

Aus dem Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München Klinikum rechts der Isar (Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. K. Höfler)

## **Knochenmarksinfiltration beim follikulären Lymphom:**

### **Vergleich von Histologie und Durchflußzytometrie**

**Kristina John**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. F. Fend

2. apl. Prof. Dr. H. Bernhard

Die Dissertation wurde am 16.09.2005 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 08.02.2006 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1	<b>Epidemiologie der Non-Hodgkin-Lymphome .....</b>	<b>4</b>
1.2	<b>Follikuläres Lymphom.....</b>	<b>6</b>
1.2.1	<i>Klinik.....</i>	<i>7</i>
1.2.2	<i>Diagnostik.....</i>	<i>8</i>
1.2.3	<i>Klinische Stadieneinteilung.....</i>	<i>8</i>
1.3	<b>Therapie .....</b>	<b>9</b>
1.3.1	<i>Therapie begrenzter Stadien .....</i>	<i>9</i>
1.3.2	<i>Therapie fortgeschrittener Stadien.....</i>	<i>10</i>
1.4	<b>Pathologie.....</b>	<b>11</b>
1.4.1	<i>Morphologie.....</i>	<i>11</i>
1.4.2	<i>Morphologie im Knochenmark.....</i>	<i>12</i>
1.4.3	<i>Morphologische Diskordanz im Lymphknoten und Knochenmark .....</i>	<i>13</i>
1.5	<b>Wichtige Differentialdiagnose.....</b>	<b>13</b>
1.5.1	<i>„Lymphoide Zellinfiltrate“ im Knochenmark.....</i>	<i>13</i>
1.6	<b>Immunphänotypisierung .....</b>	<b>14</b>
1.6.1	<i>Immunhistochemische Marker .....</i>	<i>15</i>
1.7	<b>Wichtige genetische Alterationen beim Follikulären Lymphom .....</b>	<b>16</b>
1.7.1	<i>Bcl-2.....</i>	<i>16</i>
1.7.2	<i>Bcl-6.....</i>	<i>17</i>
1.8	<b>Untersuchungsmethoden zum Nachweis von Lymphomzellen im Knochenmark..</b>	<b>18</b>
1.8.1	<i>Morphologische Knochenmarkdiagnostik.....</i>	<i>18</i>
1.8.2	<i>Durchflußzytometrie.....</i>	<i>18</i>
<b>2</b>	<b>Problemstellung und Zielsetzung.....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
3.1	<b>Herkunft und Sammlung des Materials.....</b>	<b>23</b>
3.2	<b>Histologie und Immunhistochemie .....</b>	<b>23</b>
3.2.1	<i>Herstellung der Präparate .....</i>	<i>23</i>
3.2.2	<i>Durchführung der Immunhistochemie .....</i>	<i>24</i>
3.3	<b>Durchflußzytometrie.....</b>	<b>26</b>
3.3.1	<i>Probenaufbereitung.....</i>	<i>29</i>
3.3.2	<i>Messung mit dem Durchflußzytometer.....</i>	<i>30</i>
3.3.3	<i>Auswertung der Messwerte .....</i>	<i>32</i>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
4.1	<b>Histologie.....</b>	<b>39</b>
4.1.1	<i>Konkordante Fälle.....</i>	<i>39</i>
4.1.2	<i>Diskordante Fälle.....</i>	<i>39</i>
4.1.3	<i>Ergebnisse der Histologie diskordanter Fälle .....</i>	<i>40</i>
4.1.4	<i>Ergebnisse der Immunhistochemie diskordanter Fälle.....</i>	<i>43</i>

<b>4.2</b>	<b>Durchflußzytometrie</b> .....	<b>45</b>
4.2.1	<i>Konkordante Fälle</i> .....	45
4.2.2	<i>Diskordante Fälle</i> .....	45
4.2.3	<i>Beurteilung des Infiltrationsvolumens im Knochenmark</i> .....	46
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>48</b>
<b>5.1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>48</b>
<b>5.2</b>	<b>Durchgeführte Studie</b> .....	<b>50</b>
<b>5.3</b>	<b>Vorliegende Literatur</b> .....	<b>51</b>
<b>5.4</b>	<b>Kritische Wertung</b> .....	<b>58</b>
5.4.1	<i>Datenkonstanz</i> .....	58
5.4.2	<i>Patientenkollektiv</i> .....	58
5.4.3	<i>Mögliche Fehlerquellen für diskordant-positive Fälle</i> .....	59
5.4.4	<i>Mögliche Fehlerquellen für diskordant-negative Fälle</i> .....	62
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>69</b>
7.1	<b>Die Ann-Arbor-Klassifikation</b> .....	<b>69</b>
7.2	<b>Immunhistochemisch verwendete Lösungen</b> .....	<b>70</b>
7.3	<b>Durchflußzytometrie</b> .....	<b>71</b>
7.4	<b>Verwendete Antikörperkombinationen für die Durchflußzytometrie</b> .....	<b>72</b>
7.5	<b>Abkürzungen</b> .....	<b>73</b>
7.6	<b>Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen</b> .....	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>76</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>86</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Epidemiologie der Non-Hodgkin-Lymphome

### *Inzidenz*

Die Inzidenz der Non-Hodgkin-Lymphome hat sich in den letzten Jahren in den USA und Europa stark erhöht, so daß Weisenburger von einer „beginnenden Epidemie“ spricht. In den Jahren zwischen 1973 und 1989 konnte in den USA ein Anstieg um ca. 60% bei einer jährlichen Zunahme von ca. 4% registriert werden. Pro Jahr werden ca. 14 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner diagnostiziert (Weisenburger DD 1994). Die Inzidenz und die Verteilung der verschiedenen Lymphomentitäten zeigen geographische Unterschiede. In Europa variiert die Zahl der Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner zwischen 7,4 in Italien (Ragusa) und 18,0 in Finnland (Cartwright R, Brincker H et al. 1999). Insgesamt stieg in Europa vor allem die Inzidenz der Keimzentrumslymphome wie auch hochmaligner Lymphome an. Der Häufigkeitsgipfel der Non-Hodgkin-Lymphome liegt zwischen dem fünften und siebten Lebensjahrzehnt, wobei Männer im höheren Lebensalter 1,5 mal häufiger erkranken als Frauen. AIDS-Patienten haben eine bis zu 1.000-fach erhöhte Inzidenz an einem Non-Hodgkin-Lymphom zu erkranken (Armitage JO and Dan LL 2001).

### *Ätiologie*

Ein erhöhtes Risiko an malignen Lymphomen zu erkranken ist nachweislich gegeben bei: Defektimmunopathien, viralen und bakteriellen Infektionen als Kofaktoren und/oder Auslöser, Exposition gegenüber spezifischen chemischen Noxen und genetische Prädispositionen (Bizard F, Dreyfus B et al. 1997; Freedman AS and Nadler LM 1999; Mueller N 1999; Tavani A, La Vecchia C et al. 2000). Die Hypothese, dass maligne Lymphome mit bestimmten infektiösen Erkrankungen assoziiert sein können, beschrieb erstmals Dennis Burkitt (Burkitt DP 1969) für das endemische afrikanische Burkitt-Lymphom. Seit der Zeit wurden einige Viren und Bakterien ausfindig gemacht, die kausal an der Lymphomentstehung beteiligt sein könnten (siehe nächste Seite **Tabelle II.1**; (Gallo RC and Wong-Staal F 1982; Armitage JO and Dan LL 2001)).

<b>Tabelle II.1:</b> virale/bakterielle Infektionen als Kofaktoren und/oder Auslöser an der Entstehung maligner Lymphome	
Epstein-Barr Virus	Burkitt Lymphom Extranodales NK/T-Zell-Lymphom, nasales M. Hodgkin (?) Primäres diffus-großzelliges B-Zell-NHL des ZNS
HTLV 1	Adultes T-Zell-Lymphom/ T-Zell-Leukämie
HIV	Diffus-großzelliges B-Zell-Lymphom Burkitt Lymphom
Hepatitis C-Virus	Lymphoplasmocytisches Lymphom
Humanes Herpes Virus 8	Multizentrische Castleman Krankheit „Primary effusion lymphom“
Helicobacter Pylori	MALT Lymphome des Magens
ZNS: Zentrales Nervensystem; HTLV: human T cell lymphotropic virus; MALT: mucosa associated tissue; NK: natural killer	

Mögliche Krankheiten und umweltbedingte Risikofaktoren, die zu einer Erhöhung des Lymphomrisikos führen, sind in der **Tabelle II.2** (Armitage JO and Dan LL 2001) aufgeführt. Auf wichtige genetische Alterationen wird im Kapitel 1.7 eingegangen.

<b>Tabelle II.2:</b> Exposition gegenüber spezifischen Krankheiten und Umweltfaktoren, die ein erhöhtes Lymphomrisiko bedingen	
<p><b>Erbliche Immundefekte</b> Ataxia telangiectasia Chédiak-Higashi Syndrom Klinefelter Syndrom Wiscott-Aldrich Syndrom</p>	<p><b>Autoimmunerkrankungen</b> Rheumatoide Arthritis Sjörgren Syndrom Systemischer Lupus erythematodes Zöliakie</p>
<p><b>Erworbene Störungen des Immunsystems</b> Iatrogene Immunsuppression HIV-Infektion Erworbene Hypogammaglobulinämie</p>	<p><b>Chemikalien und Medikamente</b> Phenytoin, Dioxin, Phenoxyherbizide Radioaktive Strahlung Zytostatika- und Strahlentherapie</p>

## 1.2 Follikuläres Lymphom

### *Geschichtlicher Überblick*

Das heute unter dem Namen „follikuläres Lymphom“ bekannte Lymphom wurde erstmals von den beiden Arbeitsgruppen Brill, Baehr, Rosenthal et al. (Brill N, Baehr G et al. 1925) und Symmers et al. (Symmers D 1927) beschrieben und erhielt nach nach ihnen die Bezeichnung „Brill-Symmers Krankheit“. 1941 lieferte Gall et al. (Gall EA, Morrison HR et al. 1941) am Massachusetts Hospital erstmalig die morphologischen und klinischen Eigenschaften des Lymphoms und benannte dieses daraufhin „follikuläres Lymphom“. 1956 untersuchte Rappaport et al. (Rappaport H 1956) die bislang größte Serie von 253 Fällen mit dem Resultat, maligne Lymphome mit follikulärem Wachstumsmuster anhand histologischer Eigenschaften von der benignen follikulären Hyperplasie abgrenzen zu können. Zu Beginn war Rappaport der Auffassung, daß die neoplastischen Follikel aus reaktiven Keimzentren hervorgingen. Später bezeichnete er die Bildung follikel-ähnlicher Knötchen als einen Imitationsversuch des normalen Gewebemusters. Andere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen (Jaffe E, Shevach E et al. 1974; Wranke R and Levy R 1974). Um den neoplastischen Ursprung der follikel-ähnlichen Knötchen zu betonen, änderte Rappaport die Terminologie von „follikulär“ zu „nodulär“. 1975 kamen Lennert et al. (Lennert K 1969; Lennert K, Mohri N et al. 1975) in ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass sich neoplastische Zellen follikulärer Lymphome und normale Keimzentrumzellen morphologisch ähnelten. Sie bezeichneten die Zellen des Keimzentrums zunächst als Germinozyten und Germinoblasten, später als Zentrozyten und Zentroblasten. Folglich wurde der Tumor nach seinen zytologischen Eigenschaften als „zentrozytisch-zentroblastisches Lymphom mit teilweise follikulärem Wachstumsmuster“ beschrieben (Gerard-Marchant R, Hamlin I et al. 1974). Luke und Collins et. al (Lukes RJ and Collins R 1974) machten ähnliche Beobachtungen in ihren Untersuchungen. Ihrer Auffassung nach sollte die Klassifikation des Tumors nach dem vorherrschenden Zelltyp erfolgen, der sein biologische Verhalten bestimmte und nicht nach dem Wachstumsmuster. Ferner konnten Rappaport's Beobachtungen durch spätere Studien bestätigt werden (Harris N and Data R 1982; Stein H, Gerdes J et al. 1982), weshalb in den folgenden Klassifikationen der Term „nodulär“ durch „follikulär“ ersetzt wurde (Gerard-Marchant R, Hamlin I et al. 1974; Lukes RJ and Collins R 1974; Project 1982; The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project 1982; Harris NL, Jaffe ES et al. 1994).

### ***Synonyme***

In der Working Formulation (The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project 1982) wurde das folliculäre Lymphom „follicular small cleaved“ bezeichnet, in der Kiel-Klassifikation (Stansfeld A, Diebold J et al. 1988) „zentrozytisch-zentroblastisch“, in der REAL-Klassifikation (Harris NL, Jaffee ES et al. 1994) „Follikelzentrumzell-Lymphom“ und in der WHO-Klassifikation (Harris NL, Jaffe E et al. 2000) „Follikuläres Lymphom“.

### ***Definition***

Das Follikuläre Lymphom ist ein indolentes B-Zell-Lymphom der Follikelzentrumzellen, bestehend aus einer Mischung von Zentrozyten und Zentroblasten („zentrozytisch-zentroblastisch“), die das folliculäre Wachstum von normalen Keimzentren imitieren. Die neoplastischen B-Zellen haben das Keimzentrum biologisch und funktionell durchlaufen. Die Tumorzellen sind in der immunphänotypischen Charakterisierung positiv für CD10, sIg und Bcl-2 und negativ für CD5 und CD43. Ebenso exprimieren die Lymphomzellen Pan-B-Zell assoziierte Antigene (CD19, CD20, CD22, CD79a) und das nukleäre Protein Bcl-6 (Cattoretti G, Chang CC et al. 1995; Pittaluga S, Ayoubi TA et al. 1996). Bei etwa 90 % der Fälle findet sich die chromosomale t(14;18)-Translokation, durch welche die natürliche Ausschaltung des Antiapoptose-Gens Bcl-2 verhindert wird und es zu einer Überexpression des Bcl-2-Proteins kommt.

