enkele actuele MRD-test heeft de ideale gevoeligheid en specificiteit om correct herval te voorspellen op cohorte niveau en op individueel niveau waar therapiebeslissingen worden geleid. Ondanks deze tekortkomingen en het ontbreken van overtuiging dat welbepaalde interventies het risico op herval kunnen verminderen bij een positieve MRD-test, wil men toch therapiebeslissingen laten leiden door MRD-resultaten (36).



Figuur 4: MRD-detectiemethoden die op punt staan en ontwikkeld worden (5)

Door de twijfelachtige risicostratificatie van AML op basis van cytogenetica en moleculaire genetische informatie is er een sterke drang om MRD te gebruiken om met meer sensitiviteit de prognose te voorspellen (13, 36). Residuele leukemische blasten worden conventioneel opgespoord met behulp van morfologische technieken maar dit wordt onder andere bemoeilijkt door grote gelijkenissen met de normale hematopoëtische cellen. Bovendien hebben MFC en PCR een hogere sensitiviteit en accuraatheid waardoor zij leukemische cellen onder het morfologische detectieniveau nog steeds kunnen opsporen (23). Detectiemethoden voor MRD zorgen tevens voor een vroeger opsporen van reductie van aantal leukemische blasten (26).

Daarnaast is AML het prototype van een heterogene hematologische maligniteit waardoor de potentiële doelwitten voor MRD-bepaling divers zijn van fusietranscripten en somatische mutaties tot overexpressie en abnormale expressie van antigenen op de blasten (37). Het aantal moleculaire merkers in AML neemt toe door een verhoogd gebruik van 'Next Generation Sequencing' (NGS) (13). Het is wel mogelijk dat de merkers gebruikt voor MRD wijzigen na diagnose zoals bijvoorbeeld NPM1 (2, 32).

De methoden voor MRD op te sporen zijn niet gestandaardiseerd en de grens waarbij MRD als positief wordt beschouwd verschilt ook naargelang de detectiemethode, laboratorium en de vaardigheden van de operator. Dit allen draagt bij tot de complexiteit van MRD-interpretatie (27). De gewoonten in een bepaald laboratorium gaan zelfs vaak de methodekeuze gaan dicteren. Daarenboven is blijvende vaardigheidstraining van technieken in laboratoria essentieel voor optimale kwaliteit naast validatie (37). Elk labo z'n vermogen om MRD te detecteren is aldus beïnvloed door verschillende elementen zoals de gevoeligheid van een analyse (enkel LAIP gebruiken heeft een lagere sensitiviteit dan LAIP gecombineerd met de 'different-from-normal approach'), de vaardigheden en ervaring van de investigator, de biologische eigenschappen van de blasten (aanwezigheid drivermutaties, afwijkende antigeenprofielen die hogere gevoeligheid bereiken) en de kwaliteit van het geanalyseerde weefsel (27). Als een MRD-staal positief schijnt te zijn dan zal men een nieuw perifeer bloedstaal afnemen tussen 2 en 4 weken na het eerste staal en onderzoeken. Als dit ongewijzigde of toenemende ziektelast toont, wordt een beenmergaspiratie gepland die het herstel definitief bevestigt (37).

## 2.2. MRD-detectietechnieken

### 2.2.1. Morfologie

De courantst gebruikte techniek is morfologisch onderzoek van een beenmergaspiraats (35, 38). Complete morfologische remissie, gezien als <5% blasten in het beenmergstaal en herstel van de bloedaantallen, is het eindpunt voor evaluatie van chemotherapierespons geweest in AML voor 60 jaar. De basis van dit eindpunt ligt in de vaststelling dat personen die complete

remissie bekomen langer leven dan diegene die dit niet bekomen en hun overlevingsduur is geassocieerd met de duur van complete remissie (36). CR wordt gedefinieerd als minder dan 5% blasten aanwezig in het staal maar de aanwezigheid van minder dan 5% blasten kan niet gelijkgesteld worden aan genezing (35, 38). Het nadeel is dat als men 5% blasten als grenswaarde gebruikt voor morfologische remissie, er nog steeds  $10^{10}$  blasten kunnen persisteren in een patiënt in zogenaamde morfologische remissie (36).

Andere beperkingen om morfologie verder te gebruiken om therapierespons te meten zijn onder andere morfologie die niet kan geïnterpreteerd worden of de vals-negatieve stalen. 9,5% van de stalen in de studie van Inaba waren leukemievrij op morfologie maar hadden soms meer dan 1% MRD bij MFC (23). Morfologisch onderzoek bevat op vlak van analyse en dataverwerking een grote subjectieve factor (intra- en interobservator variabiliteit in het opsporen van blasten) waardoor bias kan optreden en standaardisatie bemoeilijkt wordt. Er is nood aan expertise en ervaring. Tevens is er variatie in de verdeling van de blasten in het merg en de onmogelijkheid voor het onderscheid te maken tussen leukemische en normale blasten met behulp van morfologische criteria. Het is zodus niet verwonderlijk dat een groot deel van de patiënten in morfologische remissie, hervallen (36).

De klinische bruikbaarheid van morfologische investigatie naar therapierespons is het beschrijven van de totale cellulariteit, opsporing van focale ziekte en het aantonen van de graad van mergfibrose en myelodysplastische veranderingen, voornamelijk bij oudere patiënten. Al deze factoren kunnen het beenmerguitstrijkje aantasten dat nodig is voor MFC of PCR (27). Voorts als men het aantal blasten op dag 28 in rekening brengt, dan heeft deze in combinatie met MRD een betere predictieve waarde dan MRD alleenstaand (26). Studies tonen aan dat onze hedendaagse cytomorfologische gebaseerde definitie van remissie kan vervangen worden of toegevoegd worden aan de resultaten van nieuwe MRD-testen. Zo'n verandering brengt aardige aanpassingen mee op vlak van therapiebeslissingen bij AML-patiënten (36).

### 2.2.2. Meerkleurenflowcytometrie

Meerkleurenflowcytometrie is de meest bruikbare en meest toegepaste techniek bij AML-patiënten (6). MFC doet beroep op de kennis van het fenotype van normale bloedcellen en de aanwezigheid van welbepaalde afwijkende antigenen die normaal niet tot expressie komen of in heel minieme aantallen op de myeloïde cellen op het moment van diagnose, LAIP's genaamd. LAIP staat voor patiëntspecifiek leukemie-geassocieerd immunofenotype. Een LAIP bevat een normaal progenitor antigen (CD34, CD117 of CD133) gecombineerd met een HLA-DR en/of een myeloïde merker (C13 of CD33) en een afwijkende geëxprimeerde merker (35). Een fenotype wordt als afwijkend beschouwd als de antigenexpressie afwijkt van de normale



expressie op dat tijdstip in de maturatie (6). Het is mogelijk dat er meerdere LAIP's geobserveerd worden in één patiënt. Hierdoor worden in minder dan 5% van de AML-patiënten individuele LAIP's gevonden. Als verschillende LAIP's aanwezig zijn wordt er aangeraden om de LAIP met het sterkste logaritmische verschil van het normale beenmerg te hanteren als MRD-merker. Het gebruik van uitgebreide antilichaampanelen laat de detectie van 1 of meerdere LAIP's toe in quasi alle patiënten (5).

Men maakt onderscheid tussen 'cross-lineage' expressie met name de expressie van lymfoïde merkers (T, B of NK-celmerkers) op myeloïde blasten zoals CD2, CD3, CD5, CD7, CD19 of CD56; asynchrone antigenexpressie met co-expressie van antigenen die normaal niet concomitant voorkomen zoals het simultaan voorkomen van immature antigenen als CD34 en CD117 met mature antigenen zoals CD13, CD38, CD15, CD11c, CD14 of CD65; afwezige antigenexpressie zoals HLA-DR die ontbreekt en antigenoverexpressie als normale antigenen in een hoger aantal geëxprimeerd worden zoals CD33, CD34, CD45 en CD123 (5, 35). Zo'n immunofenotype kan men in meer dan 90% van de patiënten identificeren. Volgens Bastos-Oreiro slechts in 75% (2, 18, 39). Deze hoge incidentie aan LAIP's staat in fel contrast met het aantal patiënten met moleculaire of cytogenetische merkers (22).

Niet elke AML-patiënt heeft voorts een abnormaal fenotype. Bovendien kunnen fenotypes wijzigen gedurende de ziekte, immunofenotypeshift genaamd. MFC-gebaseerde MRD-opsporing is niet gelijkvormig bij alle AML-patiënten omdat het vermogen om abnormale blasten te ontdekken afhangt van het aantal residuele leukemische blasten die afwijken van het normale of van het aantal residuele leukemische cellen die geen herhal veroorzaken. Sommige van deze tekortkomingen kunnen opgelost worden met gestandaardiseerde procedures toepasbaar in alle laboratoria (37). Deze methode bereikt een gevoeligheid van  $10^{-3}$ - $10^{-5}$ , gebeurt snel en vereist zoals vermeld een brede kennis over het immunofenotype van gezonde en maligne cellen (2, 5, 29, 39). Een hogere sensitiviteit is mogelijk bij welbepaalde soorten leukemie met een gekend afwijkend immunofenotype (2, 20). Zo bereikt men bij NPM1-gemuteerde patiënten een gevoeligheid van  $10^{-4}$  in vergelijking met een gevoeligheid van  $10^{-3}$  bij ordinaire LAIP's (5). Hoe meer LAIP's een patiënt heeft, hoe accurater de predictie en hoe hoger de sensitiviteit en specificiteit (2). Nieuwere MFC-methodes gebaseerd op meer dan 4 kleuranalyse of gebruik van het panleukocytenantigen CD45 dat de identificatie van blasten vergemakkelijkt kan daarnaast de gevoeligheid verhogen (5, 26). Desondanks dat bij PCR een hogere gevoeligheid wordt bereikt, blijft MFC de gouden standaard voor MRD-detectie bij patiënten zonder moleculair doelwit omdat het bij het merendeel van de patiënten toepasbaar is (5). De andere pluspunten zijn de mogelijkheid tot kwantificatie van abnormale celpopulaties, de snelheid van MFC, de mogelijkheid om dode

van levende cellen te onderscheiden en om abnormale celpopulaties met immature stam- of progenitorcellen te detecteren (36).

Andere beperkingen zijn dat recupererende beenmergcellen soms verkeerdelijk kunnen opgevat worden als afwijkende cellen omdat zij ook een significant aantal antigenen delen met de blasten in een patiënt. De immunologische leukemische 'vingerafdruk' kan tevens veranderen door (chemo)therapie. Dit leidt tot inconsistente expressie van MRD-merkers die bij diagnose als belangrijk worden geklasseerd bij een welbepaalde patiënt. Tijdens ziekte-evolutie gaan ze verloren en verliezen in belang ten opzichte van andere mogelijks nieuwe optredende merkers (22, 36). Maar in de meeste AML-patiënten zijn LAIP's die aanwezig zijn bij diagnose ook aanwezig bij herval. Deze zaken kunnen vals-negatieve resultaten opleveren en zodus het missen van herval of uitstel van vroege detectie van herval (2, 6).

In een vergelijkende studie van Inaba tussen de resultaten van morfologisch onderzoek van een beenmerguitstrijkje, flowcytometrische analyse van LAIP's en PCR-amplificatie van oncogene fusietranscripten blijkt een zwakke correlatie tussen deze 3. Een aanzienlijke proportie van de stalen met negatieve of onduidelijke morfologie hadden blasten bij flowcytometrisch onderzoek (23). MFC toont ons hier de tekortkoming van morfologische detectie voor betrouwbare bepaling van de remissiestatus (3). Bovendien had de meerderheid van de stalen met transcripten, negatieve flowcytometrische resultaten. Het merendeel van de positieve stalen op morfologie hebben ook een hoog MRD-gehalte bij MFC. Tevens stelt Inaba dat de resultaten van MFC sterk geassocieerd zijn met de klinische uitkomst (23). MFC biedt bovendien meer informatie bij CBF dan moleculaire detectie van fusietranscripten omdat RUNX-RUNX1T1 en CBF $\beta$ -MYH11 transcripten kunnen blijven bestaan gedurende CR zonder verslechterde prognose (27).

Standaardisatie van de beste methode, tot op vandaag MFC, is vereist op vlak van staalverwerking (gebruikte analyse), antilichamenpanelen met breedspectrum antilichamen voor detectie, instrumentconfiguratie, selectie van fluorochromen, aantal events die nodig zijn om zeldzame collecties ook te detecteren die zorgen voor het herval en het tijdstip van evaluatie (inductie, einde van inductie, einde van consolidatie). Men dient ook aandacht te besteden aan het voldoende testen van antilichamenpanels, uitgebreide kennis van de normale antigenexpressie, opleiding klinici, onvoldoende sensitiviteit in vergelijking met PCR, immunofenotypische shifts, moeilijkheden in de identificatie en het staaltype (perifeer bloed of beenmerg) (5, 22).

Een alternatieve methode om leukemische blasten te identificeren met flowcytometrie naast identificatie van LAIP's, is de '*different-from-normal approach*'. Hierbij worden expressiepatronen van genen vergeleken met expressiepatronen gedurende normale

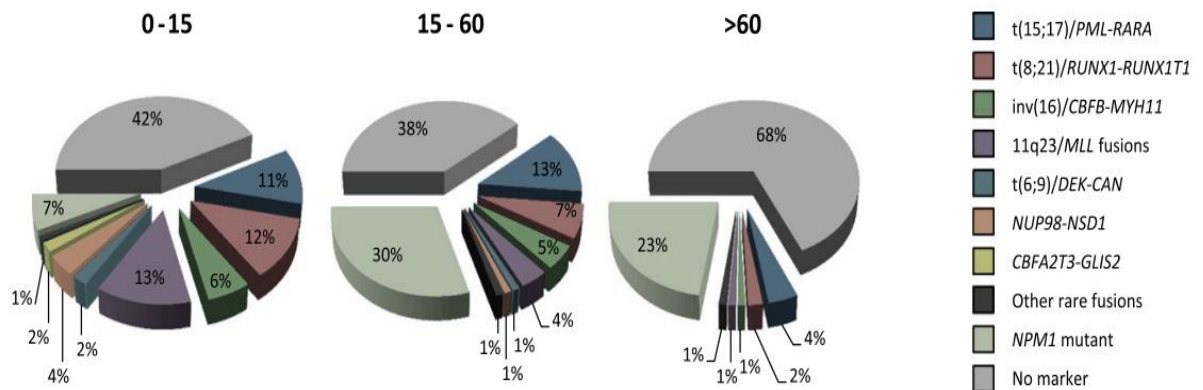
differentiatie en maturatie van progenitorcellen. Er zijn daarmee voorspelbare sequentiële wijzigingen in de eiwitten op het celoppervlak geassocieerd. Residuele myeloblasten wijken af van deze normale patronen. Het zijn cellen met specifieke antigenencombinaties die clusteren in het MFC-plot waar normale cellen afwezig zijn (35, 40). De meeste evidentie voor deze methode komt van bij de pediatrische patiënten, en moet dus met voorzichtigheid geïnterpreteerd worden in geval van volwassen patiënten (38).

Een andere toekomstige aanpak die gebruik maakt van MFC kan het proberen voorspellen en opsporen zijn van subpopulaties aanwezig bij diagnose die geneigd zijn om therapieresistent te zijn en herval te veroorzaken. Er wordt aangenomen dat leukemische stamcellen (LSC) (CD34+ en CD38-) hier een belangrijke rol in spelen omdat bij hogere aantallen er een slechtere uitkomst wordt gezien. CD34+ en CD38- is een immunofenotype dat gedeeld wordt met hematopoëtische stamcellen. Als men de leukemische stamcellen vergelijkt met hun normale afgeleiden, dan zijn verscheidene oppervlakkige celmerkers anders geëxprimeerd die kunnen gebruikt worden om LSC op te sporen. Men zal zich dus in de toekomst verder op deze subpopulaties focussen aangezien een laag gehalte een betere prognose geeft, aangetoond in een studie van Terwijn. Net zoals LAIP's, kunnen LSC verschillen tussen verschillende patiënten en binnenin één patiënt (5). Andere subpopulaties die een relevante rol kunnen spelen zijn deze met een lage frequentie op het moment van diagnose. Verdere inzichten in het proces van preferentiële overleving van welbepaalde subpopulaties is vereist om de risicostratificatie en prognose te verbeteren (35). Naast dit verschijnen of verdwijnen van merkers, is de detectie van elke residuele mutatie na inductietherapie voorspellend voor herval (na transplantatie) en overleving (41).

### 2.2.3. Polymerase kettingreactie

Polymerase kettingreactie wordt gehanteerd voor het opsporen van overexpressie van genen (bijvoorbeeld WT1) en leukemiespecifieke transcripten die men terug vindt bij fusiegenen die pathognomonisch blijken te zijn voor leukemie zoals RUNX1-RUNX1T1, CBF $\beta$ -MYH11 en bij NPM1 mutaties (5, 6, 13, 29). Gemiddeld vindt men bij een AML-type meer dan 10 mutaties en meer dan 200 genen worden gebruikt als doelwit bij recurrente mutaties. Deze grote diversiteit vormt een uitdaging om individuele genetische afwijkingen of combinaties van merkers op te sporen om prognostische informatie te bieden (3). Bij meer dan 40% van de kinderen en meer dan 60% van de volwassenen met AML kan men geen moleculaire merker vinden (6). Er is bovendien slechts een klein aantal patiënten met reciproke translocaties. Hierdoor kan deze techniek slechts bij 25% van de patiënten gebruikt kan worden volgens Anthias en Cruz in tegenstelling tot de studie van Wing Leung waar dit maximaal 10% bedraagt en de studie van Hourigan waar 60% van de AML-patiënten onder de 60 jaar hiervan gebruik kan maken (5, 29, 36, 39). De fusiegenen zijn ziektespecifiek, extreem stabiel tussen diagnose

en herval en hebben een hoge gevoeligheid (5). Moleculaire merkers zijn wel minder relevant als MRD-merker bij AML, maar indien aanwezig is PCR eerste keuze voor detectie (5, 39). De klinische relevantie van moleculaire remissie wordt hoofdzakelijk beperkt door de kleine hoeveelheid patiënten die baat hebben bij moleculaire monitoring (22). In *Figuur 5* worden de meest courante leukemiespecifieke moleculaire merkers volgens leeftijd weergegeven (3).



Figuur 5: Aandeel van AML-patiënten dat in aanmerking komt voor MRD-detectie met behulp van PCR van de volgende leukemiespecifieke MRD-merkers volgens leeftijd (3)

Bij AML bestaat er geen eenduidige mutatie zoals BCR-ABL1 bij CML, wat het enthousiasme voor MFC verklaart ondanks de beperkingen. Er worden verscheidene mutaties gevonden in AML en men ontwikkelt gestandaardiseerde PCR-gebaseerde analyses voor de meest voorkomende RNA-transcripten zoals PML-RARA bij t(15;17) bij APL, RUNX1-RUNX1T1 en CBF $\beta$ -MYH11 geassocieerd met t(8;21) of inv(16) in CBF-leukemie. Deze testen zijn erg gevoelig maar vals-negatieve resultaten zijn altijd mogelijk (36). Een aanzienlijk deel van AML-types hebben recurrente chromosomale afwijkingen die sleutelgenen in de hematopoïese bevatten. PCR voor abnormale fusietranscripten (PML-RARA, CBF $\beta$ -MYH11, RUNX1-RUNX1T1) en MLL herschikkingen heeft de hoogste gevoeligheid, namelijk tot  $10^{-6}$  (6, 39). Analyses voor een sterk geëxprimeerd NPM1 kunnen zelf een sensitiviteit tot  $10^{-7}$  bereiken door de hoge expressie van gemuteerde allelen (11, 24). Stijging in de aantallen van deze oncogene fusietranscripten is geassocieerd met een hogere kans op herval (23). De gemiddelde sensitiviteit van PCR schommelt tussen  $10^{-4}$  en  $10^{-6}$  (5, 29). De gevoeligheid varieert sterk naargelang de doelsequentie die geamplificeerd moet worden, de primercombinatie en de kwaliteit van de nucleïnezuurextractie (22). Naast de hoge gevoeligheid is PCR ook relatief goedkoop en snel (5).

Het Wilms tumor 1-gen (WT1) is een tumorsupressorgen dat codeert voor een transcriptiefactor die cellulaire groei en metabolisme reguleert. Het kan eveneens een invloed uitoefenen op de celoverleving, proliferatie en differentiatie en dus fungeren als oncogen. Dit

gen is ontdekt bij de ontrafeling van de pathogenese van de Wilms tumor maar de exacte functie blijft ongekend. Men vermoedt een rol in de bloedaanmaak. De normale expressie van WT1 is beperkt tot de vroege progenitorcellen (CD34+) en is afwezig in mature, gedifferentieerde cellen. De WT1-expressie is laag en soms niet detecteerbaar in gezond perifeer bloed en beenmerg. Bij hematologische maligniteiten is de expressie hoog. Mutaties in het WT1 gen zijn vrij frequent in AML en worden beschouwd als secundaire genetische afwijkingen, die later optreden in de AML-pathogenese. Het gevolg hiervan is toegenomen celdeling en gestoorde celdifferentiatie (15). Overexpressie komt bij meer dan 90% van de patiënten voor. Het gehalte in bloed of beenmerg is voorspellend na eerstelijns therapie en voor en na transplantatie (2). WT1-overexpressie kan gedetecteerd worden met PCR maar slechts bij een beperkt aandeel patiënten. Bovendien kan WT1 beïnvloed worden door fysiologische achtergrondexpressie (23, 39). Hierom combineert men WT1 als een panleukemische moleculaire merker best met een additionele MRD-parameter (42, 43). De sensitiviteit van WT1-expressie schommelt rond  $10^{-4}$  (42). Overexpressie van dit gen is een onafhankelijke ongunstige factor voor het bekomen van complete remissie. Het is geassocieerd met therapieresistentie en een kortere ziektevrije overleving en OS en heeft dus prognostische implicaties. Onderzoek toont aan dat bij sommige patiënten in complete remissie het WT1 level daalt tot soms onder het gehalte bij gezonde personen. WT1 is dus bruikbaar als MRD-merker (15).

Mutaties in het nucleophosminegen (NPM1) vindt men bij 30% van de volwassen patiënten en bij 7% van de kinderen met AML (6, 22, 42). Volgens de WHO classificatie vindt men deze mutatie in 50-60% van de gevallen van cytogenetische normale AML (14). De aanwezigheid van een minimale ziekterest gedefinieerd door NPM1 transcripten geeft prognostische informatie, een toename is geassocieerd met een hogere kans op herval. Men spreekt van moleculair herval als men stijgende levels van NPM1-gemuteerde transcripten terug vindt in 2 opeenvolgende stalen zonder hematologisch herval (32).

De prognose wordt eveneens beïnvloed door een internele tandem duplicatie in genen die coderen voor het FMS-achtige tyrosine kinase (FLT3-ITD) en gemuteerd DNA-methyltransferase 3A (DNMT3A). Patiënten met NPM1-mutatie zonder FLT3-ITD hebben een relatief gunstigere prognose dan met FLT3-ITD en komen niet meer in aanmerking voor transplantatie in CR. Gemuteerd NPM1 in combinatie met FLT3-ITD en gemuteerd DNMT3A heeft een minder goede prognose en zal belang hebben bij transplantatie in CR1. Dit mede omdat chemotherapie effectief is voor NPM1 maar enkel HSCT is effectief bij gemuteerd DNMT3A (32). De sensitiviteit voor FLT3-ITD mutatie schommelt tussen  $10^{-3}$  en  $10^{-4}$  (5).