### ***Epidemiologie***

Im Erwachsenenalter erworbene folliculäre Lymphome sind die zweithäufigsten Non-Hodgkin-Lymphome in den USA (35% aller NHL in den USA, 22% weltweit) (Anon 1997). In der Gruppe der nicht aggressiven, indolenten Lymphome stellen sie mit 70% die häufigste Entität dar (Glass AG, Karnell LH et al. 1997). Es erkranken vornehmlich Erwachsene im medianen Alter von 60 Jahren. Frauen erkranken 1,7 mal häufiger als Männer (Ratio 1:1,7) (Anon 1993).

#### **1.2.1 Klinik**

##### ***Ausbreitung, Metastasierung***

Zu den Erstsymptomen zählen neben den unspezifischen Symptomen wie Schwäche, Müdigkeit und Leistungsabfall (sogenannte B-Symptome) zunächst gut abgrenzbare, später meist verbackene asymptomatische Lymphknotenvergrößerungen zervikaler, thorakaler oder

abdominaler Lymphknotenstationen. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zu einer Ausbreitung von Lymphomzellen (z.B. Gastrointestinaltrakt, Milz, Haut, Knochenmark und weitere Organe) im gesamten Körper. Folglich manifestieren sich follikuläre Lymphome mit einem vielschichtigen klinischen Erscheinungsbild. Dies kann sich u.a. in einer Organdestruktion, Splenomegalie und einem Knochenmarkbefall widerspiegeln. Bei Non-Hodgkin-Lymphomen ist die Infiltrationsrate des Knochenmarks abhängig vom Stadium der Erkrankung und der Lymphomentität. Charakteristischerweise steigt die Inzidenz einer KM-Infiltration mit sinkender Malignität und liegt bei niedrigmalignen Entitäten zwischen 50% bis 90% (Morra E, Lazzarino M et al. 1989; McKenna RW 1992) und bei hochmalignen NHL zwischen 19% und 60% (Morra E, Lazzarino M et al. 1989; Juneja SK, Wolf MM et al. 1990; McKenna RW 1992). Das follikuläre Lymphom ist ein niedrigmalignes NHL mit indolentem klinischen Verlauf. Bei Diagnosestellung befinden sich bereits 2/3 der Patienten im klinischen Stadium III und VI mit Infiltration abdominaler, thorakaler Lymphknoten und der Milz. In 40% der Fälle ist das Knochenmark durch das Lymphom infiltriert (Anon 1993).

### 1.2.2 Diagnostik

Allgemein umfasst die Diagnostik von Lymphomen die Erhebung der Anamnese, die klinische Untersuchung, Laborstatus und Anwendung bildgebender Verfahren.

Die Labordiagnostik umfasst darüberhinaus routinemäßig durchgeführte durchflußzytometrische Analysen an Blut und Knochenmark, um eine Ausschwemmung klonaler B-Zellen zu detektieren und Lymphomzellen immunphänotypisch zu charakterisieren. Für die morphologische Knochenmarkdiagnostik werden Knochenmarkbiopsien aus dem Beckenkamm entnommen.

### 1.2.3 Klinische Stadieneinteilung

Die initiale Festlegung des klinischen Erkrankungsstadiums definiert den Ausbreitungsgrad des Lymphoms, nachdem sich die anschließende Therapieplanung und Prognose richtet. Die Non-Hodgkin-Lymphome werden ähnlich wie das Hodgkin-Lymphom nach der Ann-Arbor-Klassifikation (Carbone PP, Kaplan HS et al. 1971; Lister TA, Crowther D et al. 1989) eingeteilt (siehe Anhang: **Tabelle VII.1**;S. 69). Es gilt die 4-Stadieneinteilung, die sich nach dem anatomischen Befall richtet (Knochenmark- und diffuser Organbefall bedingen das fortgeschrittene klinische Stadium IV), wobei zwischen einem primär nodalen und primär extranodalen Befall unterschieden wird. Mit den Suffix „A“ und „B“ wird das Vorhandensein von Allgemeinsymptomen erfasst. Auffallend ist, dass jeglicher Befall des Knochenmarks das

fortgeschrittenste klinische Stadium IV bedingt. Jedoch besitzt die Einteilung nach Ann Arbor bei Non-Hodgkin-Lymphomen eine geringere prognostische Aussagekraft als beim Hodgkin-Lymphom (Rosenberg SA 1977). Bessere Aussagen – vor allem für aggressive NHL - lassen sich mit dem International Prognostic Index for non-Hodgkin's lymphoma (IPI) (Shipp Ma 1997) treffen, in den fünf klinische Risikofaktoren (Alter >60 Jahre, Stadium III/VI, >1 extranodaler Befall, schlechter Allgemeinzustand, LDH oberer Normalwert) einbezogen werden. Da der Befall des Knochenmarks auch im IPI prognostisch eine wesentliche Rolle spielt, ist die Beckenkammbiopsie ein wichtiger diagnostischer Bestandteil in der Staginguntersuchung maligner Non-Hodgkin-Lymphome.

### **1.3 Therapie**

Die Auswahl des Therapieverfahrens bei indolenten niedrig-malignen folliculären Non-Hodgkin-Lymphomen basiert auf einer Vielzahl von Faktoren. Neben dem Alter des Patienten, dem allgemeinen Gesundheitszustand sowie der Präsenz komorbider Erkrankungen sind in der ersten Linie die Lymphomentität und das Krankheitsstadium zu berücksichtigen. Patienten mit folliculären Lymphomen in limitierten Stadien (Stadium I oder II nach Ann Arbor) werden einer kurativen Strahlentherapie zugeführt. Bei fortgeschrittenen folliculären Lymphomen (Stadium III und IV nach Ann Arbor) wird von einer nicht kurativen Situation ausgegangen. In diesen Fällen kommen andere Therapieschemata zum Einsatz u.a. Strahlentherapie, Chemotherapie, „biologische Therapie“ sowie Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantation. Häufig werden diese Behandlungsmethoden miteinander kombiniert.

#### **1.3.1 Therapie begrenzter Stadien**

In einigen Studien (Lawrence TS, Urba WJ et al. 1988; Richards MA, Gregory Wm et al. 1989) konnte bewiesen werden, dass die alleinige Strahlentherapie bei Patienten mit folliculären Lymphomen in limitierten Krankheitsstadien eine effiziente Behandlungsmethode darstellt. Da niedrig-maligne NHL zu frühzeitiger Generalisation neigen, ist eine Indikation zur alleinigen Strahlentherapie selten gegeben. Nach publizierten Daten kann in limitierten Stadien folliculärer Lymphome mit einer Rezidivfreiheit nach 10 Jahren bei ca. 45% bis 55% der Patienten gerechnet werden (Gospodarowicz MK, Bush RS et al. 1984; Lawrence TS, Urba WJ et al. 1988). Aufgrund des protrahierten Verlaufs meist über mehrere Jahre besteht nach dieser Zeit das Risiko, an einem Spätrezidiv zu erkranken, weshalb es niemals zu einer „echten Heilung“ kommt. Aktuell wird kontrovers diskutiert, welche Art der

Strahlentherapie (involved-field bzw. extended-field oder total-nodale irradiation) in begrenzten Stadien anzuwenden ist. Patienten in frühen Erkrankungsstadien niedrig-maligner NHL, die keine Bestrahlung aller Lymphknotenstationen des Körpers (sogenannt total-nodale irradiation (TNI)) erhalten haben, rezidierten häufiger in Lymphknoten außerhalb des Bestrahlungsfeldes. Deshalb wurde die TNI Strahlentherapie als therapeutisch sinnvoll angesehen. Auch der alleinige Einsatz einer Chemotherapie oder einer kombinierten Chemostrahlentherapie hat sich in limitierten Stadien niedrig-maligner NHL nicht bewährt (Monfardini S, Banfi A et al. 1980; Castellino RA and Marglin SI 1982).

### **1.3.2 Therapie fortgeschrittener Stadien**

Bei fortgeschrittenen follikulären Lymphomen Stadium III und IV nach Ann Arbor wird von einer nicht-kurativen Situation ausgegangen. Es konnte beobachtet werden, dass bei ca. 30% der Patienten mit follikulären Lymphomen eine komplette Regression auch ohne Therapie eintrat (Horning SJ and Rosenberg SA 1984). Folglich scheint der Verzicht auf eine initiale Therapie oder die Verfolgung der „watch and wait“-Strategie in einigen Fällen vorteilhaft zu sein. Insbesondere bei asymptomatischen Patienten könnte durch eine eher abwartende Strategie unerwünschte therapeutische Begleiterscheinungen wie eine Myelosuppression oder die Entstehung von Zweitneoplasien vermieden werden. Ein weiterer Vorteil dieses Therapieansatzes besteht in der geringeren Selektionierung zytostatikaresistenter Tumorzellen durch eine behandlungsfreie Zeit, die bei kontinuierlicher Medikamentengabe häufiger auftritt (Freedman AS and Nadler LM 1999). Jedoch müssen in fortgeschrittenen Stadien häufig verschiedene Behandlungsmethoden zum Einsatz kommen u.a. Radiotherapie, Chemotherapie und eine Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantation.

Weitere Therapieoptionen basieren auf der „biologischen“ Therapie mit Biomodulatoren, wie z.B. die Interferone, die schon relativ lange bei follikulären Lymphomen eingesetzt werden (Neubauer A and Hermann R 1989). Allgemein beruht die Therapie auf der Stimulation des Immunsystems. Der genaue Wirkmechanismus von Interferon-2-alpha ist derzeit noch ungeklärt. Aufgrund geringer Nebenwirkungen und kurzer Therapiedauer erlangten B-Zell-spezifische monoklonale Antikörper in der Behandlung follikulärer Lymphome besondere Bedeutung. Bereits seit 1980 wurden Patienten mit Antikörpern gegen das Oberflächenantigen CD20, welches von ca. 95% der B-Zellen bei NHL-Erkrankungen exprimiert wird, behandelt (Meeker T, Lowder J et al. 1985; Rankin EM, Hekman A et al. 1985; Press OW, Appelbaum F et al. 1987; Dyer MJS, Hale G et al. 1989; Scheinberg SA, Straus DJ et al. 1990). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten, die eine Monotherapie mit

Rituximab (anti-CD20 Antikörper) erhielten, in bezug auf die Überlebens- und Remissionsrate profitieren (Maloney DG, Grillo-Lopez AJ et al. 1997; Witzig TE, Vukov AM et al. 2005). Ebenso in der Kombinationstherapie aus CHOP-Schema und Rituximab konnte eine Verbesserung der Remissionsrate erzielt werden (Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ et al. 1999). Zunächst bleibt die Therapieoption mit B-Zell-spezifischen monoklonalen Antikörpern jedoch der Rezidivtherapie vorbehalten.

Weitere Therapieansätze für folliculäre Lymphome mit kurativem Anspruch sind die autologe bzw. allogene Blutstammzelltransplantation (PBST) und die allogene Knochenmarktransplantation (KMT). Ihre Verwendung wird zur Zeit innerhalb verschiedenster klinischer Studien geprüft und bleibt auf weiteres der Rezidivtherapie vorbehalten. Diese Behandlungsverfahren werden im allgemeinen nach Ganzkörperbestrahlung, hochdosierter Chemotherapie oder Behandlung mit monoklonalen Antikörpern eingesetzt.

Durch die Natur einer reifenden B-Zelle weist jedes folliculäre NHL einen Idiotyp an Oberflächenantigenmuster auf, das ein geeignetes Target für eine Vakzinationstherapie darstellen könnte (Hsu FJ, Caspar CB et al. 1997). Allerdings sind die verwendeten Antigene zu schwache Immunogene, weshalb Adjuvantien (z.B. dendritische Zellen) notwendig werden, um eine suffiziente Antigenpräsentation und Aktivierung des Immunsystems zu erreichen. Auf Grund der bisher großen Anzahl verwendeter Antigene, Adjuvantien und Applikationsschemata ist die Erstellung eines optimalen Therapieprotokolls nicht möglich.

## **1.4 Pathologie**

### **1.4.1 Morphologie**

Das Wachstumsmuster folliculärer Lymphome zerstört teilweise oder komplett die Architektur des Lymphknotens, wobei es versucht die folliculären Strukturen zu immitieren. Die runden neoplastischen Infiltrate besitzen ungefähr die Größe eines reifen Keimzentrums und ähneln aktiven hyperplastischen Follikeln. Ihre Begrenzung zum interfolliculären Raum hin ist eher unscharf. Gewöhnlich fehlt ihnen die Mantelzone, welche normalerweise das reaktive Keimzentrum umgibt. Häufig infiltrieren und obliterieren die malignen Infiltrate subkapsulär und medullär gelegene Sinusoide des Lymphknotens. Zudem werden einzelne Lymphomzellen in der Lymphknotenkapsel und im extrakapsulären Gewebe beobachtet. Durch Expansion der Infiltrate wirkt das kollagenfaserreiche interfolliculäre Gewebe verdichtet. Besonders in diffus infiltrierten Arealen bilden folliculäre Lymphome vermehrt Kollagenfasern aus. Die WHO unterscheidet drei Wachstumsmuster, folliculär (>75%

follikulär), folliculär/ diffus (25% bis 75% folliculär) und diffus (<25% folliculär). Der Raum zwischen den Follikeln enthält dicht gepackte neoplastische Zentrozyten und viele kleine Gefäße, sodaß das histologische Bild dunkler Follikel auf hellem Hintergrund entsteht, was auch als „reverse pattern“ bezeichnet wird.

Das zytologische Bild zeigt eine Mischung von Zentrozyten und Zentroblasten, wobei die zytische Zellkomponente dominiert. Zentrozyten (cleaved FCC) sind kleine bis mittelgroße Lymphozyten, mit irregulär geformtem Zellkern, einzelnen Nukleoli sowie aufgelockertem Kernchromatin und wenig blassem Zytoplasma. Zentroblasten (noncleaved FCC) sind 3x so groß wie kleine Lymphozyten mit rundem bzw. ovalem Zellkern, der ein helles Zentrum und peripher kondensiertes Kernchromatin aufweist. Nahe der Kernmembran sind ein bis drei basophile Nukleoli zu finden. Der Zytoplasmasaum ist äußerst schmal und in der Giemsa-Färbung intensiv blau.