De aanwezigheid van hoge aantallen transcripten van RUNX1-RUNX1T1 en CBF $\beta$ -MYH11 bij CBF-leukemie is tevens gerelateerd aan een hogere kans op herval in welbepaalde studies, voornamelijk bij detectie tijdens consolidatietherapie of later. Lane en collega's stelt daarentegen dat de hoeveelheid transcripten van RUNX1-RUNX1T1 en CBF $\beta$ -MYH11 na inductie en consolidatie niet voorspellend is. Een toename van  $\geq 1 \log_{10}$  stemt in hun onderzoek wel overeen met een slechtere leukemievrije overleving en naderend herval. MRD blijkt hier dus enkel informatief te zijn bij herhaalde metingen. Er heerst nog geen consensus over het feit dat deze diagnostische transcripten al dan niet prognostische informatie kunnen bieden. De interpretatie van de resultaten en de waarde van moleculaire monitoring is dus beperkt bij deze subtypes AML en wordt beter vervangen door MFC als er een betrouwbare analyse voor handen is (23, 44).

Het gebruik van somatische mutaties voor MRD-detectie stuit tevens op een aantal problemen. Op het moment van diagnose is er genetische heterogeniteit die evolueert gedurende de ziekte met de mogelijkheid van selectie van minor subklonen tijdens herval. Verder kunnen gemuteerde genen zoals DNMT3A, TET2 en ASXL1 ook teruggevonden worden bij gezonde mensen zonder hematologische ziekten vaak gerelateerd aan toenemende ouderdom. Buitendien blijven bepaalde hematologische afwijkingen bestaan bij patiënten in complete remissie waarschijnlijk door residuele preleukemische cellen of expansie van normale cellen met ouderdomsgerelateerde somatische mutaties (36).

De klinische bruikbaarheid van het moleculair opsporen van MRD staat voorlopig nog in zijn kinderschoenen. Standaardisering en inbreng van verschillende centra zullen nodig zijn om gemeenschappelijk protocollen op te stellen voor MRD-detectie met PCR. Belangrijk om op te merken is dat de PCR-status niet direct correleert met de prognose bij AML. Hoge levels MRD in stamcelcollecties uit het perifeer bloed met een afwijkend immunofenotype doen dit wel. Met de meest sensitieve kwantitatieve PCR kan PCR-negativiteit onnodig zijn en als irrationeel doel worden bevonden. Dit omdat de uitkomstpredictie door PCR gemengd is: detectie van MLL fusietranscripten voorspelt herval terwijl RUNX1-RUNX1T1 en CBF $\beta$ -MYH11 transcripten in vele patiënten in lange termijnsremissie persisteren en de interpretatie onduidelijk is (23). Aanwezigheid van MRD bij kwantitatieve PCR geeft dus geen voorspelling naar de uitkomst en moet geïnterpreteerd worden in de context van heterogeniteit tussen patiënten en inherente variabiliteit na PCR-detectie. Interindividuele variabiliteit merkt men door verschillende grootte van ziekte-eliminatie en hoeveelheid blasten bij diagnose. Evenals verschilt de kinetiek van reductie van moleculaire subklonen waardoor men variabele persistentie of evolutie ziet van minor klonen (22).

#### 2.2.4. Cytogenetica

30 tot 40% van de AML-patiënten heeft een normaal karyotype, gedefinieerd als CN-AML (22). MRD-positieve patiënten hebben een sterkere trend naar abnormale cytogenetica (45). Cytogenetische detectie van MRD heeft een lage gevoeligheid, zelfs indien gecombineerd met FISH. Maar gecombineerd met FISH is er wel een grotere gevoeligheid bij het opsporen van specifieke chromosomale afwijkingen hoofdzakelijk bij slechte chromosoommorfologie en lage of geen opbrengst van metafasecellen. De sensitiviteit van FISH ( $10^{-3}$ ) is 100 maal hoger dan deze van cytogenetica maar is te laag voor MRD-detectie, gewenst is  $10^{-5}$  (22). Een belangrijke beperking zijn de lage ziekteniveaus gelegen onder detectielimiet van FISH, die dienen opgespoord te worden met PCR. Hoeveel FISH exact bijdraagt van prognostische informatie is onduidelijk maar bij AML is de winst door FISH relatief klein (46). Cytogenetische analyse kan helpen om de natuur van de blasten te verduidelijken als ze in hoge aantallen aanwezig zijn. Doch de sensitiviteit is gelimiteerd in vergelijking met MFC (23). Als cytogenetica faalt kan men nog gebruik maken van FISH voor genherschikkingen, genfusies en het verlies van chromosoommateriaal op te sporen (24).

#### 2.2.5. Next generation sequencing

AML was een van de eerste maligniteiten die extensief bestudeerd is met '*sequencing-technologieën*'. Het eerste AML-genoom dateert van 2008. Exoomsequencing van blasten op het moment van diagnose kan leukemiespecifieke mutaties identificeren in bijna alle patiënten, die kunnen gebruikt worden voor MRD-detectie (11). Het gebruik van unieke doelwitten voor moleculaire MRD-detectie blijft dominant in het onderzoeksveld maar er is nood aan een economisch alternatief (5).

Het aantal recurrenente mutaties per patiënt is gemiddeld 5. Volgens een onderzoek van Shen hebben 25% van de AML-patiënten geen fusiegenen of somatische mutaties in de 12 meest gemuteerde genen hetgeen een probleem vormt om moleculaire merkers voor PCR te vinden maar wordt overkomen door exoomsequencing (6). Meer specifiek heeft 42% onder de 15 jaar, 38% tussen de 15 en de 60 jaar en 68% boven de 60 jaar geen moleculaire merker bruikbaar voor MRD-detectie. Verder is het onmogelijk om gestandaardiseerde analyses te ontwikkelen per patiënt door het gebrek aan '*hotspots*' bij bepaalde frequent gemuteerde genen zoals RUNX1 en het niet zeker is dat een elke mutatie bij diagnose ook de mutatie zal zijn die herval veroorzaakt. NGS bereikt een gevoeligheid van  $10^{-2}$ - $10^{-4}$  (5).

NGS is toepasbaar bij zo goed als alle patiënten omdat het alle aanwezige mutaties kan traceren onafhankelijk van genomische lokalisatie (41). Het primaire doel is om mutaties voor MRD-analyse op te sporen die niet aanwezig zijn in normale granulocyten. De sensitiviteit van NGS hangt af van de hoeveelheid DNA, de natuur van de doelmutatie (minder vals-positieven

bij een insertie dan bij een *'single nucleotide variaton'* maar er is variatie tussen platforms) en technische beperking (6). De accuraatheid zal beduidend toenemen als de genenset uitgebreid wordt (41).

Bij NGS vindt men een hogere schatting van de leukemielast dan bij MFC omdat niet alle leukemische cellen een immunofenotype dragen die discriminatie met andere gezonde cellen toelaat. De mutaties gebruikt bij NGS zijn aanwezig in alle blasten. Bij MFC is voornamelijk immunofenotypische shift het probleem, bij NGS is het klonale evolutie. Nochtans blijken de meeste somatische mutaties in AML genetisch stabiel te zijn dan andere tumorgenomen. Zo blijken mutaties in RUNX1 enkel bij een miniem aantal patiënten niet meer aanwezig te zijn bij herhaal. Langs de andere kant zijn FLT3 mutaties vrij onstabiel bevonden. In klonale hematopoïese in gezonde volwassenen zijn DNMT3A, TET2, IDH1/2 en ASXL1 de genen die het meest gemuteerd zijn, deze zijn ook wederkerend gemuteerd in AML. Zodus zijn mutaties in genen die betrokken zijn in AML leukemiegenese niet altijd leukemiespecifiek en bruikbaar voor MRD-detectie (6). DNMT3A kan zo persisteren in een ongewijzigd gehalte na chemotherapie gedurende remissie (11). Oudere personen met DNMT3A, TET2, IDH1/2 en ASXL1 hebben dus een verhoogd risico op hematologische kanker want deze mutaties zijn geassocieerd met klonale hematopoëtische expansie. De progressie van deze bloedaanmaak is gelijkaardig aan de progressie van andere premaligne aandoeningen zoals monoklonale gammopathie. Deze mutaties op zich zijn onvoldoende voor het ontstaan van leukemie (24).

*'Sequencing'* op verscheidene tijdstippen bevestigt tevens de specifieke volgorde waarin mutaties verworven worden. De eerste mutaties verschijnen hoofdzakelijk in genen betrokken in de epigenetische modulatie zoals DNMT3A, TET2 en ASXL1. Deze zijn zoals vermeld onvoldoende om leukemie te veroorzaken maar bieden wel replicatieve voordelen aan aangetaste bloedcellen. Daaropvolgend verschijnen er mutaties in genen betrokken in de signaaltransductie zoals FLT3 en RAS, die wel het potentieel hebben om leukemie te induceren (41).

NGS is aan een opmars bezig voor de implementatie bij MRD-detectie echter er zijn beperkingen om onmiddellijke applicatie bij myeloïde maligniteiten toe te laten. Primo is er stijgende evidentie dat somatische mutaties die recidiverend geobserveerd worden bij AML-patiënten niet ziekte-definiërend zijn want zij zijn ook aanwezig bij lange termijnsremissie en gezonde volwassenen. Vervolgens is NGS een snel evoluerende wetenschappelijk domein waardoor de oppuntstelling geenszins compleet is en standaardisatie en validatie vereist is. Verder neemt NGS 1-2 weken in beslag i.t.t. een duur van 1-3 dagen bij MFC en PCR. Desondanks deze limitaties zal NGS waarschijnlijk naast PCR en MFC in de toekomst een grote rol gaan spelen in het beleid van AML diagnostiek en therapietoezicht na verdere



oppuntstelling (5, 37, 38). Een overzicht van de voor- en nadelen van alle aangehaalde methoden is weergegeven in *Tabel 3*.

Tabel 3: Overzichtstabel met voor- en nadelen per methode voor MRD-detectie

Voordelen	Nadelen
<b>Morfologie</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Goedkoop</li> <li>- Snel (binnen de dag)</li> <li>- Veel ervaring bij onderzoekers</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Morfologische remissie ≠ complete remissie</li> <li>- Misinterpretatie</li> <li>- Onmogelijkheid tot interpretatie</li> <li>- Grote subjectieve factor</li> <li>- Lage gevoeligheid</li> <li>- Geen morfologisch onderscheid tussen leukemische en normale blasten</li> <li>- Nood aan expertise/ervaring</li> <li>- Variatie in distributie blasten</li> </ul>
<b>Meerkleurenflowcytometrie</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wijde toepasbaarheid</li> <li>- Snel (1-3 dagen)</li> <li>- Kwantificatie van abnormale celpopulaties</li> <li>- Onderscheid tussen dode/levende cellen en abnormale/normale celpopulaties</li> <li>- Sensitiviteit <math>10^{-3}</math>-<math>10^{-5}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fenotypeshift</li> <li>- Nood aan uitgebreide kennis van normale en afwijkende fenotypes</li> <li>- Misinterpretatie</li> <li>- Geen standaardisatie</li> <li>- Opleiding pathologen, expertise/ervaring vereist</li> <li>- Vrij duur</li> </ul>
<b>Polymerase kettingreactie</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fusiegenen zijn ziektespecifiek, stabiel</li> <li>- Sensitiviteit <math>10^{-4}</math>-<math>10^{-6}</math></li> <li>- Relatief goedkoop</li> <li>- Snel (1-3 dagen)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Beperkte toepasbaarheid door afwezigheid moleculaire merker</li> <li>- Vals-negatieve resultaten</li> <li>- Selectie minor subklonen</li> <li>- Klonale evolutie</li> <li>- Geen standaardisatie</li> <li>- Onduidelijke correlatie met prognose</li> </ul>
<b>Cytogenetica</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Natuur blasten verduidelijken</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensitiviteit</li> </ul>

Next Generation Sequencing	
- Identificatie leukemiespecifieke mutaties in quasi alle patiënten	- Klonale evolutie
- Mutaties aanwezig in alle blasten	- Mutaties zijn niet altijd leukemiespecifiek
- Sensitiviteit $10^{-2}$ - $10^{-4}$	- Geen standaardisatie
	- Traag (1-2 weken)

### 2.3. Productspecificaties

MRD-metingen op beenmerg geven een meer betrouwbaar resultaat en hebben een grotere sensitiviteit dan metingen op perifere bloed (5, 13). Het MRD-gehalte is 100x hoger bevonden in beenmergstalen in vergelijking met perifere bloedstalen, in ALL is dit omgekeerd (22). Nog een argument die hiervoor pleit is indien de tijd wordt gemeten tussen de aanwezigheid van de eerste moleculaire ziekterest en herstel, dan is deze langer bij detectie op beenmerg in vergelijking met detectie op perifere bloed. Evenwel is het MRD-gehalte in perifere bloed sterk informatief bij patiënten in complete morfologische remissie (32). Daarnaast moet men bij seriële opvolging zorgen voor consistent onderzoek in een welbepaald type weefsel (22).