Follikuläre Lymphome werden nach der absoluten Anzahl eingestreuter Zentroblasten innerhalb mehrerer neoplastischer Follikel in der 40-fachen Vergrößerung („high power field“) nach der Methode von Mann und Berard (Mann RB and Berard CW 1983; Metter GR, Nathwani BN et al. 1985; Nathwani BN, Metter GR et al. 1986) in drei zytologische Malignitätsgrade eingeteilt: Grad I: 0-5 Zentroblasten/hpf; Grad II: 6-15 Zentroblasten/hpf; Grad III (a/b): >15 Zentroblasten/hpf.

In 80% der Fälle liegt ein Grad I- und Grad II Lymphom vor (Harris NL and Ferry JA 2001), wobei sich die einzelnen Grade in ihrer zellulären Zusammensetzung unterscheiden. Grad I besteht vorwiegend aus kleinen Zentrozyten, Grad II aus einer Mischung von Zentrozyten und Zentroblasten und Grad III überwiegend aus großen Zentroblasten. Da sich folliculäre Lymphome mit überwiegend soliden zentroblastischen Infiltraten in ihrem biologischen Verhalten von folliculären Lymphomen mit gemischter zentrozytische-zentroblastischer Zellkomponente unterscheiden, empfiehlt die WHO eine weitere Unterteilung von Grad III in Grad IIIa mit mehr als >15 Zentroblasten/hpf einschließlich zentrozytischer Zellkomponente und IIIb mit ausschließlich soliden zentroblastischen Infiltraten (Ott G, Katzenberger T et al. 2002).

#### **1.4.2 Morphologie im Knochenmark**

In fortgeschrittenen Erkrankungsstadien maligner Non-Hodgkin-Lymphome kommt es zu einem dissiminierten Organbefall durch Lymphomzellen im gesamten Körper. Bei Befall des Knochenmarks durch ein Non-Hodgkin-Lymphom lassen sich fünf unterschiedliche Infiltrationsmuster voneinander abgrenzen (fokal paratrabekulär, fokal nonparatrabekulär,

diffus interstitiell, diffus solide, sinusoidal/intravaskulär), die auch in gemischter Form auftreten können. Ferner findet sich im Bereich der Infiltrate eine vermehrte Retikulinfibrose, die den Nachweis von Lymphomzellen erschweren kann.

Die Tumorzellen zeigen in der Immunhistochemie eine Positivität für B-Zell-Marker (z.B. CD20) ebenso für Marker des lymphatischen Primärtumors.

### **1.4.3 Morphologische Diskordanz im Lymphknoten und Knochenmark**

Bei dissimilierten Non-Hodgkin-Lymphomen mit Befall des Knochenmarks weisen die Infiltrate im Mark in der Regel eine Zytologie auf, die an die Morphologie des nodalen bzw. extranodalen Tumorgewebes erinnert. Dieses wird als konkordante Infiltration bezeichnet. Bei folliculären Lymphomen finden sich vorwiegend kleinzellige lymphoide Zellpopulationen, welche endostal entlang der trabekulären Strukturen wachsen. In den Infiltraten diffus-großzelliger Lymphome dominieren Zentro- und Immunoblasten im zytologischen Bild. Bei 9% bis 40% der Patienten mit Non-Hodgkin-Lymphomen findet sich eine voneinander abweichende Lymphknoten- und Knochenmarkshistologie. Vor allem folliculäre Lymphome und diffus-großzellige B-Zell-Lymphome zeigen im Knochenmark oftmals eine vom Primärbefund (z.B. im Lymphknoten) abweichende bzw. diskordante Zytologie der Infiltratzellen (Foucar K, McKenna RW et al. 1982; Bartl R, Hansmann ML et al. 1988; Fisher DE, Jacobson JO et al. 1989; Colan MG, Bast M et al. 1990; Kluin Pm, van Kierken JH et al. 1990). Bei einem typisch diskordanten Befall des Knochenmarks sind die Infiltrate im Mark häufig kleinzellig und ähneln morphologisch einem niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphom im Gegensatz zur großzelligen Zytologie im extramedullären Tumorgewebe (Hodges GF, Lenhardt TM et al. 1994). Die klinische Bedeutung des diskordanten Knochenmarkbefalls bei Non-Hodgkin-Lymphomen ist bislang nicht eindeutig geklärt.

## **1.5 Wichtige Differentialdiagnose**

### **1.5.1 „Lymphoide Zellinfiltrate“ im Knochenmark**

Fokal lymphoide Infiltrate im Knochenmark sind in der Routinediagnostik hämatologischer Erkrankungen ein häufiger Befund, und ihre Einordnung bereitet immer wieder Schwierigkeiten. Nach einigen Studienergebnissen sollen sie in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht der Patienten in bis zu 50% aller Knochenmarkbiopsien vorkommen (Jones SE, Rosenberg SA et al. 1972; Dick F, Bloomfield CD et al. 1974; Rywlin AM and Ortega RS

1974; Rywlin A 1976; Stein RS, Ultmann JE et al. 1976; Mead GM, Hyun BH et al. 1977; Kemon A, Sulik M et al. 1989; Lui PI, Takanari H et al. 1989). Ihr Auftreten im höheren Lebensalter ist überwiegend ohne klinische Bedeutung, während sie bei jüngeren Patienten vermehrt mit entzündlichen Prozessen, Erkrankungen des Immunsystems oder Tumoren (Lymphomen) assoziiert werden. Auch Knochenmarkproben Gesunder können reaktive lymphozytäre Infiltrate aufweisen, weshalb ihre biologische Wertigkeit bislang nicht eindeutig geklärt ist (Thiele J 1995). Die Literatur unterscheidet nach dem morphologischen Erscheinungsbild einzelne Subtypen von benignen lymphozytären Läsionen. Alle können ein malignes Lymphom imitieren (Kroft SH and McKenna RW 2001). Folglich kann die Abgrenzung neoplastischer Infiltrate von benignen reaktiven lymphoiden Infiltraten (auch atypisch reaktive Infiltrate genannt) schwierig sein. Bei mehr als 30% aller Non-Hodgkin-Lymphome wird ein herdförmiger Befall des Markorgans beobachtet (Colan MG, Bast M et al. 1990). Vor allem die kleinzellige Morphologie niedrig-maligner B-Zell-Lymphome lässt sich oft nur schwer von reaktiven Infiltraten unterscheiden. Um einen Knochenmarkbefall durch niedrig-maligne Non-Hodgkin-Lymphome eindeutig von reaktiv lymphoiden Infiltraten unterscheiden zu können, wurde eine Vielzahl an morphologischen Kriterien aufgeführt (Thiele J 1995; Thiele J, Zirbes TK et al. 1999). Reaktive Infiltrate sind relativ scharf begrenzt, neigen kaum zur Fibrosierung und sind unter Aussparung der paratrabekulären Zone zentral-perivaskulär gelegen. Immunhistochemisch findet sich eine Mischpopulation von kleinen B- und T-Lymphozyten. In unklaren Fällen ermöglichen Mikrodesektion und molekularpathologische Klonalitätsuntersuchungen des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen-Rearrangements (IgH-Rearrangements) monoklonale lymphoide Infiltrate von reaktiven Läsionen zu unterscheiden (Kremer M, Cabras AD et al. 2000).

## **1.6 Immunphänotypisierung**

Die Immunphänotypisierung ist eine Methode der Zellcharakterisierung durch den Nachweis von Antigenstrukturen. Häufig ist eine genaue Klassifizierung maligner Lymphome bzw. Abgrenzung von verwandten Entitäten nur anhand des Expressionsmusters von Oberflächenantigenen neoplastischer Zellen möglich (Immunphänotypisierung). Während der Zellreifung unterliegt die B-Zelle Veränderungen hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres Oberflächenantigenmusters, weshalb neoplastischen Zellen je nach Reifestadium durch ein spezifisches Oberflächenantigenmuster charakterisiert sind. In Leukozytenworkshops wurden die Antigenstrukturen einem Cluster von Differenzierungsantigenen (Cluster of

Differentiation, CD) und einer bestimmten Nummer zugeordnet. Antikörper, die die gleichen Antigene erkennen, werden danach einem Cluster zugeordnet.

Kleinzellige Lymphome wie das folliculäre Lymphom (FL), Mantelzell-Lymphom (MCL), das nodale und extranodale bzw. splenische Marginalzonen-B-Zell-Lymphom sowie die chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell-Typ (CLL/SLL) stammen von B-Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien ab und lassen sich anhand immunhistochemischer Färbungen sowie durchflußzytometrischer Analysen phänotypisch differenzieren. Zur näheren Spezifizierung der genannten Lymphome eignen sich neben Pan-B-Zellmarkern (CD19, CD20, CD22 und CD79a) zusätzlich Kombinationen von CD5, CD10 und CD23.

Follikuläre Lymphome sind stark positiv für CD19, CD20, CD10 sowie negativ für CD5, CD23 und CD43. Marginalzonen-B-Zell-Lymphome (nodal, extranodal und splenisch) exprimieren weder CD10 noch CD23.

### **1.6.1 Immunhistochemische Marker**

#### ***CD3***

CD3 ist ein Oberflächenprotein auf reifen T-Zellen und assoziiert mit dem T-Zellrezeptor. Seine Funktion besteht in der Signalübertragung in das Zellinnere über eine Tyrosinkinase. Unreife T-Zellen, bei denen noch keine Genrearrangement bezüglich des T-Zellrezeptors stattgefunden hat, exprimieren CD3 zuerst intrazytoplasmatisch und in späteren Stadien membranständig (Swerdlow SH, Angermeier PA et al. 1988). Eine CD3 Positivität in der immunhistochemischen Färbung ist sehr spezifisch für T-Zellen und T-Zell Lymphome. Weiter wird das CD3-Antigen zur Differenzierung neoplastischer B-Zell-Infiltrate gegenüber gutartigen reaktiven Zellinfiltraten (sogenannte atypische lymphoide Infiltrate, ALI) im Knochenmark verwendet (Thiele J, Zirbes TK et al. 1999).

#### ***CD10***

CD10, eine Zink enthaltende Endopeptidase der Zellmembran, ist ein tumorunspezifisches Antigen, das als erstes auf Zellen akuter lymphatischer Leukämien nachgewiesen wurde und auch unter dem Namen „common acute lymphoblastic leukemia antigen (CALLA)“ bekannt ist. CD10 wird von normalen frühen lymphatischen B-Vorläuferzellen des Knochenmarks und B-Zellen des Keimzentrums exprimiert. Ebenso tragen Fibroblasten, neutrophile Granulozyten und verschiedene Bürstensaumepithelien das Antigen auf ihrer Zelloberfläche.

Follikuläre Lymphome exprimieren CD10 in ca. 60% und diffus-großzellige B-Zell-Lymphome in ca. 25% der Fälle (Kaufmann O, Flath B et al. 1999).

### ***CD20***

CD20, ein membranständiges Phosphoprotein, ist auf B-Zellen vorhanden und vermittelt die B-Zellaktivierung. Das Antigen wird ab dem Prä-B-Zellstadium bis hin zur reifen B-Zelle exprimiert und verschwindet vor der Differenzierung zur Plasmazelle. Eine starke Expression des CD20-Antigens lässt sich insbesondere auf reifen B-Zellen nachweisen. Immunhistochemisch exprimieren 95% aller B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome und 92% aller nodulären lymphozytenreichen Hodgkin-Lymphome das CD20-Oberflächenantigen. In einer Studie von Schmid et al. (Schmid C, Pan L et al. 1991) zeigten 87% der Reed-Sternberg Zellen eine Positivität für mindestens einen der angewandten Pan-B-Zellmarker u.a. für CD20. B-Zell Neoplasien, die von Plasmazellen abstammen, wie Multiple Myelome, sind in der Regel CD20 negativ.

## **1.7 Wichtige genetische Alterationen beim Follikulären Lymphom**

### **1.7.1 Bcl-2**

#### ***Allgemeines***

Das Bcl-2 („B-cell lymphoma 2“) Gen ist ein menschliches Protoonkogen und auf Chromosom 18 lokalisiert. Bcl-2 kodiert für ein Protein, das während der Ontogenese der Follikelzentrumszellen eine wichtige anti- apoptotische Funktion ausübt. Das Protein ist ein integrales Membranprotein des endoplasmatischen Retikulums und der Kern- bzw. Mitochondrienmembran. Physiologisch wird Bcl-2 in Follikelzentrumszellen als Schutz vor Apoptose bei Kontakt zum spezifischen Antigen exprimiert. In Zellen, die mit keinem passenden Antigen reagieren, wird Bcl-2 anschließend herunterreguliert und somit der programmierte Zelltod ausgelöst.

Die häufigste chromosomale Translokation, die das Bcl-2 Gen betrifft, ist die t(14;18) (q32;q21) –Translokation. Sie ist bei 70% bis 95% der follikulären Lymphome nachweisbar und von prognostischer Bedeutung (Horsman DE, Coupland RW et al. 1995; Lopez-Guillermo A, Cabanillas F et al. 1999). Ferner wird die t(14;18) in 12% bis 38% der diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome detektiert. Durch die Translokation gerät das Bcl-2 Gen unter die Transkriptionskontrolle des Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gens auf Chromosom 14,

wodurch es zu einer verstärkten Expression des Bcl-2 Proteins und Blockade der Apoptose kommt (Korsmeyer Sj 1992; Korsmeyer Sj 1999; Swerdlow SH 1999). In der Folge proliferiert die betroffene Zelle. Allerdings wurden t(14;18) positive Zellen auch bei gesunden Personen nachgewiesen, weshalb es wahrscheinlich weiterer Stimuli zur Entstehung eines Lymphoms bedarf (Limpens J, de Jong D et al. 1991; Limpens J, Stad R et al. 1995; Panayiotidis P and Kotsi P 1999). Seltene Variante ist die Translokation t(2;18)(p11;q21), die das Bcl-2 Gen unter die Transkriptionskontrolle des Immunglobulin-Leichte-Ketten-Gen auf Chromosom 2 bringt.

### ***Bcl-2 Immunhistochemie***

Das Bcl-2-Protein wird normalerweise in ruhenden B- und T-Lymphozyten exprimiert. Die B-Zellen des reaktiven Keimzentrums sind in der Regel Bcl-2 negativ und lassen sich immunhistologisch nicht anfärben. Eine Bcl-2 Expression bei folliculären Lymphomen mit Grad I beträgt nahezu 100% bis zu 75% bei Grad III (Lai R, Arber DA et al. 1998). Ferner findet sich eine Positivität in bis zu 72% der diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome (Gelb AB, Rouse RV et al. 1994; Wang T, Lasota J et al. 1995; Lai R, Arber DA et al. 1998).