Hourigan stelt dat patiënten die gevolgd worden met als belangrijkste merker RUNX1-RUNX1T1 transcripten op PCR, het best gevolgd worden op beenmergstalen na voltooiing van consolidatietherapie. Gemuteerd NPM1 bij PCR als dominante merker wordt beter op bloedstalen na de tweede cyclus van chemotherapie uitgevoerd, dit blijkt meer accuraat te zijn. Het gebruikte staal (volume, bloed, beenmerg), het herstel van het aantal bloedcellen (complete remissie versus remissie met incompleet herstel), de frequentie van MRD-testen en het tijdstip (bijvoorbeeld na inductie versus na remissie) oefenen allemaal invloed uit op correlatie tussen overleving en MRD. Men merkt dat optimale timing en correcte stalen dus een rol spelen en verder onderzoek hiernaar is essentieel (36)

Toch zal zelfs de beste analyse pas accurate resultaten opleveren als de weefselbron van goede kwaliteit is. De impact van weefselkwaliteit op het te detecteren gehalte MRD is veel groter dan men denkt (27). De kwaliteit van het weefsel wordt bepaald door de ouderdom van het staal en de opslagcondities. Dit vraagt vooral extra aandacht bij transport tussen verschillende referentielaboratoria, controles binnen eenzelfde labo kan dit vermijden (3). Ingeval dit onmogelijk is dient het transport dus snel te gebeuren en een internele kwaliteitscontrole is aangeraden. Bij PCR resulteert dit in inclusie van huishoudgenen als controle en bij MFC inclusie van viabiliteitsmerkers (37).

Vervolgens oefent de techniek van het mergaspiraats een grote invloed uit op het MRD-gehalte door hemodilutie. Bij ALL-patiënten is het duidelijk dat enkel het eerste aspiraat van een bepaalde site kan gebruikt worden voor MRD-investigatie omdat bij daaropvolgende aspiraten

een significante graad van contaminatie (hemodilutie) met bloed optreedt. Deze gecontamineerde stalen hebben een lager aantal leukemische cellen maar kunnen wel nog voor andere doeleinden gebruikt worden. Het MRD-gehalte hangt tevens af van de hoeveelheid leukemische blasten op de plaats van aspiratie. Focale haarden, mergfibrose, klevende eigenschappen van de blasten kunnen een vals-negatief resultaat opleveren, onafhankelijk van het gebruikte analyse. Dit verklaart de onverwachtse slechte uitkomst in schijnbaar MRD-negatieve patiënten (27).

### **3. Moeilijkheden bij implementatie**

Er zijn heel wat zaken die interfereren met de ambitie om MRD als routinematige meting in de praktijk te gebruiken en niet enkel als medium in therapieprotocollen (37). Zo heeft men te kampen met de heterogeniteit van AML, vals-positieve en negatieve resultaten, het economisch aspect, de beperking van het gebruik van de technische sensitiviteit, de terughoudendheid bij clinici, het probleem van de cytogenetische en/of immunofenotypische en/of moleculaire shifts en de invloed van het tijdstip van MRD-bepaling. Dit alles draagt bij tot de complexiteit van MRD-interpretatie. Zo is in ongeveer 25% van de AML-patiënten de waargenomen uitkomst verschillend van deze die voorspeld wordt door MRD-bepaling na inductiechemotherapie (27).

#### 3.1. Heterogeniteit AML

Allereerst is AML geen op zich staande entiteit en heterogeen. Eén universele merker voor MRD-monitoring bij elke patiënt is niet doeltreffend. Men kan stellen dat elke AML-patiënt minstens 1 analyse heeft die bij hem/haar kan gebruikt worden. Interpatiënt- en intrapatiëntvariabiliteit dragen bij tot de moeilijkheid tot implementatie maar zijn niet onoverkomelijk (37).

#### 3.2. Vals-positieve en vals-negatieve resultaten

De biologische redenen voor een relatief gunstige prognose in schijnbaar MRD-positieve patiënten kan therapie geïnduceerde blastendifferentiatie zijn die leidt tot apoptose of door immuuntoezicht die voorkomt dat kleine aantallen blasten uitgroeien tot een kritisch hoeveelheid voor herval. Argumenten voor herval in schijnbaar MRD-negatieve patiënten kunnen selectieve uitgroei van een minor gemuteerde kloon zijn, instabiliteit van de diagnostische gemuteerde kloon of herverschijning van een leukemische kloon met voornamelijk snelle herval kinetiek dat gemist wordt door te infrequente MRD-monitoring. MRD-negativiteit kan tevens het gevolg zijn van het falen van detectie van blasten die herval induceren. Herval komt in AML meestal door de chemoresistente leukemische cellen of de preleukemische stamcellen die aanwezig zijn in aantallen onder de detectiegrens van standaard MRD-analyses (27).

Het is een foute veronderstelling dat technische vooruitgang van de MRD-testen de vals-negatieve resultaten zal voorkomen. De mogelijkheid tot detectie van lage hoeveelheden blasten is eerder te wijten aan het karakter en de grootte van het gebruikte staal en niet aan de gevoeligheid van de MRD-test (36). Gale argumenteert dat als er veel leukemische celen aanwezig zijn, het redelijk is dat 1 of meer van deze blasten gedetecteerd worden (27).

### 3.3. Economisch aspect

Economische aspecten hebben evenzeer invloed op het implementeren van MRD-monitoring. De kostprijs van PCR of MFC is beduidend hoger dan deze van morfologische microscopische evaluatie en deze prijzen lijken te stijgen. Desalniettemin zal de som van PCR en NGS dalen door toenemende automatisering met een verhoogde capaciteit. Met MRD kan men de therapierespons evalueren en beslissen tot verdere therapie of toezicht en zo minder zinvolle acties uitsluiten zoals transplantatie bij ongeschikte patiënten. Dit leidt tot ten minste één en misschien twee orden van grootte minder kosten (37).

### 3.4. Technische sensitiviteit

Remissie wordt gezien als de afwezigheid van detecteerbare ziekte maar deze is afhankelijk van de gevoeligheid van de methode voor ziektedetectie. Zodus zijn traditionele responscriteria gebaseerd op de technische sensitiviteit en amper op biologische ziekterest waardoor bijvoorbeeld twee patiënten in CR een duidelijk verschillend risico kunnen hebben op herval (37). Daar komt nog bij dat de grenswaarden van MRD-positiviteit bij MFC-onderzoek controversieel zijn. Ze zijn niet gestandaardiseerd en verschillen naargelang de detectiemethode, laboratorium en de vaardigheden van de operator (27). Hoewel dit een probleem vormt is dit nog steeds beter dan het gebruik van de technische detectielimiet (18).

### 3.5. Terughoudendheid clinici

Actueel heerst er onder clinici nog wat terughoudendheid om de standaardtherapie te wijzigen op basis van MRD-gegevens door de angst voor vals-positieve resultaten en therapiegerelateerde toxiciteit (27). Kennis en het begrijpen van MRD-bepaling en resultaten is een belangrijk luik zowel bij patiënten als clinici. Eens patiënten het concept begrijpen spaart dit veel tijd in latere consultaties. Artsen moeten investeren om de voordelen, nadelen, werking, mogelijkheden en het correct gebruik van MRD-detectiemethoden onder de knie te krijgen (37).

### 3.6. Cytogenetische, immunofenotypische en moleculaire veranderingen

Er bestaat een gerechtvaardigde angst dat elk initieel MRD-doelwit zowel cytogenetisch, immunofenotypisch als moleculair voor monitoring, geïdentificeerd op het moment van diagnose, kan verloren gaan op het moment van herval, door de instabiliteit van de tumorcellen (35, 37). Anderzijds kan de detectie van nieuwe wijzigingen bijdragen tot een meer specifieke MRD-detectie. Verschillen in antigenexpressie kunnen ook voorkomen door technische onnauwkeurigheden maar er is evidentie dat er ook effectief winst of verlies van antigenen kan zijn (35).

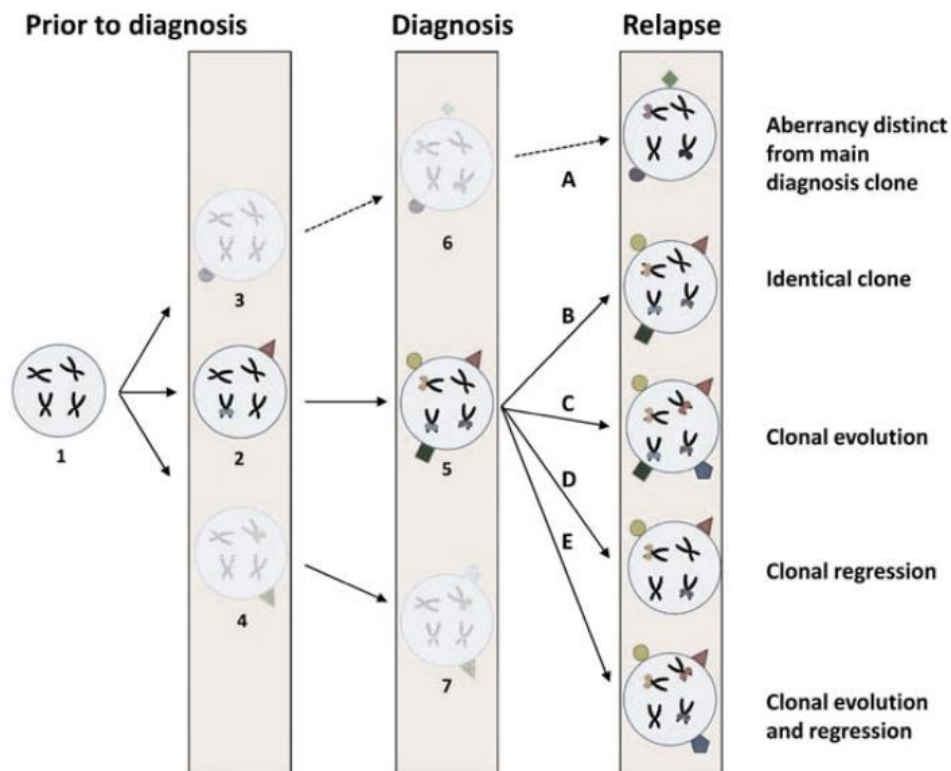
Moleculaire merkers kunnen pas later in het ziekteproces opduiken. Bijvoorbeeld FLT3-ITD kan zowel verschijnen als verloren gaan op het moment van herval. Initiërende drivermutaties

zoals gebalanceerde chromosale translocatie in CBF $\beta$  en mutaties in DNMT3A, TET2, ASXL1 zijn stabiel maar worden ook gevonden bij patiënten in lange termijnsremissie en in gezonde personen (35, 37). Mutaties in DNMT3A en TET2 hebben minder kans op klaring terwijl NPM1, FLT3 en IDH1/2-mutaties meer geneigd zijn om geklaard te worden (41). Daarom heeft FLT3-ITD als moleculaire merker slecht een beperkte plaats bij AML. Er wordt geen verlies gezien van KIT, WT1 en CEBPA-mutaties. Eén studie toont wel verlies van WT1 aan. Ondanks dat verlies van NPM1-mutaties wordt gezien, wordt dit als stabiele mutatie en volgbare merker beschouwd voor MRD. Het nieuw verschijnen van FLT3-ITD, RAS, CEBPA, WT1 en TP53 wordt ook gezien (35, 37). Wat de klinische relevantie is van residuele DNMT3A- of TET2-mutatie voor allogene transplantatie is nog niet volledig duidelijk. Patiënten met deze mutaties op het moment van diagnose hebben een grote kans om deze mutaties nog te hebben op het moment van transplantatie door de lage probabilliteit op klaring. Deze patiënten hebben geen MRD bij MFC, een lage kans op herval en geen baat bij MRD-monitoring van gemuteerd DNMT3A. Men spreekt van klonale remissie (41, 47). Twee mechanismen aangehaald voor klonale evolutie zijn enerzijds dat de kloon een bulk van primaire tumorcellen bevat die additionele mutaties verwerven en zo evolueren en herval veroorzaken en anderzijds de aanwezigheid van een minor subkloon op het moment van diagnose die de therapie overleeft, additionele mutaties verkrijgt en eveneens leidt tot herval (35).

LAIP's die wijzigen benoemt men met antigene shift. Dit komt voor bij 5-27% van de AML-patiënten waardoor het MRD-gehalte onderschat kan worden (35, 37). Verlies van CD11b, CD14 en CD15 komen frequent voor net als het verwerven van CD34 en CD117. Dit bevestigt dat de immunofenotypes meer immatuur zijn op het moment van herval, met een verhoogde expressie van CD34 en/of CD117, in vergelijking met deze op het moment van diagnose. Dit alles heeft belangrijke consequenties voor MRD-detectie, zoals vals-negatieve resultaten voornamelijk als alle LAIP's verloren gaan. Verlies van antigenexpressie resulteert niet noodzakelijk in een vals-negatief resultaat. Als een partieel verlies van MRD-merkers voorkomt waarbij het gehalte nog steeds boven de grenswaarde is, zullen MRD-waarden onderschat worden maar nog steeds positief zijn. Het tegenovergestelde, de winst van antigenexpressie kan ook voorkomen. Een nieuwe LAIP kan verworven worden tussen diagnose en herval. Er wordt geen significant verschil gevonden in ziektevrrije overleving tussen patiënten met of zonder immunofenotypische veranderingen (35).

De actuele mechanismen van immunofenotypische veranderingen blijven onduidelijk maar men weerhoudt ook hier twee mogelijke verklaringen: spontane wijzigingen in de primaire tumorkloon aanwezig bij diagnose en verschijning gedurende of na therapie of selectie van therapieresistente subpopulaties, alreeds aanwezig maar niet routinematig opgespoord bij diagnose. Mutaties in deze subpopulaties zorgen voor chemotherapieresistentie en herval.

Daarbij opgemerkt is de subpopulatie gedefinieerd door aanwezigheid van CD34 (CD34+) en afwezigheid van CD38 (CD38-) zeer relevant voor identificatie bij diagnose omdat deze vaak cytoreductieve therapie overleeft. In *Figuur 6* wordt een schematisch overzicht gegeven van het mechanisme van immunofenotypische en moleculaire shifts (35).



**Figuur 6:** Moleculaire en immunofenotypische veranderingen tussen diagnose en herval  
 Cellen 2-4: preleukemische cellen en cellen 5-7: diagnostische klonen bestaande uit verschillende heterogene groepen cellen met welbepaalde specifieke afwijkingen. Moleculaire afwijkingen worden aangetoond door symbolen in de chromosomen, immunofenotypische afwijkingen door symbolen op het celoppervlak. Cel 5 stelt de diagnostische leukemische kloon voor die geëvolueerd is uit cel 1 zonder detecteerbare abnormaliteiten. Leukemische cellen op het moment van herval zijn vaak afgeleid van deze kloon (lijn B). Bij klonale evolutie heeft de kloon op het moment van herval nog steeds de initiële aanwezige moleculaire/immunofenotypische afwijkingen maar heeft ook nieuwe verworven (lijn C). Bij klonale regressie, gaan er afwijkingen verloren (lijn D). Soms komen beide fenomenen samen voor (lijn E). In lijn C-E lopen de immunofenotypische wijzigingen parallel met de moleculaire. Minder frequent worden moleculaire en immunofenotypische wijzigingen die totaal verschillend zijn van de diagnostische leukemische kloon op het moment van herval gedetecteerd, (lijn A). Deze kunnen voortkomen uit een preleukemische kloon (cel 3) en kunnen detecteerbaar zijn op het moment van diagnose als een minor kloon met extra wijzigingen. De ontwikkeling van minor moleculaire klonen kan geassocieerd zijn met immunofenotypische afwijkingen die verschillend zijn van de primaire diagnostische kloon. Tijdens de evolutie (lijn A) kunnen deze minor klonen wijzigen of uitsterven na diagnose (35)

Verscheidene studies bevestigen dat cytogenetische afwijkingen tevens verloren kunnen gaan (0-11%) of kunnen verschijnen (15-30%) zelfs in éénzelfde patiënt. Patiënten met een ongunstig karyotype hebben een grotere kans op verandering, deze blijken bovendien jonger te zijn. Niet elke studie bevestigt dit. Cytogenetische instabiliteit is gecorreleerd met een slechte uitkomst, een slechtere OS en de tijd tot herval is beduidend korter bij karyotype

evolutie in tegenstelling tot een stabiel of regresserend karyotype. Andere studies vinden hier geen verschil, er is nog geen consensus bereikt (35).

Alle 3 de fenotypes kunnen wijzigingen vertonen tijdens follow-up en leiden tot potentiële vals-negatieve resultaten, als deze parameters alleenstaand worden gebruikt voor MRD-detectie. De aanwezigheid van wijzigingen in alle 3 de fenotypes tussen diagnose en herval kan wijzen op een sterke relatie tussen hen. Men vermoedt dan ook een correlatie tussen moleculaire, cytogenetische en immunofenotypische shiften. Hierom kan men anticiperen dat bepaalde mutatieshiften samengaan met immunofenotypische switchen. Bijvoorbeeld FLT3-ITD met/zonder NPM1 mutatie wordt vergezeld van specifieke immunofenotypische afwijkingen. Immunofenotypering kan dan gebruikt worden voor identificatie van moleculaire en cytogenetische merkers en omgekeerd. Toekomstige studies zullen zich baseren op de parallelle detectie van een brede waaier aan immunofenotypische, cytogenetische en moleculaire merkers en combinaties hiervan, om te kijken hoe deze elkaar beïnvloeden. Een grote technische vooruitgang is reeds geboekt doordat men het gehele kankergenoom kan screenen met NGS en zo de klonale evolutie en selectie in AML kan bestuderen. Deze vermoedens moet men met voorzichtigheid interpreteren aangezien slechts een beperkt aantal studies onderzoek heeft gevoerd naar dit mogelijks verband zonder het aan te tonen (35).

Twee mogelijke benaderingen voor de vals-negatieve resultaten worden voorgesteld. Als eerste optie kan men de meest voorkomende immunofenotypische en moleculaire afwijkingen op het moment van diagnose en follow-up meten in plaats van enkel de initieel aanwezige afwijkingen. Als men tijdens follow-up het hele panel van afwijkingen controleert kunnen er eventuele subpopulaties die later zouden verschijnen gedetecteerd worden. De tweede optie is het gebruik van de *'different-from-normal approach'*. Hierdoor kan verandering in het immunofenotype gedurende de therapie gedetecteerd worden. Een uitgebreide kennis van de normale expressiepatronen is een must. Studies die deze techniek hanteren rapporteren nog steeds 25-30% vals-negatieve resultaten, vergelijkbaar met het aantal bij het gebruik van LAIP's (35).

### 3.7. Tijdstip van MRD-bepaling

Er zijn verschillende methodes voorhanden om MRD op te sporen maar de gevoeligheid verschilt naargelang het tijdstip waarop de MRD-detectie gebeurt. Rossi beschrijft de optimale tijdstippen om MRD te bepalen per methode. MFC wordt hoofdzakelijk gehanteerd voor transplantatie, WT1 expressie na transplantatie. Indien beide methodes op hetzelfde moment worden uitgevoerd kan er discordantie optreden (30, 42). MFC heeft een hogere sensitiviteit, specificiteit, positieve predictieve en negatieve predictieve waarde tot 1 maand na transplantatie in vergelijking met WT1 expressie. Vanaf 3 maand na transplantatie vindt men



een hogere diagnostische performantie van WT1 expressie. MFC wordt dus gehanteerd vanaf 30 dagen voor transplant tot 30 dagen na transplant, na 90 dagen wordt onherroepelijk overgeschakeld op WT1 expressie. Men dient op te merken dat er dus een grijze zone aanwezig is (30). Bastos-Oreiro stelt eveneens in zijn onderzoek dat vanaf 1 maand na transplantatie MFC niet meer bruikbaar is om herval te voorspellen want de ongelijkheden in ziektevrije en OS tussen MRD-positieve en MRD-negatieve patiënten is statistisch niet meer significant (2). In andere studies wordt dit dan wel nog posttransplant gehanteerd (42).

Detectie van MRD is gerelateerd met een kortere ziektevrije overleving, los van het feit of de meting een maand voor of na transplantatie gebeurt. Deze conclusie vindt men niet overal, dit kan te wijten zijn aan variërende grenswaarden. Patiënten met meer dan 100 kopijen WT1 voor en achter transplantatie vertonen meer herval, de waarde achter transplantatie heeft wel de hoogste prognostische waarde (30). In een studie van Buccisano stelt men dat het MRD-gehalte gemeten met PCR meer prognostische relevantie heeft op latere tijdstippen. Men merkt ook op dat de hervalkinetiek verschillend is tussen moleculaire subgroepen. Zo zal CBF $\beta$ -MYH11 een tragere hervalkinetiek hebben dan andere moleculaire afwijkingen. Bij MFC blijkt het ideale tijdstip veel moeilijker te bepalen in dit onderzoek (28). Cruz raadt aan om MRD-detectie met MFC uit te voeren tussen de eerste 14 tot 16 dagen na inductiechemotherapie voor risicostratificatie en na consolidatie voor meer accurate prognose. Bij PCR en NGS blijkt het optimale tijdstip nog onduidelijk in dit werk (5).

MRD-metingen blijken trouwens minder predictief te zijn naargelang de tijd vordert (30). MRD is logischerwijs meer prevalent in vroege therapiefases (23). Tijdens de diagnose is het leukemische fenotype erg duidelijk maar bij remissie daalt specificiteit en sensitiviteit door het kleine aantal resterende blasten (38). Het tijdstipschema voor het monitoren kan gebaseerd worden op de hervalkinetiek per subtype AML (37).