## **1.7.2 Bcl-6**

### ***Allgemeines***

Das Bcl-6-Protein ist ein POZ/ Zinkfinger-Transkriptions-Repressor-Protein, welches selektiv in B-Zellen des Keimzentrums exprimiert wird. Das Protein spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Bildung und Funktion von Keimzentren. Ein Bcl-6 Gen-Rearrangement wurde in 6% bis 14% folliculärer Lymphome und in 28% bis 35% der diffus-großzelligen Lymphome beobachtet (Ohno H and Fukuhara S 1997). Für Bcl-6 besteht ähnlich wie für Bcl-2 keine Assoziation zwischen der Expression des Proteins und einem Gen-Rearrangement. Eine fehlende Bcl-6 Expression wurde bei unreifen B-Zellen und Plasmazellen gefunden (Cattoretti G, Chang CC et al. 1995).

### ***Bcl-6: Immunhistochemie***

Für B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome, die von B-Zellen des Keimzentrums abstammen, kann der Nachweis einer Bcl-6 Expression differentialdiagnostisch ein wichtiger Marker sein (Dogan A, Bagdi E et al. 2000).

## **1.8 Untersuchungsmethoden zum Nachweis von Lymphomzellen im Knochenmark**

### **1.8.1 Morphologische Knochenmarkdiagnostik**

Die Indikation zur Knochenmarkuntersuchung liefert in der Regel der klinische Befund in Verbindung mit Veränderungen des Blutbildes und des Blutausstrichs. Die Standardmethode zum Nachweis einer Infiltration des Knochenmarks durch ein Non-Hodgkin-Lymphom ist die morphologische Beurteilung der Beckenkammbiopsie. Durch Punktion der Spina iliaca superior werden die Knochenmarkproben gewonnen und zunächst über mehrere Stunden in einer Formaldehyd-Lösung fixiert. Danach folgt eine Entkalkung der Proben mittels EDTA (Ethylen-diamin-tetraessigsäure) über ein bis zwei Tage. Es folgt die Einbettung in Paraffin und die Herstellung mehrerer Gewebeschnitte. Danach können mit Hilfe eines Lichtmikroskops die Knochenmarkstanzen histologisch und zytologisch auf eine Lymphominfiltration untersucht werden. Unregelmäßig geformte, zumeist fokal paratrabekulär oder diffus im Markraum lokalisierte Infiltrate mit atypischer Lymphozytenmorphologie sowie vermehrter retikulärer Fibrose sind verdächtig oder der Beweis für eine Knochenmarkinfiltration. Zur Komplettierung der KM-Untersuchung wird die Lymphozytenzahl und der Blastenanteil im Knochenmark bestimmt.

Zudem konnte mit der Weiterentwicklung immunhistochemischer Methoden die Aussagekraft der Stanzbiopsie erhöht werden (Thaler J, Dietze O et al. 1991; Kreft A, Busche G et al. 1997; Pezzella F, Munson PJ et al. 2000). Vorteil der immunhistochemischen Färbemethode ist neben der einfachen Durchführbarkeit die gleichzeitige Auswertung histo- und zytomorphologischer Eigenschaften sowie immunologischer Charakteristika. Als alleinige diagnostische Methode ist sie jedoch nicht geeignet (Hanson CA, Kurtin PJ et al. 1999). Nachteilig wirkt sich die Fixierung in Formaldehyd auf das Knochenmarkgewebe aus, das bevorzugt mit Seitengruppen von Proteinen (Aminogruppen, OH-Gruppen) reagiert und zu einer Vernetzung und Denaturierung der Proteine führt. Das in seiner chemischen und mechanischen Stabilität veränderte Gewebe besitzt eine herabgesetzte Immunreaktivität.

### **1.8.2 Durchflußzytometrie**

Die Durchflußzytometrie ist eine moderne Analysemethode mit einem breiten Einsatzspektrum. Die Bestimmung einer Vielzahl von einzelnen Parametern als auch die Kombination verschiedener Messungen ermöglicht einen schnellen Überblick über bestimmte Zellfunktionszustände. Mit Hilfe der computergesteuerten Durchflußzytometrie können

zahlreiche Oberflächen- und intrazelluläre Antigene von Zellsuspensionen hämatologischer Neoplasien näher analysiert werden (Groenevelden K, te Marvelde JG et al. 1996). Vorteile bestehen in einer raschen Analyse einer Vielzahl von Einzelzellen (bis zu 10000 Zellen in wenigen Sekunden) bei gleichzeitiger Erfassung der Zellgröße, der Granularität sowie mehrerer Fluoreszenzmarkierungen und der statistischen Auswertbarkeit der gewonnenen Daten zu jedem späteren Zeitpunkt. Die besseren Bedingungen für die Standardisierung der Methodik erzielen eine wesentlich präzisere und objektivere Immunphänotypisierung als mit dem Immunfluoreszenzmikroskop am histologischen Schnittpräparat. Die genannten Vorzüge der Durchflußzytometrie begründen die Anwendung in der Diagnostik akuter und chronischer Leukämien (Tabakhi A, Edinger M et al. 1996; Di Giuseppe JA and Borowitz MJ 1998) sowie maligner Non-Hodgkin-Lymphome. Im Allgemeinen basiert die Erfassung und Typisierung maligner Non-Hodgkin-Lymphome auf der Bestimmung der Linienzugehörigkeit und des Reifestadiums der Lymphomzellen. Bei B-Zell-Lymphomen ermöglicht die Analyse der Leichtkettenrestriktion den Nachweis einer Klonalität, während T-Zell-Lymphome durch ein aberrantes Antigenmuster detektiert werden können (Rothe G and Schmitz G 1996).

Speziell in der Diagnostik von Lymphomen der B-Zelllinie nutzt die Durchflußzytometrie den Verlust bzw. das Auftreten von Differenzierungsantigenen (CD-Nomenklatur) während des Reifeprozesses zur Abgrenzung der einzelnen Lymphomentitäten (Drexler HG and Minowada J 1998). Durch die Verfügung eines großen Antikörperpanels zur Immunphänotypisierung und anhand der Lichtstreuungs-Eigenschaften wird versucht, maligne Zellpopulationen und ihre Subpopulationen näher zu charakterisieren. Auf dieser Basis konnte einer Vielzahl von Lymphomsubtypen ein charakteristisches Antigenmuster zugeordnet werden. Die wesentlichen Nachteile der FACS-Analyse gegenüber der morphologischen Knochenmarkdiagnostik liegen in der fehlenden Darstellbarkeit des tumorösen Gewebeverbandes. Ferner können eine Vielzahl technischer und biologischer Störgrößen die Messergebnisse ungünstig beeinflussen und möglicherweise zu falsch negativen Ergebnissen führen (siehe nächste Seite **Tabelle II.3**, (Rothe G and Schmitz G 1996; Sun T 2002)). Zur Zeit werden Untersuchungen hinsichtlich der diagnostischen Aussagekraft der durchflußzytometrischen Methode im Vergleich zur herkömmlichen Beckenkammbiopsie kontrovers diskutiert (Tabakhi A, Edinger M et al. 1996; Naughton MJ, Hess JI et al. 1998; Auer I and Luider J 1999; Duggan PR, Easton D et al. 2000; Siebert JD, Weeks LM et al. 2000; Stacchini A, Demurtas A et al. 2003).

**Tabelle II.3:** Technische und biologische Störgrößen in der Durchflußzytometrie

<b>Technische Störgrößen</b>	<b>Biologische Störgrößen</b>
Autofluoreszenz	Polymorphismus
unspezifische Bindungen	Autoantikörper
Verstärkerrauschen	Kompetition mit physiologischen Liganden
freies Fluorochrom	sterische Bindung der Epitope
Energietransfer	pH-Wert
Verunreinigungen	Tertiärstruktur
Reagenszerfall	Proliferation
	Capping
	Shedding

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Das Follikuläre Lymphom ist ein indolentes B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom der Follikelzentrumzellen. In der Gruppe der niedrig-malignen Lymphome stellt es mit 70% die häufigste Entität dar (Glass AG, Karnell LH et al. 1997). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose präsentieren sich Patienten häufig in fortgeschrittenen Stadien mit z.T. ausgedehnter Knochenmarkinfiltration. Der initiale Nachweis einer Beteiligung des Knochenmarks hat wesentlichen Einfluß auf das weitere therapeutische Vorgehen und die Prognose, da Patienten in limitierten Stadien (Stadium I und II) einer kurativen Strahlentherapie zugeführt werden können, hingegen in fortgeschrittenen Stadien (z.B. Stadium IV) eine nicht kurative Situation vorliegt. In diesem Zusammenhang ist eine exakte Ausbreitungsdiagnostik unerlässlich.

Der Goldstandard zum Nachweis eines Lymphombefalls im Knochenmark ist nach wie vor die morphologische Beurteilung der Beckenkammbiopsie. Mehrere Publikationen bestätigen die Überlegenheit der histologischen Auswertung von Knochenmarkbiopsien gegenüber der zytomorphologischen Auswertung von Knochenmarkaspiraten bezüglich der Fragestellung nach einer Knochenmarkinfiltration (Liao KT 1971; Jones SE, Rosenberg SA et al. 1972; Brunning RD, Bloomfield CD et al. 1975; Collier BS, Chabner BA et al. 1977; Günther C, Helbig W et al. 1982; Haddy TB, Parker RI et al. 1989; De Wolf-Peeters C 1991). Nur einzelne Untersuchungen beschäftigen sich mit der simultanen Anwendung der Durchflußzytometrie und Knochenmarkbiopsie in Staginguntersuchungen maligner Non-Hodgkin-Lymphome (Naughton MJ, Hess JI et al. 1998; Duggan PR, Easton D et al. 2000; Palacio C, Acebedo G et al. 2001; Stacchini A, Demurtas A et al. 2003). Die Autoren kommen dabei überwiegend zu der Auffassung, dass routinemäßig eingesetzte durchflußzytometrische Analysen zum Nachweis einer Knochenmarkinfiltration durch ein Lymphom von geringer Bedeutung sind. In den Studien wird immer wieder ein Anteil durchflußzytometrisch nicht erfasster Lymphominfiltrate bei morphologisch eindeutig positivem Befund angegeben. Diese diagnostische Diskordanz ist in der Literatur mehrfach beschrieben und insbesondere für den follikulären Subtyp der Non-Hodgkin-Lymphome belegt (Duggan PR, Easton D et al. 2000). Als mögliche Ursache für falsch-negative Befunde wird das paratrabekuläre Wachstumsmuster mit intrafokaler Fibrose angeführt, was einer Aspiration neoplastischer Zellen entgegenwirkt. Zudem führen spezielle Anreicherungsverfahren wie die Dichtegradientenzentrifugation zu Zellverlusten (Naughton MJ, Hess JI et al. 1998).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Evaluierung der diagnostischen Wertigkeit der Durchflußzytometrie im Vergleich zur herkömmlichen Knochenmarkbiopsie in der

Staginguntersuchung des Follikulären Lymphoms. In diesem Zusammenhang ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Ist die morphologische Beurteilung der Knochenmarkbiopsie nach wie vor der Goldstandard in der Staginguntersuchung follikulärer Lymphome?
2. Erhöhen zusätzlich durchgeführte immunhistologische Untersuchungen bei einer minimalen Knochenmarkinfiltration die diagnostische Treffsicherheit?
3. Ist die Durchflußzytometrie eine geeignete Untersuchungsmethode in der Ausbreitungsdiagnostik des Follikulären Lymphom?

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Herkunft und Sammlung des Materials**

Für die retrospektive Studie wurden die Patientendaten aus dem Archivregister (PAS-System) des Instituts für Pathologie und pathologische Anatomie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München der Jahre 1998 bis 2003 verwendet. Um die Diagnose eines folliculären Lymphoms zu verifizieren, wurden zunächst die Patienten ermittelt, die ein extramedulläres nodales folliculäres Lymphom zeigten. Anschließend wurden die Patientendaten auf eine Knochenmarksinfiltration hin durchgesehen.

Zu jedem Patienten stellte der Hämatologe (Dr. B. Schmidt) seine durchflußzytometrischen Ergebnisse aus den Knochenmarksaspiraten zur Verfügung.

Die Gewebeblöcke und –schnitte der betreffenden Fälle wurden aus dem Archiv des Instituts für Pathologie und pathologischen Anatomie herausgesucht. Alle Schnittpräparate wurden von zwei Pathologen ( Prof. F. Fend und Dr. M. Kremer) beurteilt und nach der WHO-Klassifikation evaluiert und falls notwendig reklassifiziert. Anschließend wurden alle klinischen Unterlagen der untersuchten Fälle nach relevanten Daten zu Diagnose und Behandlung katalogisiert. Besondere Beachtung fanden dabei die durchflußzytometrischen Ergebnisse der untersuchten Knochenmarkaspirate.

### **3.2 Histologie und Immunhistochemie**

#### **3.2.1 Herstellung der Präparate**

Für die morphologische Knochenmarkdiagnostik werden in einer Sitzung die Biopsate und Aspirate in Jamshidi-Technik durch Punktion der Spina iliaca posterior superior gewonnen. Die entnommenen Knochenmarkbiopsien wurden z.T. in 1% Formaldehyd/ 0,5% Glutaraldehyd (pH 7,4) und z.T. in 10%-igem Formalin über 24 Stunden fixiert, 48 Stunden lang in gepufferten Na-EDTA (pH 7,0) entkalkt und in Paraffin eingebettet. Zur Primärdiagnose dienten histologische Standard-Färbungen wie HE, Giemsa, PAS, Naphthol-AS-D-Chloroacetatesterase und Gomori sowie immunhistochemische Untersuchungen. Die Gewebeblöcke wurden im Institut für Pathologie des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit (GSF), Oberschleißheim in Serie

geschnitten (Dicke: 1-2  $\mu\text{m}$ ) und auf silanisierte Glasobjekträger (Länge:76 mm, Breite: 34 mm, Dicke: 0,17 mm) aufgebracht.

### ***Immunhistochemie***

Alle Knochenmarkstrepanate wurden immunhistochemisch mit **CD20** (Klon L27, 1:200, Dako Cytomation, Copenhagen, Denmark), **CD3** (polyklonal, 1:200, Dako Cytomation, Copenhagen, Denmark) und **CD10** (Klon 56C6, 1:50, Novocastra, Newcastel, United Kingdom) gefärbt.

#### **3.2.2 Durchführung der Immunhistochemie**

Die Schnitte wurden nach folgendem Protokoll entparaffiniert:

1. 2 x 5 Minuten in jeweils frischem Xylol
2. 2 x 5 Minuten in 100% Ethanol
3. 1 Minute in 100% Ethanol
4. 2 x 1 Minute in jeweils 96% Ethanol
5. 1 Minute in 80% Ethanol
6. 3 Minuten Waschen in fließendem Wasser

Während des Entparaffinierens wurde der Puffer für den nächsten Schritt (Kochen der Schnitte in der Mikrowelle) hergestellt. Pro Arbeitstag wurden 1,5 Liter eines 10 mM Citratpuffers (0,01mol/l, PH= 6) eingesetzt. Die genaue Anleitung zur Herstellung der Lösung ist im Anhang (**Abschnitt 7.2**; S. 70) aufgeführt.

In den Versuchsreihen kam die Antigenwiederherstellungsmethode („antigen retrieval“) durch Erhitzen zum Einsatz. Das Formalin, das zur Fixierung der Präparate eingesetzt wurde, führt zu einer Vernetzung der Proteine des Gewebes untereinander. Kochen bei ausreichend hoher Temperatur bewirkt die Lösung dieser Proteinvernetzungen und eine verbesserte Immunreaktivität.

Die paraffinfreien Schnitte wurden in Glasschaukeln in einem für die Mikrowelle geeignetem Schnellkochtopf platziert. Der Topf wurde mit den vorbereiteten 1,5 Liter Citratpuffer aufgefüllt und die paraffinfreien Schnittpräparate für 40 Minuten auf 800 Watt in der Mikrowelle gekocht. Nach dem Kochen wurde der Druck abgelassen und die Objekträger sofort in 20°C TBS („tris-puffered saline“: genaue Zusammensetzung: siehe Anhang, **Abschnitt 7.2**, S. 70) mit 3% Ziegen Serum (Sigma, Deisenhofen) überführt und für mindesten

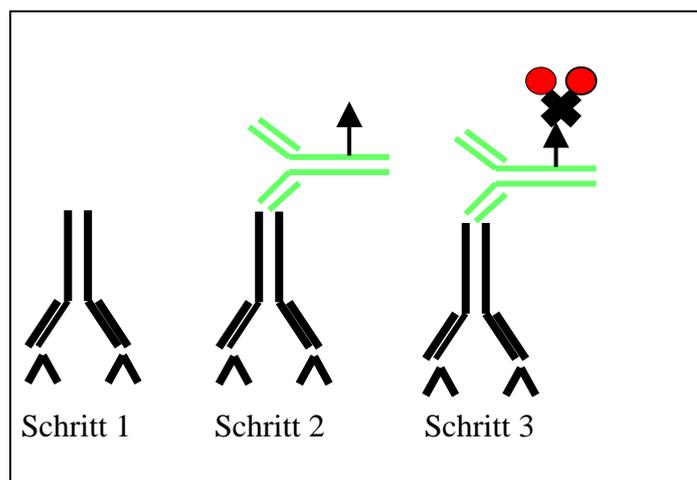
20 Minuten inkubiert. Das Ziegen Serum blockiert unspezifische Bindungen des Gewebes, sodass sich der Antikörper nur an die gewünschten Bindungen anheften kann.

Im nächsten Arbeitsschritt wurde der Antikörper nach Vorschrift mit Diluent (Dako, Kopenhagen, Dänemark) verdünnt und in benötigter Menge bereitgestellt.

Es wurden folgende Verdünnungsstufen und Positivkontrollen verwendet:

Antikörper	Verdünnung	Positivkontrolle
CD20	1:500	Tonsille
CD3	1:200	Tonsille
CD10	1:100	Tonsille

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die weiteren Schritte – sekundärer Antikörper, Avidin-Biotin Komplex (ABC) (vgl. **Abb. III.1**), Farbentwicklung und Gegenfärbung – erfolgten automatisiert in einem „Immunostainer“ (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) gemäß dem für den jeweiligen Antikörper notwendigen Programm. Zum Abschluß wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (1 x 80%, 2 x 96%, 2 x 100% Ethanol, 2 x Xylol), eingedeckelt und getrocknet.



**Abb. III.1:** Bei der LAB/LSAB-Methode (Labeled (Strept) Avidin-Biotin-Methode) bedient man sich der Affinität von Avidin zu Biotin (Avidin-Biotin Komplex (ABC)). Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes tetrameres Glykoprotein (Molekulargewicht: 68 kDA) mit vier Bindungsstellen für Biotin. Die drei Schritte der LSAB-Methode bestehen aus Primärantikörper (**Schritt 1**), biotinyliertem Brückenantikörper (**Schritt 2**) und Enzymmarkiertem Streptavidin (**Schritt 3**).

### 3.3 Durchflußzytometrie

#### *Voraussetzung*

Grundsätzlich sollten vor Beginn der Immundiagnostik ein Differentialblutbild und die Ergebnisse der Zytologie vorliegen, um für den Einzelfall beurteilen zu können, ob eine immunologische Untersuchung mittels der FACS-Analyse indiziert ist. Ratsam sind Angaben zur Klinik der Erkrankung, um ein geeignetes Antikörper-Panel auswählen zu können.

#### *Probenmaterial: Entnahme des Knochenmarks und Zellzählung*

Zur Gewinnung des Probenmaterials wurde die Christa iliaca posterior superior in Jamshidi-Technik punktiert und das Knochenmark aspiriert. Anschließend wurden die Proben sofort mit Heparin zur Gerinnungshemmung versetzt und nach einer maximalen Lagerungszeit von 24 Stunden weiterverarbeitet. Wichtig ist, dass hierbei die Heparinkonzentration nicht überschritten wird, da dieses zelltoxisch wirkt. Probenmaterial mit einem hohen Anteil an toten Zellen und Zelldebris ist für durchflußzytometrischer Analysen nicht geeignet, da mit hoher Autofluoreszenz und unspezifischer Antikörperbindung zurechnen ist.

#### *Screening*

Zur immunologischen Oberflächenantigenphänotypisierung wurden die Knochenmarkproben zunächst mit einem Screening-Panel von 6 monoklonalen direkt fluorochrom-konjugierten Antikörpern (siehe Anhang: **Tabelle VII.4a**; S. 72) mittels der Dreifarben-Analyse (Phycoerythrin (PE); Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) und PE-Cy5 (Cychrome)) untersucht. Die verwendeten Antikörper reagierten mit linienspezifischen (B- bzw. T-Zellreihe) als auch linienunspezifischen Antigenstrukturen und ermöglichten einen allgemeinen Überblick über die quantitative Zusammensetzung des Aspirates. Durch die Bestimmung des T-Zell-Anteils ist es zudem möglich eine eventuelle Kontamination des Knochenmarksaspirates mit peripherem Blut abzuschätzen und somit Aussagen über die Repräsentativität der Probe zu treffen. Detaillierte Angaben zu den einzelnen Arbeitsschritten werden in **Tabelle III.2** auf Seite 35 aufgeführt.

#### *Verwendete Antikörper*

Monoklonale Antikörper, die das gleiche humane Leukozytenantigen erkennen, kommen in ein (Antikörper-) cluster of differentiation (CD). Bei der Auswahl der Antikörper gilt es zu berücksichtigen, dass diese mit unterschiedlichen Epitopen des Antigen-Moleküls reagieren

können. Die unterschiedlichen Affinitäten könnten Auswirkungen auf die Nachweisempfindlichkeit haben, da sich je nach verwendetem Antikörper unterschiedliche Prozentwerte für die Subpopulationen ergeben würden. Daher sollten in den Untersuchungen immer Antikörper des gleichen Klons eingesetzt werden, damit die Daten untereinander verglichen werden können.

Nachfolgend sind die in den Untersuchungen verwendeten Antikörper tabellarisch nach dem Namen des Antikörpers, der entsprechenden CD-Nomenklatur, dem Hersteller des Antikörpers, dem entsprechenden Klon und konjugiertem Fluorochrom/-en aufgeführt (vgl. nächste Seite **Tab. III.1**).

<b>Tabelle III.1: Zusammenstellung der verwendeten Antikörper</b>				
<b>CD-Nomenklatur</b>	<b>Antikörpername</b>	<b>Hersteller Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Fluorochrom</b>
ungeclustert	(IgG1/IgG1)	Beckman Coulter	679.1Mc7	FITC/PE
3	CD3	Beckman Coulter	UCHT1	FITC
4	T4	Beckman Coulter	13B8.2	PE
5	TP67	Beckman Coulter	BL1a	FITC
7	TP41	Beckman Coulter	8H8.1	PE
8	Leu-2	Beckman Coulter	B9.11	FITC
10	CALLA	Beckman Coulter	ALB2	FITC
13	Aminopeptidase N	Beckman Coulter	SJ1D1	PE
14	LPS-R	Beckman Coulter	RMO52	PE
19	B4	Beckman Coulter	J4.119	PE/PECy5
20	Bp35	Beckman Coulter	B9E9	PE
22	Leu-14	Beckman Coulter	SJ.10.1H11	FITC
23	BLAST-2	Beckman Coulter	9P25	FITC
33	P67	Beckman Coulter	D3HL60.251	PE
34	gp105-120	Beckman Coulter	581	FITC
38	T10	Beckman Coulter	T16	FITC
45	LCA	Beckman Coulter	J33	FITC/PECy5
71	Transferrin receptor	Beckman Coulter	YDJ.1.2.2.	FITC
103	HML-1	Beckman Coulter	2G5	FITC
138	Syndecan-1	Beckman Coulter	B-B4	PE
ungeclustert	Ant-λ	Beckman Coulter	Polyklonal	FITC
ungeclustert	Anti-κ	Beckman Coulter	Polyclonal	FITC

Legende: FITC Fluoresceinisothiocyanat; PE Phycoerythrin; PECy5 Cychrome

Zur Identifikation der Lymphozyten mit ihren unterschiedlichen Antigenstrukturen wurden direkt Fluorochrom-konjugierte monoklonale Antikörper in der Technik der Doppelfärbung verwendet. Das Prinzip der Multiparameteranalyse besteht darin, Zellen über linienspezifische Antigene zu detektieren und mit Hilfe von Coexpressionen anderer Antigene eine eindeutige Zuordnung zum Zelltyp zu ermöglichen. Dazu wurden entsprechend den Herstellerangaben je 20 µl der jeweiligen Antikörperkombination (10 µl pro Antikörper) in die Probenröhrchen pipettiert und 100 µl des Probenmaterials dazugegeben. Der Ansatz inkubierte 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Bei jeder Untersuchung lief von der Probe eine zusätzliche Negativkontrolle als Leerwert mit. Dabei wurden die Zellen mit nicht-reaktiven Antikörpern inkubiert und in gleicher Weise wie die Messproben der spezifischen Antikörper behandelt. Die verwendeten isotypischen Antikörper IgG1/IgG1 wurden für die Doppelfärbung FITC und PE-markiert. Anhand der Negativkontrollen konnten somit die Autofluoreszenz von Zellen und unspezifische Bindungen der Antikörper unter anderem über Fc-Rezeptoren analysiert werden.

### **3.3.1 Probenaufbereitung**

Bevor durchflußzytometrische Analysen zur Identifikation der Lymphozytenpopulationen durchgeführt werden konnten, wurden die mononukleären Zellen mit der Dichtegradienten-Zentrifugationsmethode aus dem Probenansatz isoliert. Hierfür wurde zunächst das Knochenmarkspirat mit Phosphat-Buffered-Salt-Solution (PBS) im Verhältnis 1:2 verdünnt und dann vorsichtig auf Ficoll hypaque pipettiert. Ficoll hypaque ist ein Flotationsmittel mit einer Dichte (1.077), die so gewählt ist, dass sich mononukleäre Zellen an der Grenzschicht Ficoll/Plasma ansammeln, hingegen Zellen höherer Dichte - Erythrozyten, Granulozyten - absinken. Nach erfolgter Zentrifugation wurde der Zellring mononukleärer Zellen vorsichtig abpipettiert und mit PBS gewaschen. Um eine Verunreinigungen mit Erythrozyten und Erythrozytenvorläufern gänzlich auszuschließen, erfolgte eine zusätzliche Erythrozytolysen mit dem Peli Lyse Puffer (Hersteller Hiss). Die Lysing-Gebrauchslösung wurde nach Herstellerangaben mit destilliertem Wasser im Verhältnis 1:10 verdünnt und das Zellpellet in ca. 10 ml resuspendiert. Innerhalb kürzester Zeit lysierten die verbliebenen späten erythropoetischen Zellen und Erythrozyten auf Grund ihrer geringen osmotischen Resistenz. Nach erfolgreicher Elimination wurde der Peli Lyse Puffer durch zweimaliges Waschen mit PBS aus dem Probenröhrchen entfernt. Zu beachten ist, dass die Anwendung der Lyse-Gebrauchslösung und die mehrfachen Waschungen zu Zellverlusten führen können. Jedoch wird durch Entfernung des Peli Lyse Puffers die Probenstabilität erhöht und eine

fortschreitende Lyse der zu analysierenden Leukozyten verhindert. Zum Schluß folgte die maschinelle Zellzahlbestimmung mit dem Coulter (Beckmann Coulter). Detaillierte Angaben zu den einzelnen Arbeitsschritten werden in **Tabelle III.3** auf der Seite 36 aufgeführt.

Zur Bestimmung der quantitativen Zusammensetzung des Primäraspirates vor Anreicherung der mononukleären Zellen (Screening, siehe oben) wurde ein Aliquot des Aspirates ausschließlich mit Lyse mittels Quicklyse (Hersteller MEDAC) behandelt.

### **3.3.2 Messung mit dem Durchflußzytometer**

Die durchflußzytometrischen Messungen wurden im FACS-Labor der 3. Medizinischen Klinik, Abteilung Hämatologie/Onkologie, im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München durchgeführt.