Niet enkel het tijdstip van MRD-testen maar tevens de frequentie speelt een rol bij performantie. Valse resultaten komen meer voor bij enkele metingen dan bij het opvolgen van evolutie. Opnieuw evalueren verlaagt de kans op valse resultaten. Ondanks het gegeven dat herhaalde metingen kunnen leiden tot discordante resultaten, kunnen deze meestal verklaard worden door een bemonsteringsfout. Het ideale test-interval en duur van sequentiële MRD-detectie is niet gekend en kan afhankelijk zijn van het type AML of het interval sinds het bekomen van remissie (36).

## 4. Klinische relevantie MRD

### 4.1. Algemeen

Zoals reeds gezegd zijnde verleent de MRD-status binnen elke conventionele risicogroep additionele onafhankelijke prognostische informatie (13). MRD-monitoring geeft de mogelijkheid om patiënten in CR1 en volgende, in te delen in verschillende cohortes met verschillende kans op herval. De informatie die de minimale ziekterest biedt, helpt om de prognostische risicostratificatie oorspronkelijk gebaseerd op ziektebiologie te vervangen (37). Alle studies zijn het eens dat de aanwezigheid van een minimale ziekterest gecorreleerd is met een hogere kans op herval. De OS is bovendien beduidend lager bij MRD-positiviteit in CR1 en CR2 (18). Minimale ziekterest is de krachtigste voorspeller van herval en overtreft beslist de prognostische waarde van het aantal witte bloedcellen (13). Het percentage en aanwezigheid van blasten beïnvloedt de relatie tussen MRD bij MFC en de prognose niet (23, 27). MRD bij MFC is een significante voorspeller van herval onafhankelijk van het morfologisch resultaat (23). Zelfs minimale ziektelevels hebben een slechtere prognose dan MRD-negatieve AML-patiënten. MRD-aanwezigheid blijft zodus de dominante risicofactor voor nadelige prognose (33).

De implicatie van MRD is afhankelijk van het tijdstip van interpretatie zoals reeds vermeld (22). Toch biedt de MRD-hoeveelheid op eender welk moment tijdens de behandeling, ondubbelzinnige prognostische informatie die de verdere therapiekeuze leidt (29). MRD-bepaling kan verschillen in therapeutische respons aantonen wat de moleculaire heterogeniteit van de ziekte en de variatie tussen patiënten in medicatiebeschikbaarheid en metabolisme bevestigt (13). Detectiemethoden voor MRD zorgen tevens voor een vroeger opsporen van reductie van aantal leukemische blasten (26).

### 4.2. MRD-detectie om herval te voorspellen

Heel wat studies tonen een duidelijke relatie tussen een positieve MRD-test en een hogere kans op herval en kortere overleving in vergelijking met een negatieve MRD-test. Deze verschillen merkt men alreeds op 2 weken na de start van inductiechemotherapie, maar ook na het voltooien van de daaropvolgende cycli chemo en voor en na transplantatie. De kans op een positieve MRD-test bij cytomorfolologische remissie is gerelateerd aan de cytogenetische/moleculaire risicogroep, leeftijd, een voorafgaande hematologische afwijking, voorafgaande chemotherapie of bestraling of een fenotype dat resistent is aan meerdere medicaties. Niettegenstaande blijft een positieve MRD-test een onafhankelijke prognostische voorspeller van herval en overleving. Belangrijk te vermelden is dat MRD-detectie een veel sterkere voorspelling geeft van herval dan andere variabelen vóór de behandeling (36).

Studies tonen aan dat patiënten met AML en MRD-positiviteit binnen de 3 à 6 maand hervallen. Men moet bedacht zijn om niet te veel nadruk te leggen op de resultaten van MRD-testen om het risico op en het tijdstip van herval te voorspellen bij een individu. Voornamelijk als de MRD-test slechts op 1 tijdstip wordt afgenomen. De waarde van MRD in het voorspellen van herval is overtuigend maar de betekenis van de grootte van de wijziging in het gehalte MRD is nog niet uitgeklaard. AML-patiënten die complete remissie pas bereiken na additionele therapie hebben een hoger risico op herval dan diegene die na de eerste cyclus inductiechemotherapie CR bekomen (36).

#### 4.3. Therapiebewaking op geleide van MRD

De sterke correlatie tussen MRD-resultaten en hervalrisico zorgt ervoor dat de interesse om MRD-resultaten te gebruiken om therapeutische beslissingen te nemen, sterk is toegenomen. Bijvoorbeeld intensificatie van therapie indien er MRD gevonden wordt met de hoop op herval te voorkomen en de overleving te verlengen, of vermindering van therapie indien er MRD-negativiteit is (36). De aanwezigheid of het heroptreden van MRD gedurende hematologische remissie leidt enkel tot interventie als er mogelijkheid is tot therapeutische interventie (27). Zo is MRD de beslissende factor voor transplantatie en voor de uitkomst na transplantatie (18). Vroege aanpassing van de behandeling voorkomt progressie naar herval in de meerderheid van MRD-positieve patiënten (13).

Er zijn geen resultaten beschikbaar van MRD-gebaseerde therapiebeslissingen van gerandomiseerde studies bij non-APL AML volgens Hourigan. Resultaten van niet-gerandomiseerde studies tonen aan dat de uitkomst verbetert als therapie wordt gebaseerd op MRD-resultaten. Maar door het ontbreken van randomisatie schieten deze studies te kort op het vlak van selectiebias, patiënt- en ziekteheterogeniteit,... Er is dus nood aan gerandomiseerde studies met voldoende statistische kracht om de mogelijke waarde van MRD-gebaseerde therapiebeslissingen in te schatten. Enkel zij kunnen aantonen dat de overgang naar MRD-negativiteit met additionele therapie, gecorreleerd is met een verminderd risico op herval en misschien zelfs langere overleving. Zelfs indien herval voorkomen of vertraagd zou worden in bepaalde personen, zal MRD-gebaseerde therapie niet uitlopen in betere overleving. Dit doordat sommige patiënten die hervallen kunnen gered worden met een allotransplant of chemotherapie. Bovendien geven preventieve behandelingen kans op toxiciteit en zodus impact op de levenskwaliteit en op de mogelijkheid om nog een transplantatie in de toekomst te kunnen ontvangen (36).

MRD-bepaling kan verder gebruikt worden om de veiligheid en effectiviteit van minder intensieve therapie te bepalen. Zo bekomt men minder toxiciteit maar evenveel kans op genezing (13). Het uiteindelijke doel van MRD-opsporing is het leiden van therapeutische

beslissingen door het identificeren van patiënten met een goede therapierespons en het hierbij vermijden van verdere therapiegerelateerde toxiciteit en patiënten waarbij therapie moet verdergezet en geïntensifieerd worden om herval te voorkomen (22).

#### 4.4. MRD bij AML met een laag, intermediair en hoog cytogenetisch risicoprofiel

De introductie van nieuwe moleculaire merkers zoals NPM1 en FLT3-ITD in de WHO-classificatie zorgt voor een opdeling van de patiënten in 3 groepen: gunstige, intermediaire en ongunstige prognose (15). Bepaalde karakteristieke cytogenetische afwijkingen zijn geassocieerd met een goede prognose zoals NPM1 mutatie, CEBPA biallelische mutaties en de afwezigheid van FLT3-ITD (7). Tevens CBF AML gekenmerkt door t(8;21)(q22;q22) of het RUNX1-RUNX1T1 fusiegen en inv(16)(p13;q22) of t(16;16)(p13;q22) met het gerelateerde fusiegen CBF $\beta$ -MYH11 behoren tot deze categorie. Allogene stamceltransplantatie als behandeling geniet niet de voorkeur in eerste remissie bij deze CBF-AML-patiënten. Met PCR kan men bij deze patiënten MRD opsporen in eerste remissie. Indien MRD wordt gevonden, reageren deze patiënten suboptimaal op initiële chemotherapie en is allogene stamceltransplantatie in eerste remissie toch strikt aanbevolen ondanks een laag cytogenetisch risicoprofiel. Het percentage dat hervalt is significant lager en de overleving is hoger door deze aanpak. Het risico op herval is 100% bij t(8;21) als er meer dan 500 kopijen in het beenmerg of meer dan 100 kopijen in het perifeer bloed worden gevonden; als bij inv(16) meer dan 50 kopijen in het bloed of meer dan 10 kopijen in het perifeer bloed worden gevonden. Appelbaum is één van de weinige die dergelijke studie uitgevoerd heeft met een groot aantal hoog risico CBF- leukemiepatiënten op basis van MRD en waarbij een positieve invloed blijkt van allogene transplantatie in eerste remissie in deze categorie (20).

MRD maakt het mogelijk om hoog en intermediair risicopatiënten te identificeren. Deze populatie heeft een hoger risico om te hervallen als men met standaardchemotherapie of autologe HSCT zal behandelen (29, 48). Alle CN-AML-patiënten worden gekarakteriseerd met een intermediair risico, gekenmerkt door afwezigheid van FLT3-ITD en NPM1 in de studie van Marjanovic en collega's (15). Bij deze twee risicogroepen is allogene stamceltransplantatie eerste keuze als therapie in CR1 zonder rekening te houden met het MRD-level (18, 20). Het besluit tot transplantatie is daarenboven afhankelijk van tal van bijkomende factoren zoals de mortaliteit van chemotherapie, comorbiditeiten, HLA-incompatibiliteit, cytogenetica en leeftijd (18, 45). Tevens alle pediatische hoog risicopatiënten zijn kandidaat voor HSCT onafhankelijk van het MRD-gehalte in de vroege therapiefase (19).

#### 4.5. Invloed MRD pretransplant

MRD positiviteit aangetoond door MFC, op het tijdstip van myeloablatieve allogene HSCT, is een krachtige en independente voorspeller van daaropvolgend herval en kortere overleving

voor AML-patiënten in CR, zelfs na correctie voor andere risicofactoren (18, 42, 45). Hoe hoger de residuele leukemische last, hoe lager de overlevingskans (19). Ondanks het feit dat de resultaten slechter zijn bij patiënten met MRD, zijn deze nog steeds beter dan de resultaten die men zou verwachten bij MRD-positieve patiënten zonder transplantatie (20). Afwezigheid van MRD op moment HSCT geeft een betere algemene, progressie-vrije en ziektevrije overleving en lager herval ten opzichte van aanwezigheid van MRD (2, 33). Patiënten die geen MRD hebben voor transplantatie hebben dus een lage kans op herval en een verwachte genezing van ongeveer 75%. MRD-positieve patiënten voor transplantatie hebben een slechter overleving onafhankelijk van het feit of ze de MRD klaren binnen de eerste 28 dagen na transplantatie. Alle patiënten met MRD pre-HSCT moeten als kandidaat voor pre-emptieve therapie zoals additionele pretransplant chemotherapie, intensievere conditionering, verminderde immunosuppressieve medicatie, posttransplant chemo of immunotherapie, worden beschouwd. MRD-bepaling voor transplantatie is het meest nuttig voor risicostratificatie en voor het identificeren van hoog risicopatiënten voor post-HSCT herval. Indien MRD enkel zou bepaald worden na HSCT, zou een groot deel van deze patiënten gemist worden. Dit wordt gestaafd doordat enkel pre-HSCT MRD geassocieerd is met OS, hervalvrije overleving en relatief risico (49).

Het product die gebruikt wordt bij transplantatie oefent tevens invloed uit. Bij transplantatie met navelstrengbloed (NB) is de globale overleving gelegen in dezelfde range als bij gebruik van *'matched unrelated donors'* (MUD). Bij *'mismatched unrelated donors'* (MMUD) vindt men een hogere mortaliteit. Het risico op herval is hoger bevonden bij de MUD- en MMUD-transplantaties in vergelijking met NB-transplantatie. Belangrijk om op te merken is dat de aanwezigheid van MRD pretransplant tevens een hoger risico op herval met zich meebrengt na MUD/MMUD-transplantatie maar geen impact heeft op het hervalrisico en de overleving na een NB-transplantatie. Dit door een verhoogd *'graft-versus-leukemie'* effect na CB-transplantatie die de nadelige gevolgen van MRD voor transplantatie gedeeltelijk overkomt (20).

Ondanks de bevestiging dat MRD-positiviteit voor HSCT een belangrijke prognostische factor is, is dit geen contra-indicatie voor transplantatie. Persisterende ziekterest is gecorreleerd met snellere ziekteprogressie en is dus een indicatie voor HSCT (19). Evenzeer als een patiënt geen MRD heeft voor transplantatie is de kans dat dit zo blijft heel hoog. De kans op toename in MRD-last tijdens de transplantatieperiode is weinig waarschijnlijk. Indien dit voorkomt vermoedt men dat de prognose ook ongunstiger wordt (49). Concreet indien er geen MRD wordt opgespoord voor transplantatie is er een relatief gunstige uitkomst op lange termijn en een lage incidentie van herval tussen de 20-25% (18, 26). Indien er MRD gevonden wordt in CR1 reikt de kans op herval tot 60% met een lagere overleving. Eerder dan het nummer van

remissie, is het MRD-gehalte, de dominerende pre-HSCT prognostische factor, geassocieerd met herval (18). Er is nog geen consensus omtrent MRD postconsolidatie of postinductie de sterkste voorspellende waarde heeft (5).

Er is weinig succes gebleken bij pogingen om MRD-positieve patiënten MRD-negatief te maken met consolidatiechemotherapie vooraleer over te gaan tot transplantatie. Door het laag aantal geslaagde pogingen is het moeilijk om uit deze conversie conclusies te trekken. Bovendien is de invloed van het type consolidatietherapie niet duidelijk. De patiënten die converteren van MRD negativiteit naar positiviteit hebben een slechtere overleving, dan de patiënten die over het hele verloop MRD positief blijven. Deze laatste hebben dan weer een slechtere overleving dan patiënten die converteren van MRD positiviteit naar MRD negativiteit door myeloablatieve conditionering voor transplantatie (20). Ondanks de conversie hebben deze laatstgenoemde patiënten toch slechte resultaten. De hervalcijfers zijn gelijkaardig met patiënten die zowel voor en na transplantatie MRD-positief zijn in de studie van Zhou. Men moet voorzichtig zijn met deze interpretaties omwille van de smalle cohorte (49). Daarnaast is er geen evidentie dat stijging van het MRD-gehalte bij patiënten met een minimale ziekerest gelinkt is aan een hoger risico op sterfte en herval volgens Walter. Men dient wel rekening houden dat deze studie een kleine cohorte omvat (18). Voorts is bij MRD-positieve patiënten die myeloablatieve of niet-myeloablatieve transplantatie ondergingen het herval-aantal gelijk, maar wel hoger dan bij MRD-negatieve patiënten. Er is dus geen significante impact op herval bij intensificatie voor transplantatie bij MRD-positieve patiënten (20, 45).

#### 4.6. Invloed MRD posttransplant

Men vindt een verband tussen MRD posttransplant en herval maar er is (nog) onvoldoende bewijs om therapiebenadering aan te passen op basis van deze vondst (39). MRD na transplantatie bij MFC kan herval voorspellen en risicostratificatie leiden en moet beslist in rekening gebracht worden voor verdere therapiebepaling (2). Verscheidene studies bevestigen het hoge risico op herval en de slechte uitkomst indien er post-HSCT MRD wordt gevonden (49). Monitoring van MRD na mogelijks curatieve behandeling is dus cruciaal in het ziektebeleid van AML (42). Men is er overigens niet in geslaagd om enig statistisch significant verschil te vinden in de importantie van GVLE tussen MRD-positieve en -negatieve patiënten. Dit suggereert dat het hoog hervalaantal bij MRD-positiviteit na HSCT niet te wijten is aan een minder sterk GVLE (18).

De therapeutische mogelijkheden bij herval na transplantatie zijn beperkt en interventies zoals donor lymfocyten infusie (DLI), oppuntstelling nieuwe transplantatie of verminderde immunosuppressie zijn het meeste effectief bij een lage leukemische last. Hierom is belangrijk om hoog risicopatiënten te identificeren en herval vroeg op te sporen na transplantatie (2, 39).

Uit een studie van Campana blijkt verder dat indien men een patiëntengroep IL-2 toedient en een andere groep DLI met/zonder IL-2, dat deze laatste een lagere kans heeft op herval (29). DLI kan enerzijds een gunstig effect hebben maar herbergt ook een hoog risico op GVHD. NK-cel alloreactiviteit kan het herval na HSCT onderdrukken zonder GVHD. Bovendien kunnen zij ook antileukemische effecten uitoefenen. Antilichamen tegen de inhibitorische receptoren op NK-cellen kunnen de NK-cel activiteit nog verhogen. NK-celtherapie zal in de toekomst toenemen in gebruik om leukemische last zowel pre- en posttransplant te verminderen (19).

#### 4.7. Welk level MRD is compatibel met MRD-negativiteit?

Eerst en vooral dient vermeld te worden dat de grenswaarden van MRD-positiviteit bij MFC-onderzoek controversieel zijn, verschillende studiegroepen hanteren andere grenzen als optimale grenswaarde. Hoewel dit een probleem vormt is dit nog steeds beter dan het gebruik van de technische detectielimiet (18). Voorspellende MRD-drempelwaarden zijn gesuggereerd en verschillen per subtype AML. Dit onderscheid is het gevolg van technologische variabiliteit maar ook van de ziektebiologie. Paietta beaamt dit doordat MRD-gehalte tussen patiënten in lange termijnsremissie met APL en t(8;21)-AML elkaars tienvoud zijn bij gelijkaardige technieken (22).

De uitkomst bij verschillend positieve MRD-gehalten is meer gelijkaardig dan het vergelijken van patiënten met een laag MRD-gehalte met MRD-negatieve patiënten. Zelfs patiënten met minimale MRD hebben een slechtere prognose dan MRD-negatieve patiënten. Walter en collega's stelt dat een toenemend gehalte MRD geen statistisch significante evidentie heeft van verhoogd risico op slechte uitkomst maar men moet voorzichtig zijn met deze stelling door de kleine cohorte (18). Een studie van Araki toont eveneens aan dat er geen significante verschillen zijn indien men een indeling maakt aan de hand van MRD-gehalte (33). Het MRD-gehalte dat meest waarschijnlijk herval veroorzaakt is nog niet opgehelderd (19). Het doel is om het laagst mogelijk MRD-gehalte compatibel met genezing te definiëren in de toekomst (22).

## 5. Conclusie

Na ruim 15 jaren van evaluatie van verzamelde data en oppuntstelling heeft het concept MRD een punt bereikt waarop dit nuttig gebruikt wordt bij bv. ALL en kan geïmplementeerd worden in algemene klinische strategieën en voor het gebruik bij patiëntgerichte therapeutische beslissingen bij AML (37). Door technische vooruitgang zijn MRD-methoden verbeterd en toegenomen in sensitiviteit en wordt er aangetoond dat complete morfologische remissie in de praktijk wellicht minder relevant is (36, 38). Bij de grenswaarde van 5% blasten voor morfologische remissie, kunnen er nog steeds  $10^{10}$  blasten persisteren in een patiënt. Naast de lage sensitiviteit speelt de hoge subjectieve factor ook een rol. De lage kost en korte duur van deze methode wegen niet meer op tegen de voordelen van de andere nieuw ontwikkelde methoden (36).

Meerkleurenflowcytometrie, polymerase kettingreactie, digitale PCR en '*next generation sequencing*' zullen een prominente rol spelen in de MRD-bepalingen in de toekomst. Voor het optimaliseren van de klinische winst zal de incorporatie van sensitievere meetmethoden van MRD in de routine klinische aanpak een internationale samenwerking vereisen. Een grote hulp zou kunnen voortkomen uit een coördinerend team dat instaat voor het ontwerpen van nieuwe behandelingsprotocollen met integratie van MRD-eindpunten (37). De limieten van ziektedetectie blijven wijzigen en de methoden krijgen een steeds hogere sensitiviteit. Zo ziet men dat steeds minder patiënten bij PCR negatief zijn voor een moleculaire merker (22). Tevens is men nu in staat om met NGS bij bijna elke patiënt een leukemiespecifieke mutatie te identificeren voor MRD-detectie (11). Men moet wel bedacht zijn op het evenzeer bestaan van tekortkomingen bij deze nieuwere methoden. Zo zal PCR beperkt zijn in toepassing door afwezigheid van een moleculaire merker in vele gevallen en is er bij MFC nood aan kennis over de antigenexpressiepatronen (6). Klonale evolutie en immunofenotypische shift kunnen eveneens een sterke belemmering vormen voor de interpretatie van het MRD-resultaat. Het is belangrijk om dit fenomeen verder te bestuderen zodat minor subpopulaties, voornamelijk preleukemische stamcellen, die later herval kunnen veroorzaken vroegtijdig opgespoord worden (5, 35).

Een meer gedetailleerd inzicht in het mutatielandschap van AML met behulp van NGS, gecombineerd met vooruitgang in de flowcytometrietechniek zal het mogelijk maken om de therapierespons beter te volgen op basis van MRD en meer persoonsgerichte behandelingen op te stellen zodat patiënten gespaard worden van onnodige therapiegerelateerde toxiciteit (13). De methoden om MRD op te sporen zijn tevens nog niet gestandaardiseerd en de grens waarbij MRD als positief wordt beschouwd verschilt ook naargelang de detectiemethode, laboratorium en de vaardigheden van de operator. Dit allen draagt bij tot de complexiteit van MRD-interpretatie en integratie (27). Vergelijkingen tussen studies zijn eveneens moeilijk door



de verschillen in sensitiviteit, specificiteit en tijdstip van MRD-bepaling en nog andere parameters. Hierbij zou een coördinatieteam ook invloed kunnen uitoefenen door het opstellen van gestandaardiseerde procedures per detectiemethode, toepasbaar in elk laboratorium en door elke operator. Dit zal ook betrouwbare vergelijkingen tussen studies mogelijk maken om de waarde van MRD-resultaten bij het voorspellen van herval in te schatten, om de therapie te bepalen en om eventueel te gebruiken als potentieel eindpunt bij het ontwikkelen van medicatie (36).

AML is een heterogene ziekte en buiten de specifieke types gebonden aan PML-RARA, gemuteerd NPM1, BCR-ABL1 of CBF-leukemie is er geen uniforme MRD-test beschikbaar voor alle patiënten. Elke test heeft bovendien voor- en nadelen die men in rekening moet brengen (37). Verder heerst er onder de clinici nog steeds wat terughoudendheid om de standaardtherapie te wijzigen op basis van MRD-gegevens. Enerzijds is dit een wijs besluit omdat er nog steeds veel laboratoria MRD-onderzoeken uitvoeren zonder de nodige training en ervaring, vooral betreffende MFC (27). Anderzijds toont deze literatuurstudie aan dat doelgerichte chemotherapie en HSCT volgens de risicograad van AML gebaseerd op MRD en genetische afwijkingen, de uitkomst van AML kan verbeteren (26). De angst voor vals-positieve resultaten en overbehandeling met bijhorende potentiële schade wordt hier tevens naar voren gebracht. Dit kan men deels voorkomen door een tweede MRD-detectie te doen 2-4 weken na de eerste om moleculair herval te bevestigen (36, 37). Het feit dat pre-therapeutische klassieke risicofactoren niet zullen vervangen worden maar eerder gecombineerd worden met MRD met uiteindelijk een grotere prognostische waarde kan bij deze overtuiging helpen (27). Clinici moeten verder op de hoogte zijn van alle mogelijkheden, voordelen en beperkingen van MRD om zo de beste klinische keuze te maken samen met de patiënt (38). Het lijkt er dus sterk op dat de hematologische gemeenschap de klassieke afhankelijkheid van blastentelling onder de microscoop zal moeten verlaten. Dit is geen biologische relevante aanpak meer waarop men therapeutische beslissingen kan steunen in de 21<sup>ste</sup> eeuw (37).