#### ***Prinzip der Durchflußzytometrie***

Die Durchflußzytometrie weist anhand fluoreszenz-markierter Antikörper Oberflächenantigene und intrazytoplasmatisch gelegene Antigene nach. Im Gegensatz zur Immunfluoreszenz-Mikroskopie liegen die Zellen in einer Zellsuspension vor und sind nicht adhärent. Ebenso erfolgt die Beurteilung der Fluoreszenzintensität objektiv durch Photomultiplier und nicht subjektiv durch das menschliche Auge.

#### ***Aufbau und Messprinzip des Gerätes***

Das Durchflußzytometer ist ein opto-elektronisches Meßsystem, das optische Signale unterschiedlicher Herkunft (Lichtstreuung und Fluoreszenzsignale) detektiert. Der Messaufbau besteht aus den drei wesentlichen Elementen: der Lichtquelle, der Durchflußzelle und dem opto-elektronischen Detektionssystem. Als Lichtquelle dient ein luftgekühlter Laser mit 488 nm Wellenlänge.

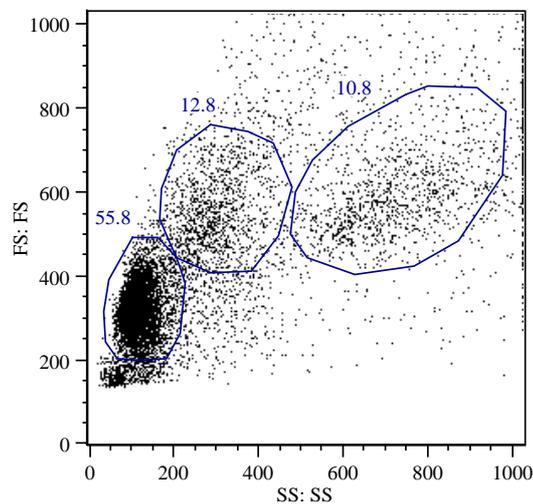
In der Durchflußzelle wird die vorbereitete Proben-Zellsuspension in die Messkammer eingeführt. Die Zellen werden dann durch den sie umgebenden Hüllstrom perlschnurartig aufgereiht durch den Laserstrahl bewegt.

Im opto-elektronischen Detektionssystem erfolgt die Quantifizierung der Fluoreszenz- und Streulichtwerte jeder einzelnen Zelle mittels Detektoren.

Bei der Lichtstreuung interagieren die einzelnen Zelle mit dem Lichtstrahl, der in Abhängigkeit von Probenbestandteilen gestreut wird, während die Wellenlänge unverändert bleibt. Der Anteil des Lichtes, der in Vorwärtsrichtung entlang des einfallenden Lichtstrahls

mit einem Ablenkungswinkel von  $0^\circ$  streut, wird als Vorwärtsstreulicht (Vorward scatter) bezeichnet und erfaßt die Größe der Zelle. Der Anteil des Lichtes, der im rechten Winkel zur Achse des Laserstrahls streut, wird als Seitwärtsstreulicht (Side scatter) bezeichnet und erfaßt die Granularität der Zelle. Aufgrund dieser beiden Parameter können die drei Hauptleukozytenpopulationen, Lymphozyten, Monozyten und die Granulozyten unterschieden werden. Durch das manuelle Setzen eines Gate's (sogenanntes „Gating“) ist die Selektion einer spezifischen Zellpopulation möglich. Hierbei wird ein Software-Fensters um eine bestimmte Zellwolke gelegt, deren Fluoreszenz-(Antigen-) Eigenschaften näher bestimmt werden sollen (siehe **Abb. III.2**)

**Abb. III.2:** Vorwärts-Seitwärts-Streulicht Darstellung der gemessenen Zellen



Legende: Verteilung der Zellpopulationen nach Ficoll-Separation mit Software-Gates um die Lymphozyten, Monozyten und Granulozytenpopulationen.

Zeitgleich mit der Lichtstreuung wurde die Fluoreszenz der unterschiedlich fluorochromierten Antikörper gemessen.

Fluorochrome besitzen die Eigenschaft, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und mit weniger Energie wieder abzugeben. Während der Lichtabsorption werden ihre Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben und beim Zurückfallen auf ein niedrigeres Energieniveau als Licht wieder abgeben (Emission). Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet.

Die durchflußzytometrischen Analysen wurden mit den Fluorochromen Phycoerythrin (PE) und Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) durchgeführt. Nach Anregung mit dem Laserlicht der

Wellenlänge 488 nm wurde für PE die Emissionwellenlänge von 575 nm gemessen und für FITC die von 525 nm. Aufgrund der unterschiedlichen Emissionsspektren der Fluorochrome eignen sich diese insbesondere für Doppelfärbungen, d.h. den gleichzeitigen Nachweis zweier Antigene auf derselben Zelle.

### 3.3.3 Auswertung der Messwerte

#### *Messung*

Bevor an dem Durchflußzytometer Messungen vorgenommen werden konnten, waren einige wichtige Voreinstellungen am Gerät notwendig. Um unerwünschte Partikel, wie z.B. tote Zellen oder Probenverunreinigungen, von der Messung auszuschließen, wurde in der Vorwärts-Seitwärts-Streulichtdarstellung ein Schwellenwert (Diskriminator) gesetzt, der Impulse unterhalb eines definierten Wertes der Vorwärtslicht-Streuung automatisch von der Analyse ausschloß.

Ein weiteres Problem bei den Messungen ergab sich aus dem Fluoreszenzspektrum der verwendeten Fluorochrome, das zu einer spektralen Überlappung der beiden Fluoreszenzbereiche führte, sodaß kompensiert werden musste um ein Lichtsignal eindeutig als FITC- oder PE-Lichtemission zu identifizieren. Zur Kompensation eigneten sich Lymphozyten gefärbt mit CD8-FITC und CD4-PE, da eine Koexpression der beiden Antigene bei peripheren Lymphozyten so gut wie nicht vorkommt (Nah EH, King DE et al. 1997). Um genaue durchflußzytometrische Messungen zu erhalten, ist eine korrekte Kompensation sehr wichtig, da eine Unterkompensation zu einem falsch-positiven Fluoreszenzsignal und eine Überkompensation zu einer Abschwächung des Fluoreszenzsignals geführt hätte. Lassen sich die Signale der beiden verschiedenen Fluorochrome nicht sauber voneinander trennen und werden koexprimierende CD4/CD8 Zellen nachgewiesen, kann das ein Hinweis auf neoplastische T-Lymphozyten bzw. kleine Subpopulation reifer Lymphozyten sein (Nah EH, King DE et al. 1997).

Nach Durchführung der Voreinstellungen am Gerät wurden pro Probenröhrchen 10.000 Zellen mit einer Flussrate von 300-700 Zellen pro Sekunde gemessen. Die Speicherung und Auswertung der Messdaten erfolgte mit der Hardware und Software der Firma Beckman Coulter.

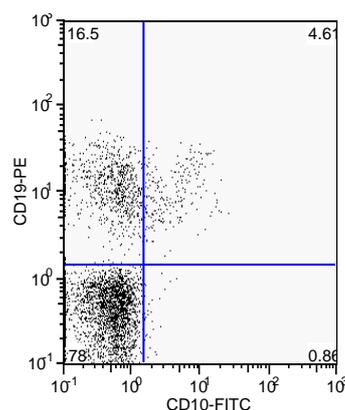
### *Auswertung der Messwerte*

In den vorliegenden Analysen wurden die Zellen nach den Parametern Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht untersucht und die Messdaten in einem sogenannten Zwei-Parameter-Streulichthistogramm dargestellt. Nur so war es möglich alle drei Hauptleukozytenpopulationen (Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten) sicher voneinander abzugrenzen. Als nächstes wurde um die Zellpopulation, die näher untersucht werden sollte, manuell ein „Gate“ gelegt. In den folgenden Histogrammen wurden nur die Zellen innerhalb der eingegrenzten Analysenregion auf ihr Fluoreszenzverhalten hin untersucht. Diese Vorauswahl bezüglich bestimmter Eigenschaften bzw. die Selektion einer spezifischen Zellpopulation wird als „Gating“ bezeichnet (vgl. **Abb. III.2**, S. 31)

Zur weiteren quantitativen Analyse der Meßdaten wurde die Quadrantenstatistik mit dem Software-Programm der Firma Beckman Coulter durchgeführt. Das individuelle Setzen der Quadranten ermöglichte die optimale Trennung einzelner Zellpopulationen voneinander und ermittelte die entsprechende prozentuale Verteilung der Lymphozytensubpopulationen.

Allgemein bestehen nach einer Doppelfärbung mit markierten Antikörpern die vier folgenden Darstellungsvarianten: Quadranten 1 und 4 beinhalten die Lymphozyten, die nur für eine Markierung positiv sind. Quadrant 2 beinhaltet die Lymphozyten, die für beide Markierungen positiv sind und Quadrant 3 die für beide Markierungen negativ sind (vgl. **Abb. III.3**)

**Abb.III.3:** Verteilung der Zellpopulationen am Beispiel CD10/CD19 Messung



Legende: Quadrant 1: ausschließlich CD19 positive Zellen; Quadrant 2: CD19 positive und CD10 positive Zellen; Quadrant 4: ausschließlich CD10 positive Zellen; Quadrant 3: CD10 negative und CD19 negative Zellen.

Damit der gesamte Anteil für ein Antigen ermittelt werden konnte, wurden die entsprechenden Antigenanteile aus den je zwei Quadranten, für die das Antigen positiv war addiert. Der Antigenanteil, der durch einen FITC-konjugierten Antikörper detektiert wurde, addierte sich aus den Quadranten 2 und 4, der mit Hilfe eines PE-konjugierten Antikörpers aus den Quadranten 1 und 2.

Wichtig zur Beurteilung einer malignen B-Zell-Population ist die Koexpression bestimmter nicht linienspezifischer Antigene auf B-Zellen. Da mit Ausnahme der Plasmazellen alle B-Zellen CD19 exprimieren, wurde der anti-CD19-Antikörper mit jenen gegen nicht linienspezifische Antigene in Kombination eingesetzt. Hierdurch war es möglich den Anteil der B-Zellen zu ermitteln, die ein bestimmtes Antigen koexprimieren (siehe Anhang: **Tabelle VII.4b und VII.4c**, S. 72). In der Quadrantenstatistik stellten sich die Zellen im Quadranten 2 dar.

**Tabelle III.2:** Arbeitanleitung für das Screening

<b>Probenentnahme</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aspiration von 2 ml-10 ml Knochenmark unter sterilen Bedingungen aus der Crista iliaca posterior superior in Jamshidi-Technik.</li> <li>• Nach Entnahme behutsames Schwenken in der mit Heparin (5000 IE/ml) als Antikoagulanzen gefüllten Spritze.</li> </ul>
<b>Lagerung des Knochenmaraspirats</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aufbewahrung der unverarbeiteten heparinisierten Probe bei Raumtemperatur (22°C+/- 2°C); maximale Lagerungszeit der heparinisierten Probe (12-24 Stunden)</li> <li>• Zur eindeutigen Identifizierung Beschriftung der Probenröhrchen mit wasserfestem Stift.</li> </ul>
<b>Dreifachfarben Screening: Markierung der Lymphozyten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aspiriertes Knochenmark mit PBS im Verhältnis 1:2 verdünnen und mischen.</li> <li>• Entsprechend den Herstellerangaben 20 µl von der jeweiligen Antikörperkombination (Screening-Panel siehe Anhang 7.4 Tab.VII4.a, S. 88) in die sterilen Probenröhrchen 1 und 2 pipettieren;</li> <li>• in jedes Röhrchen 100 µl der verdünnten Zellsuspension pipettieren;</li> <li>• mischen mit "Vortex"-Mischer;</li> <li>• Proben 15 Minuten bei 4°C inkubieren;</li> <li>• das restliche verdünnte Patientenmaterial auf Ficoll legen.</li> </ul>
<b>Screening mit Dreifachfärbung: Markierung der Lymphozyten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 ml der Quicklyse (Medac-Lyse) in jedes Probenröhrchen pipettieren;</li> <li>• mischen mit "Vortex"-Mischer;</li> <li>• 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln auf Rollmischer inkubieren.</li> </ul>
<b>Aufbereitete Probe und Lagerung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die Proben mit der "Hettich/Rotanter/PRC 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugieren;</li> <li>• zellfreien Überstand dekantieren;</li> <li>• Resuspension des Zellpellets durch Einpipettieren von 500 µl PBS/BSA;</li> <li>• Aufbewahren der Probenröhrchen bis zur Messung im Kühlschrank dunkel bei 4°C</li> </ul>
<b>Probenanalyse</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aufrufen des Probenanalyse-Programm (Beckman Coulter)</li> <li>• Probenröhrchen mit "Vortex"-Mischer mischen;</li> <li>• setzen des Schwellenwertes in der Vorwärts/Seitwärts-Streulichtdarstellung</li> <li>• Kompensation</li> <li>• Datenaufnahme von 10 000 Zellen bei einer Flussrate von 300 – 700 Zellen/sec</li> </ul>
<b>Datenauswertung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die ermittelten Messwerte werden mit dem Probenanalyse-Programm (Beckman Coulter) ausgewertet und ausgedruckt;</li> <li>• Quadrantenstatistik</li> </ul>
<b>Ergebnisarchivierung</b>	

<b>Tabelle III.3: Arbeitsanleitung für Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll hypaque</b>	
<b>Auf Ficoll legen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• In ein steriles Plastikröhrchen (50 ml) ca. 20 ml Ficoll hypaque (Biochrom AG) pipettieren und das verdünnte Knochenmark/PBS vorsichtig auf Ficoll hypaque pipettieren;</li> <li>• mit der "Hettich Rotanter/RPC" 20 Minuten bei automatisch wechsender U/min zentrifugieren; zellfreien Überstand abkippen.</li> </ul>
<b>1. Waschen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellpellets an der Grenzschicht abpipettieren, in ein zweites steriles Röhrchen geben und in 30-40 ml PBS resuspendieren;</li> <li>• Probe mischen mit "Vortex"-Mischer und 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugieren; zellfreien Überstand abkippen.</li> </ul>
<b>Erythrozytolys</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entsprechen den Herstellerangaben wird die Peli Lyse (Hersteller Hiss) 1:10 mit destiliertem Wasser verdünnt.</li> <li>• 10 ml dieser Lysis-Gebrauchslösung in das Probenröhrchen pipettiert;</li> <li>• mischen mit "Vortex"-Mischer; bei Raumtemperatur 10 Minuten auf den Rollmischer liegend, um verbliebene Erythrozyten zu lysieren.</li> </ul>
<b>2. Waschen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die Proben mit der "Hettich Rotanter/RPC" 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugieren; zellfreien Überstand dekantieren;</li> <li>• Resuspension des Zellpellets durch Einpipettieren von 20 ml PBS und mischen;</li> <li>• erneut bei 1500 U/min zentrifugieren und zellfreien Überstand dekantieren;</li> <li>• Resuspension des Zellpellets durch Einpipettieren von 1,5 ml PBS/BSA und mischen;</li> </ul>
<b>Bestimmung der Leukozytenzahl</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Im Coulter (Beckman Coulter)</li> <li>• optimale Zellzahl beträgt &lt; 10 000 Zellen/µl</li> </ul>
<b>Markierung der Lymphozyten</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entsprechend den Herstellerangaben werden je 20 µl der jeweiligen Antikörperkombination (Grundpanel bzw. B-NHL-Panel siehe Anhang 7.4 Tab. VII.4.b-c, S. 88) in die Probenröhrchen pipettiert;</li> <li>• dazu 100 µl des Probenmaterials;</li> <li>• mischen mit "Vortex"-Mischer;</li> <li>• Proben 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubieren</li> </ul>
<b>3. Waschen Herauswaschen der überschüssigen Antikörper</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Probenröhrchen mit 2 ml PBS/BSA auffüllen und 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugieren;</li> </ul>
<b>Lagerung der aufbereiteten Proben</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellfreien Überstand dekantieren;</li> <li>• Resuspension der Proben mit 500 µl PBS/BSA und mischen;</li> <li>• Aufbewahrung der Zellsuspension bis zur Messung im Kühlschrank bei 4°C.</li> </ul>
<b>Probenanalyse + Datenauswertung + Ergebnisarchivierung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Entsprechend Screening-Arbeitsanleitung</li> </ul>

## 4 Ergebnisse

Bei der retrospektiven Archivsuche der Jahre 1998 bis 2003 fanden sich insgesamt 139 Knochenmarksbiopsien bzw. Knochenmarkaspirate von 91 Patienten mit Befall durch ein klinisch bekanntes follikuläres Lymphom. Die Gewebeblöcke der betreffenden Fälle wurden aus dem Archiv des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie herausgesucht und die Schnittpräparate von zwei Pathologen (Prof. Dr. Falko Fend, Dr. Markus Kremer) evaluiert und gegebenenfalls reklassifiziert.

Initial wurden 30 diskordante Fälle in die Studie aufgenommen, bei denen entweder die Histologie oder die Durchflußzytometrie einen diskrepanten Befund bezüglich des Nachweises einer Knochenmarksinfiltration zeigten.

Nach Reevaluierung der oben genannten diskordanten durchflußzytometrischen und histologischen Befunde mit zusätzlicher Immunhistochemie konnten insgesamt 9 Fälle reklassifiziert werden. In 3 Fällen wurde aufgrund der Durchflußzytometrie bei Erstdurchsicht der Listmodedaten eine klonale Population nicht gesehen. Die entsprechenden durchflußzytometrisch detektierten klonalen B-Zell-Populationen bewegten sich zwischen 3,5 und 8%. 6 Fälle wurde mittels der Histologie reklassifiziert. Nach erneuter Betrachtung von morphologischen und immunhistochemischen Kriterien wurden 5 Fälle als reaktive lymphozytäre oder atypische lymphoide Infiltrate gewertet. Bei ihnen konnte letztlich ohne molekularpathologische Untersuchungen nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich um Lymphominfiltrate handelte. Demnach besteht in diesen Fällen morphologisch und immunphänotypisch eine Restunsicherheit. Bei einem Fall konnte durch zusätzliche immunhistologische Untersuchungen ein kleines Lymphominfiltrat nachgewiesen, das morphologisch übersehen wurde.

Schließlich blieben nach Review insgesamt 19 diskordante Fälle, bei denen nur eine der beiden Untersuchungsmethoden eine Beteiligung des Markorgans erfasste. Davon erbrachte die Histologie in 5 Fällen und die Durchflußzytometrie in 14 Fällen ein falsch-negatives Ergebnis.

Bei 79 der insgesamt 139 Knochenmarksbiopsien bzw. Knochenmarkaspiraten diagnostizierten beide Methoden übereinstimmend keine Beteiligung des Markorgans (konkordant negative Fälle). In weiteren 41 Entnahmen bestätigte sowohl der histologische als auch der durchflußzytometrische Befund eine Knochenmarksinfiltration (konkordant positive Fälle) (vgl. nächste Seite **Tab. IV.1**).

Entsprechend der histologischen und durchflußzytometrischen Befunde fand eine Gruppierung aller Fälle (n= 139) in vier unterschiedliche Kategorien statt:

**I. *konkordant positiv:***

Morphologisch und durchflußzytometrisch übereinstimmend ein Lymphombefall des Knochenmarks,

**II. *konkordant negativ:***

Morphologisch und durchflußzytometrisch übereinstimmend kein Lymphombefall des Knochenmarks,

**III. *diskordant positiv:***

Morphologischer Nachweis einer Knochenmarkinfiltration bei durchflußzytometrisch falsch-negativem Befund,

**IV. *diskordant negativ:***

Morphologisch falsch-negativer Befund bei durchflußzytometrischem Nachweis einer Knochenmarkinfiltration,

<b>Tab. IV.1: Untersuchungsergebnis Biopsie/Knochenmarkaspirat</b>				
<b>Durchflußzytometrie</b>				
		<b>Positiv</b>	<b>Negativ</b>	<b>Total</b>
<b>Histologie</b>	<b>Positiv</b>	41 (29,5%)	<b>14</b> <b>(10,1%)</b>	55 (39,6%)
	<b>Negativ</b>	<b>5</b> <b>(3,5%)</b>	79 (56,9%)	84 (60,4%)
	<b>Total</b>	46 (33%)	93 (67%)	139

## 4.1 Histologie

Das Knochenmark zeigte in 84 der Fälle (60,4%) keinen und 55 der Fälle (39,6%) eine Beteiligung des Markorgans. In den histologisch positiven Fällen lag das mittlere Infiltrationsvolumen bei 20% (5% bis 90%). Für die Untersuchungen wurden ausschließlich die Knochenmarkbiopsien als positiv eingestuft, bei denen ein eindeutiges Infiltrationsmuster vermerkt werden konnte. Insgesamt zeigte sich in 19 Fällen (13,7%) eine diagnostische Diskordanz zwischen beiden Methoden. In nur 5 Fällen (3,5%) konnte ein durchflußzytometrisch positiver Befund morphologisch nicht bestätigt werden. In weiteren 14 Fällen (10,1%) diagnostizierte die histologische Untersuchung einen Knochenmarkbefall, den die Durchflußzytometrie nicht bestätigen konnte. Die gewonnenen Beckenkammbiopsien galten mehrheitlich als repräsentativ. Insbesondere die morphologisch diskrepanten Studienfälle wurden erneut histologisch evaluiert und gegebenenfalls zusätzliche immunhistologische Untersuchungen mit Antikörpern gegen CD3, CD10 und CD20 durchgeführt.

### 4.1.1 Konkordante Fälle

Die Ergebnisse der Morphologie und Durchflußzytometrie stimmten in 86% der Fälle (120 von 139) überein. In 29,5% (41 von 139) konnte sowohl histologisch als auch durchflußzytometrisch eine Knochenmarkinfiltration bestätigt werden. Das mittlere Infiltrationsvolumen lag in diesen Fällen bei 20% (5% bis 90%).

In weiteren 56,9% (79 von 139) konnte mit keiner der beiden Methoden der Nachweis einer Beteiligung des Markorgans erzielt werden.

### 4.1.2 Diskordante Fälle

Nach Reevaluierung fanden sich insgesamt 19 diskordante Fälle von 17 Patienten bei denen die Primärdiagnose des follikulären Lymphoms anhand von Lymphknotenbiopsien (n= 12) und extranodalem Tumorgewebe (n= 7) gestellt wurde. Von den 17 Patienten waren 10 weiblich und 7 männlich mit einem Altersmedian zum Zeitpunkt der Primärdiagnose von 46 Jahren (30 bis 77 Jahre).

Die entsprechenden 19 Knochenmarkbiopsien wurden auf Stanzenlänge, Lymphom-Grad, KM-Infiltrationsvolumen, Infiltrationsmuster und Ausmaß der intrafokalen Fibrose untersucht. Die erzielten klinischen Daten sind in den **Tabellen IV.2a** und **IV.2b** (nächste Seite) aufgeführt.

Tabelle IV.2a: Klinische Daten der diskordant positiven Studienfälle (KM+/FC-)							
Fall	Alter	Geschlecht	Stanzenlänge cm	Lymphomgrad	Knochenmarkinfiltration %	Infiltrationsmuster	Fibrosegrad
1	w	53	2,0	1	5	z	1
2	m	39	2,0	1	5	z	1
3	m	64	2,0	1	5	p	1
4	m	64	0,8	1	5	z	1
5	w	32	2,0	1	10	p/z	2
6	w	83	1,5	1	10	p/z	1
7	w	80	1,3	1	25	p	1
8	m	60	2,0	1	<5	p	1
9	w	57	1,0	2	10	p/z	1
10	w	77	1,5	1	5	p/z	1
11	w	62	2,5	2	10	p	2
12	m	66	2,0	1	<5	p	1
13	w	70	1,5	1	50	p/z	1
14	w	70	2,8	1	5	p/z	1

Legende:w= weiblich; m= männlich; p= paratrabekulär; z = zentral; KM= Knochenmark; FC= Flow cytometry

Tabelle IV.2b: Klinische Daten der diskordant negativen Studienfälle (KM-/FC+)							
Fall	Alter	Geschlecht	Stanzenlänge cm	Lymphomgrad	Knochenmarkinfiltration %	Infiltrationsmuster	Fibrosegrad
1	m	44	1,5	-	-	-	-
2	w	82	0,4	-	-	-	-
3	w	63	2,5	-	-	-	-
4	w	60	1,1	-	-	-	-
5	m	42	1,0	-	-	-	-

Legende: w= weiblich; m= männlich; p= paratrabekulär; z = zentral; KM= Knochenmark; FC= Flow cytometry

### 4.1.3 Ergebnisse der Histologie diskordanter Fälle

#### *Diskordant positive Fälle*

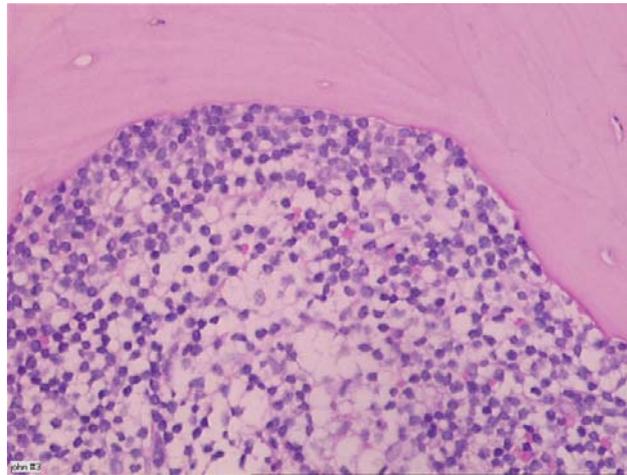
In den 14 diskordant positiven Studienfällen besaßen die entnommenen Knochenmarkstanzen eine mittlere Länge von 1,8 cm (0,8 cm bis 2,8 cm) und waren alle repräsentativ.

Bei 12 Fällen präsentierten die Infiltrate das histologische Bild eines follikulären Lymphoms Grad I und in 2 Fällen die eines Grad II (**Abb.IV.1**, S. 41). Die malignen Lymphominfiltrate im Knochenmark bestanden aus kleinen bis mittelgroßen Lymphozyten mit dichtem

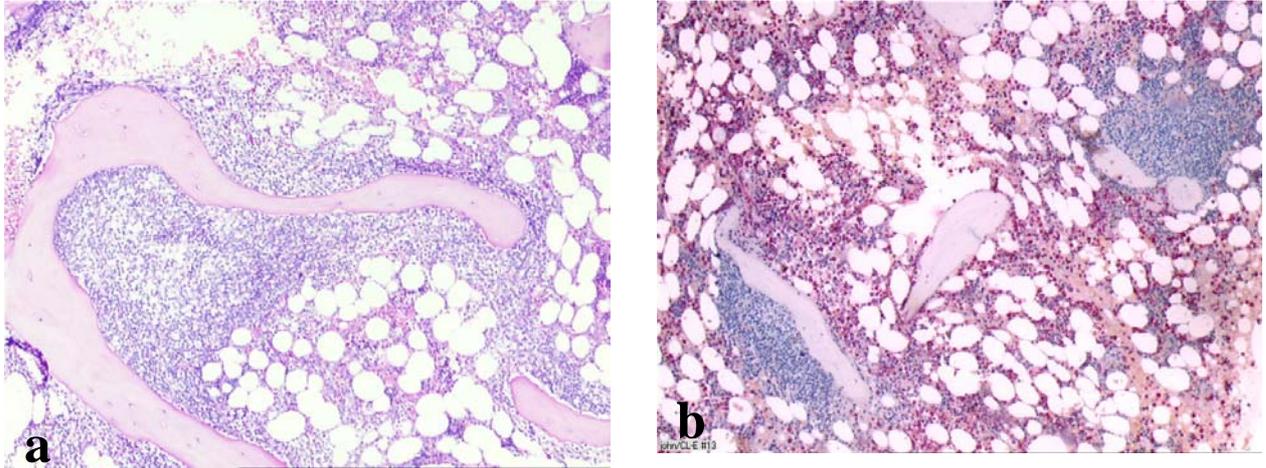
Kernchromatin und wenig Zytoplasma, durchmischt mit sehr wenigen Blasten und vermehrten Retikulinfasern. Bei 2 von 14 Studienfällen lag eine Transformation in ein hochmalignes Lymphom mit überwiegend blastärer Zellkomponente vor.