Naast de tekortkomingen van de detectiemethoden, twijfel bij clinici en het heterogeen karakter van AML zijn er ook nog economische aspecten, de grote variabiliteit tussen gebruikte analyses in het laboratorium, het ontbreken van standaardisatie op vele vlakken en de vraag of men patiënten moet betrekken in keuzes op basis van deze nieuwe informatie, die een rol spelen (20, 37). Ondanks deze niet onoverbrugbare beperkingen, tonen vele studies aan dat MRD-resultaten het hervalrisico kunnen voorspellen voor en tijdens therapie bij patiënten in complete morfologische remissie. Herhaling van MRD-testen verbetert de nauwkeurigheid van hervalvoorspelling en verdient dus de voorkeur. Of en hoe een patiënt zal antwoorden op de MRD-resultaten moet nog verder onderzocht worden want het is nog steeds niet met

onweerlegbare data bewezen dat een interventie overleving zal verbeteren. Bovendien moeten zowel onderzoeker als patiënt bedacht zijn op mogelijks valse resultaten en foutieve instelling van de behandeling. Als de gevolgen van de behandeling en toxiciteit miniem zijn, zal een vals-positief resultaat beter getolereerd worden. Daarom moet de clinicus gegevens van gelijkaardige personen bekijken, de beperkingen van MRD-testen begrijpen samen met de patiëntspecifieke variabelen om zo een geïntegreerde berekening van het hervalrisico te maken bij die patiënt (36).

Men hoopt in de nabije toekomst oplossingen te bieden voor al deze moeilijkheden bij implementatie zodat patiënten gestratificeerd worden naargelang MRD-gehalte en persoonlijke therapie krijgen op basis van het risico (37). Vandaag blijven therapeutische beslissingen voornamelijk gebaseerd op morfologische onderzoek, cytogenetische bevindingen en een beperkte hoeveelheid moleculaire genetische merkers (32). Maar men begint wel al af te wijken van de morfologische diagnostische basis van AML. Het toenemende bewijs van MRD-aanwezigheid na inductiechemotherapie door verscheidene sensitievere methoden is dwingend om de morfologische criteria over remissie te herzien (22).

## 6. Referenties

1. Bol P. Acute myeloïde leukemie. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 2002;109:4463-464.
2. Bastos-Oreiro M, Perez-Corral A, Martínez-Laperche C, Bento L, Pascual C, Kwon M, et al. Prognostic impact of minimal residual disease analysis by flow cytometry in patients with acute myeloid leukemia before and after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *European Journal of Haematology*. 2014;93(3):239-46.
3. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2014;2014(1):222-33.
4. Taylor J, Xiao W, Abdel-Wahab O. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*. 2017;130(4):410-23.
5. Cruz NM, Mencia-Trinchant N, Hassane DC, Guzman ML. Minimal residual disease in acute myelogenous leukemia. *Int J Lab Hematol*. 2017;39 Suppl 1:53-60.
6. Malmberg EBR, Ståhlman S, Rehammar A, Samuelsson T, Alm SJ, Kristiansson E, et al. Patient-tailored analysis of minimal residual disease in acute myeloid leukemia using next-generation sequencing. *European Journal of Haematology*. 2016:n/a-n/a.
7. Terwijn M, Putten WLJv, Kelder A, Velden VHJvd, Brooimans RA, Pabst T, et al. High Prognostic Impact of Flow Cytometric Minimal Residual Disease Detection in Acute Myeloid Leukemia: Data From the HOVON/SAKK AML 42A Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(31):3889-97.
8. Mosna F, Capelli D, Gottardi M. Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia: Still a Work in Progress? *J Clin Med*. 2017;6(6).
9. Cheng MJ, Hourigan CS, Smith TJ. Adult Acute Myeloid Leukemia Long-term Survivors. *Journal of leukemia (Los Angeles, Calif)*. 2014;2(2):26855.
10. Offner F. 'AML' uit Myeloproliferatieve aandoeningen. *Universiteit Gent*. 2016:60-74.
11. Bullinger L, Dohner K, Dohner H. Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):934-46.
12. Shlush LI, Mitchell A. AML evolution from preleukemia to leukemia and relapse. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2015;28(2-3):81-9.
13. Grimwade D. The changing paradigm of prognostic factors in acute myeloid leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2012;25(4):419-25.
14. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
15. Marjanovic I, Karan-Djurasevic T, Ugrin M, Virijevic M, Vidovic A, Tomin D, et al. Use of Wilms Tumor 1 Gene Expression as a Reliable Marker for Prognosis and Minimal Residual Disease Monitoring in Acute Myeloid Leukemia With Normal Karyotype Patients. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2017;17(5):312-9.
16. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
17. Ziemin-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ, Espinosa R, Patel Y, Harden A, et al. Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1991;88(23):10735-9.
18. Walter RB, Buckley SA, Pagel JM, Wood BL, Storer BE, Sandmaier BM, et al. Significance of minimal residual disease before myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for AML in first and second complete remission. *Blood*. 2013;122(10):1813-21.
19. Leung W, Pui CH, Coustan-Smith E, Yang J, Pei D, Gan K, et al. Detectable minimal residual disease before hematopoietic cell transplantation is prognostic but does not preclude cure for children with very-high-risk leukemia. *Blood*. 2012;120(2):468-72.

20. Appelbaum FR. Hematopoietic cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia with minimal residual disease. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2015;28(2–3):133-40.
21. G.J. Ossenkoppele EV, G. Huls, B.J. Biemond, S.K. Klein, J.J. Cornelissen, M. Jongen-Lavrencic, J. Kuball, H.C. Schouten, A.A.van de Loosdrecht, B. Lowenberg Richtlijnen voor de diagnostiek en behandeling van AML Leukemie Werkgroep HOVON; 2014 [Available from: [http://www.hovon.nl/upload/File/Richtlijnen\\_BehAdv/Richtlijnen%20AML%20juli%202014%20\\_2\\_.pdf](http://www.hovon.nl/upload/File/Richtlijnen_BehAdv/Richtlijnen%20AML%20juli%202014%20_2_.pdf)].
22. Paietta E. Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept? *Bone Marrow Transplant*. 2002;29(6):459-65.
23. Inaba H, Coustan-Smith E, Cao X, Pounds SB, Shurtleff SA, Wang KY, et al. Comparative Analysis of Different Approaches to Measure Treatment Response in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(29):3625-32.
24. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129(4):424-47.
25. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-21.
26. Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *The Lancet Oncology*. 2010;11(6):543-52.
27. Paietta E. Should minimal residual disease guide therapy in AML? *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2015;28(2–3):98-105.
28. Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, Del Poeta G, Sconocchia G, Lo-Coco F, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;119(2):332-41.
29. Campana D, Leung W. Clinical significance of minimal residual disease in patients with acute leukaemia undergoing haematopoietic stem cell transplantation. *British Journal of Haematology*. 2013;162(2):147-61.
30. Rossi G, Carella AM, Minervini MM, di Nardo F, Waure Cd, Greco MM, et al. Optimal time-points for minimal residual disease monitoring change on the basis of the method used in patients with acute myeloid leukemia who underwent allogeneic stem cell transplantation: A comparison between multiparameter flow cytometry and Wilms' tumor 1 expression. *Leukemia Research*. 2015;39(2):138-43.
31. Araki D, Wood BL, Othus M, Radich JP, Halpern AB, Zhou Y, et al. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Time to Move Toward a Minimal Residual Disease–Based Definition of Complete Remission? *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(4):329-36.
32. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(5):422-33.
33. Araki D, Wood BL, Othus M, Radich JP, Halpern AB, Zhou Y, et al. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Time to Move Toward a Minimal Residual Disease–Based Definition of Complete Remission? *J Clin Oncol*. 2016;34(4):329-36.
34. Nashed AL, Rao KW, Gulley ML. Clinical Applications of BCR-ABL Molecular Testing in Acute Leukemia. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2003;5(2):63-72.
35. Zeijlemaker W, Gratama JW, Schuurhuis GJ. Tumor heterogeneity makes AML a “moving target” for detection of residual disease. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2014;86(1):3-14.
36. Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, Ossenkoppele GJ, Walter RB. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2017;31(7):1482-90.
37. Hokland P, Ommen HB, Mulé MP, Hourigan CS. Advancing the Minimal Residual Disease Concept in Acute Myeloid Leukemia. *Seminars in Hematology*. 2015;52(3):184-92.
38. Ofran Y, Rowe JM. Introducing minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Current Opinion in Hematology*. 2015;22(2):139-45.

39. Anthias C, Dignan FL, Morilla R, Morilla A, Ethell ME, Potter MN, et al. Pre-transplant MRD predicts outcome following reduced-intensity and myeloablative allogeneic hemopoietic SCT in AML. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(5):679-83.
40. Jaso JM, Wang SA, Jorgensen JL, Lin P. Multi-color flow cytometric immunophenotyping for detection of minimal residual disease in AML: past, present and future. *Bone Marrow Transplant.* 2014;49(9):1129-38.
41. Getta BM, Devlin SM, Levine RL, Arcila ME, Mohanty AS, Zehir A, et al. Multicolor Flow Cytometry and Multigene Next-Generation Sequencing Are Complementary and Highly Predictive for Relapse in Acute Myeloid Leukemia after Allogeneic Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2017.
42. Miyazaki T, Fujita H, Fujimaki K, Hosoyama T, Watanabe R, Tachibana T, et al. Clinical significance of minimal residual disease detected by multidimensional flow cytometry: serial monitoring after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Leuk Res.* 2012;36(8):998-1003.
43. Gent UZ. Laboratoriumgids: WT1 overexpressie 2016 [Available from: <http://labo.uzgent.be/mtd/klinbio/labgidsext/labgidsext.asp?titel=%20WT1%20overexpressie&actie=DETAIL&naam=LG-149>].
44. Lane S, Saal R, Mollee P, Jones M, Grigg A, Taylor K, et al. A  $\geq 1$  log rise in RQ-PCR transcript levels defines molecular relapse in core binding factor acute myeloid leukemia and predicts subsequent morphologic relapse. *Leukemia & Lymphoma.* 2008;49(3):517-23.
45. Walter RB, Gooley TA, Wood BL, Milano F, Fang M, Sorrow ML, et al. Impact of pretransplantation minimal residual disease, as detected by multiparametric flow cytometry, on outcome of myeloablative hematopoietic cell transplantation for acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2011;29(9):1190-7.
46. Fang M, Storer B, Wood B, Gyurkocza B, Sandmaier BM, Appelbaum FR. Prognostic impact of discordant results from cytogenetics and flow cytometry in patients with acute myeloid leukemia undergoing hematopoietic cell transplantation. *Cancer.* 2012;118(9):2411-9.
47. Debarri H, Lebon D, Roumier C, Cheok M, Marceau-Renaut A, Nibourel O, et al. IDH1/2 but not DNMT3A mutations are suitable targets for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia patients: a study by the Acute Leukemia French Association. *Oncotarget.* 2015;6(39):42345-53.
48. Maurillo L, Buccisano F, Del Principe MI, Del Poeta G, Spagnoli A, Panetta P, et al. Toward optimization of postremission therapy for residual disease-positive patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2008;26(30):4944-51.
49. Zhou Y, Othus M, Araki D, Wood BL, Radich JP, Halpern AB, et al. Pre- and post-transplant quantification of measurable (minimal) residual disease via multiparameter flow cytometry in adult acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2016;30(7):1456-64.