Das mittlere Ausmaß der Knochenmarkinfiltration aller untersuchten Fälle (n= 14) betrug 11% (5% bis 50%). Es konnten drei verschiedene Wachstums- und Infiltrationsmuster – paratrabekulär, markzentral/paratrabekulär und markzentral – voneinander abgegrenzt werden. In 5 Fällen dominierte ein paratrabekuläres Muster, welches vor allem für folliculäre Lymphome beschrieben ist (Coller BS, Chabner BA et al. 1977), während 6 weitere Fälle ein gemischt zentral/paratrabekuläres Muster präsentierten (**Abb.IV.2**, S. 42). Die drei verbleibenden Fälle wiesen dicht gepackte markzentrale Infiltrate auf, die weitgehend aus einer homogenen Lymphozyten-Population bestanden und zur Umgebung hin unscharf begrenzt waren.

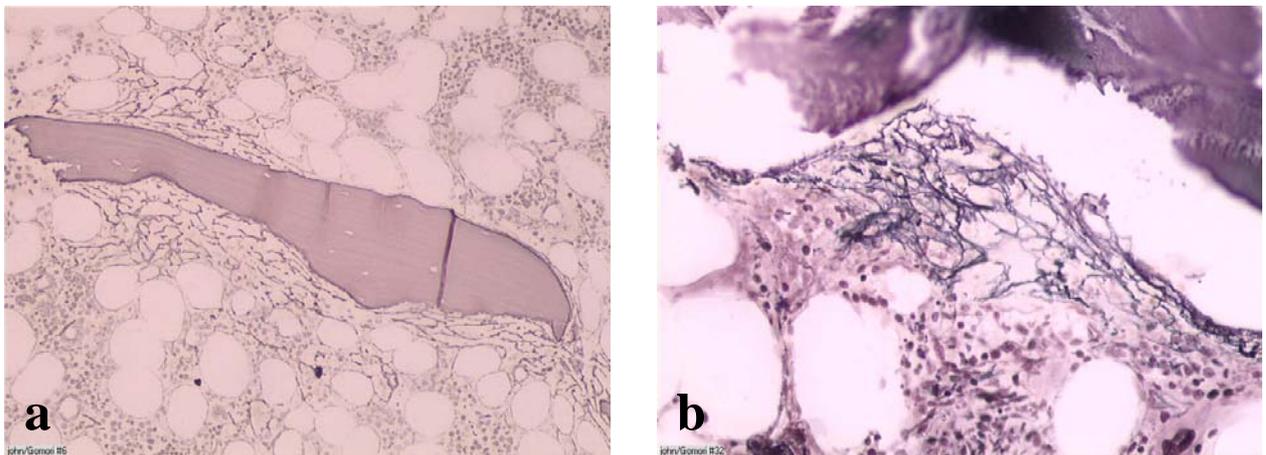
Untersuchungen bezüglich des Fibrosegrades innerhalb der malignen Infiltrate zeigten in 12 Fällen einen Fibrosegrad I und in zwei Fällen einen Fibrosegrad II (**Abb.IV.3**, S. 42).



**Abb.IV.1:** Follikuläres Lymphom Grad I: Knochenmark (HE; 200fach).



**Abb.IV.2:** Follikuläres Lymphom mit paratrabekulärem Infiltrationsmuster (**a**); Follikuläres Lymphom mit gemischt zentral/paratrabekulärem Infiltrationsmuster (**b**). a: Knochenmark (HE; 400fach); b: Knochenmark (CL-E; 400fach)



**Abb.IV.3:** Follikuläres Lymphom Grad I mit Fibrosegrad I (**a**); Follikuläres Lymphom Grad II mit Fibrosegrad II (**b**). a: Knochenmark (Gomori; 100fach); b: Knochenmark (Gomori; 200fach)

### ***Diskordant negative Fälle***

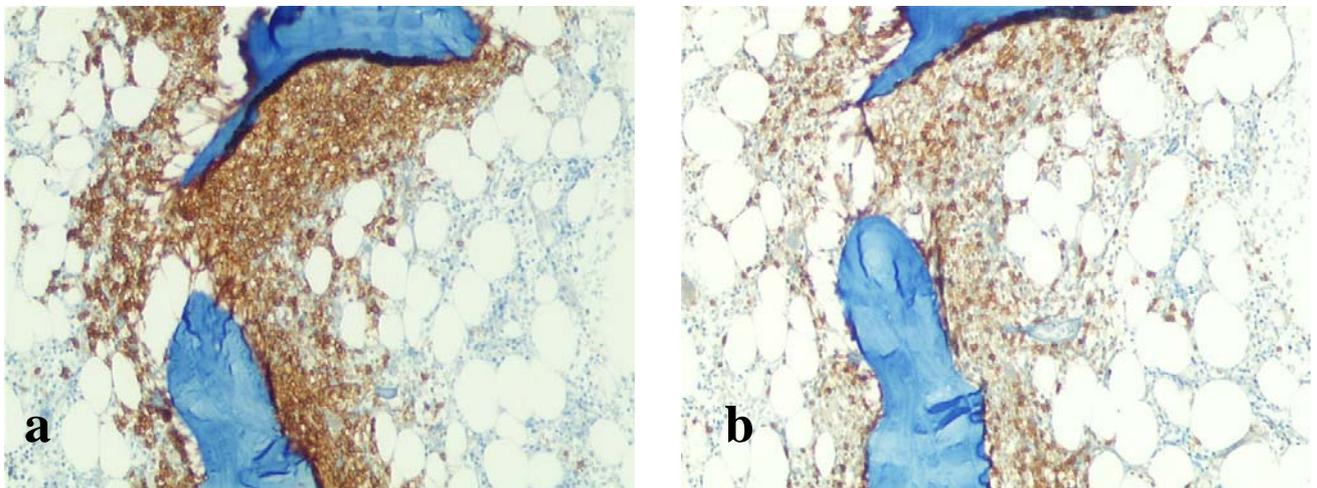
In den 5 diskordant negativen Fällen betrug die mittlere Biopsielänge 1,3 cm (0,4cm bis 2,5 cm), in zwei Fällen maß diese lediglich  $\leq 1$  cm mit reichlich kortikalem Gewebe. Bei zwei weiteren Studienfällen konnte jeweils ein kleines Infiltrat diagnostiziert werden, das aufgrund seiner markzentralen Lage und zusätzlicher immunohistochemischer Färbungen mit CD3, CD10 und CD20 als reaktiv klassifiziert wurde. Nur in einem der 5 Fälle (20%) lag eine repräsentative Gewebeprobe vor, in der definitiv keine Knochenmarkinfiltration durch neoplastische Zellen nachgewiesen werden konnte.

#### 4.1.4 Ergebnisse der Immunhistochemie diskordanter Fälle

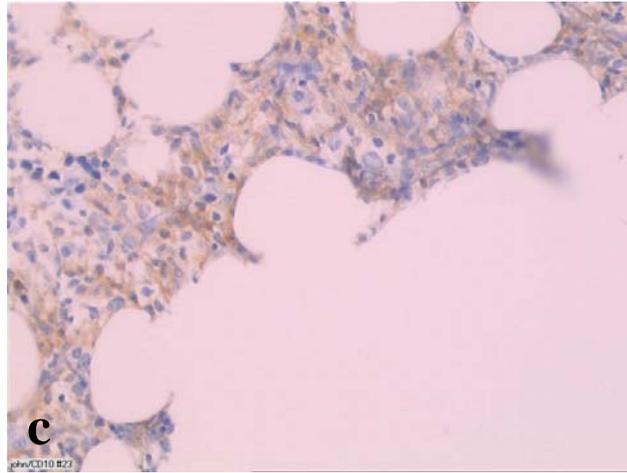
##### *Diskordant positive Fälle*

Alle untersuchten 14 diskordant positiven Knochenmarkbiopsien (100%) zeigten eine Positivität für das CD20-Antigen, welches auf B-Zellen follikulärer Lymphome vorkommt (**Abb. IV.4a**). Für das CD3-Antigen hingegen waren die Lymphomzellen in 11 der 14 Fälle (78,6%) negativ (**Abb.IV.4b**). Die Knochenmarkproben der 3 verbleibenden Fälle zeigten keine Reaktion mit dem CD3-Antikörper. Eine nur schwache Positivität für das CD10-Antigen wiesen die neoplastischen Zellen bei 4 von 14 Studienfällen (28,6%) auf, wobei 4 weitere Fälle kein CD10-Antigen exprimierten (**Abb.IV.4c**, S. 44) Ein derartiges Phänomen wird bei follikulären Lymphomen im Knochenmark häufig beobachtet, da es sich bei dieser Entität um eine Neoplasie der reifen B-Zellen handelt, die selten im Knochenmark vorkommen und normalerweise CD10 negativ sind.

In den 6 übrigen Fällen kam es in 3 Fällen zu keiner Gewebereaktion mit dem CD10-Antikörper und in den anderen 3 Fällen wurden keine immunhistochemie Färbung durchgeführt.



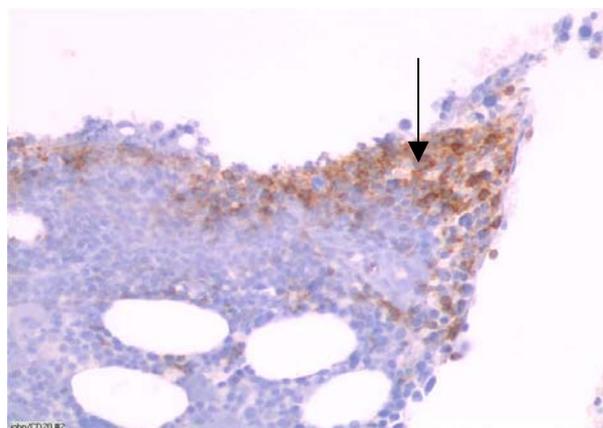
**Abb.IV.4:** zahlreiche paratrabekulär gelegene CD20-positive (a) (100fach) und CD3-negative B-Lymphozyten (b) (100fach) im Knochenmark.



**Abb.IV.4c:** Lymphomzellen mit schwacher Positivität für das CD10-Antigen (c) (200fach) im Knochenmark.

### *Diskordant negative Fälle*

Von den 5 diskordant negativen Studienfällen waren 3 negativ für CD20 (60%). In den weiteren 2 Fällen (40%) wurde jeweils ein kleines markzentrales Infiltrat diagnostiziert ohne Nachweis eines Lymphoms. Davon zeigte ein Fall eine CD20-Positivität (**Abb.IV.5**). Aufgrund der markzentralen Lage der Läsionen wurden beide Fälle als reaktive lymphoide Infiltrate (auch bezeichnet als atypische lymphoide Infiltrate (ALI)) klassifiziert. Ferner exprimierten die Zellen bei 2 von 5 Fällen kein CD3-Antigen (40%). Bei den 3 weiteren wurde in zwei Fällen keine immunhistochemische Färbung für CD3 durchgeführt und in einem Fall blieb die Reaktion des Gewebes mit dem Antikörper aus. Eine immunhistologische Färbung gegen das Antigen CD10 wurde bei keinem der 5 diskordant negativen Studienfälle vorgenommen.



**Abb.IV.5:** Kleines Infiltrat ohne Nachweis eines Lymphoms mit CD20-positiven lymphoiden Zellen, das aufgrund der markzentralen Lage als atypisch lymphoides Infiltrat (ALI) gewertet wurde; Knochenmark (200fach)

## 4.2 Durchflußzytometrie

Von den 139 Studienfällen erzielte die Durchflußzytometrie in 93 der Fälle (67%) keinen und in 46 der Fälle (33%) den Nachweis einer Knochenmarkinfiltration durch das folliculäre Lymphom. Ferner bestätigte diese Methode 41 der insgesamt 55 (74,5%) knochenmarksbiologisch positiven Befunde.

Im Folgenden werden Ergebnisse der Durchflußzytometrie dargestellt:

### 4.2.1 Konkordante Fälle

Die Anzahl konkordanter Fälle wurden zuvor in Abschnitt 4.1.1 aufgeführt und wird an dieser Stelle nicht nochmals erwähnt.

Hinzuzufügen ist, dass bei den insgesamt 41 konkordant positiven Fällen der monoklonale B-Zell Anteil im Lymphozytengate im Mittel 14% (1% bis 94%) betrug, während das mittlere Infiltrationsvolumen knochenmarksbiologisch mit 25% (5% bis 90%) angegeben wurde.

### 4.2.2 Diskordante Fälle

#### *Diskordant positive Fälle*

In 14 von 139 Fällen (10%) diagnostizierte die Durchflußzytometrie einen falsch-negativen Befund. Die malignen Infiltrate waren vorwiegend paratrabekulär gelegen mit intrafokaler Fibrose. Das mittlere KM-Infiltrationsvolumen dieser Fälle betrug lediglich 11% (<5% bis 50%).

Die anschließenden Untersuchungen versuchten einen möglichen Zusammenhang zwischen der Rate falsch-negativer durchflußzytometrischer Befunde und dem knochenmarksbiologisch eingeschätzten Infiltrationsvolumen festzustellen. Hierzu wurden alle Studienfälle (55 von 139, 39,6%) berücksichtigt, welche in der Histologie einen Lymphombefall des Markraumes präsentierten. Diese setzten sich aus den 41 konkordant positiven Fälle zusammen, in denen beide Methoden übereinstimmend eine Beteiligung des Markorgans diagnostizierten und den 14 diskordant positiven Fällen, in denen lediglich die Histologie den Nachweis erbrachte. In den konkordant positiven Fällen lag das mittlere Infiltrationsvolumen bei 25% (von 5% bis 90%). Bei den diskordant positiven Fällen dominierte ein peritrabekuläres Wachstumsmuster, welches im Durchschnitt 20% des Markraumes einnahm. Wurde das Infiltrationsvolumen mit  $\geq 20\%$  angegeben, konnte in 21 der 55 Fälle durchflußzytometrisch das Lymphom bestätigt und in zwei Fällen nicht bestätigt werden, sodaß die Rate falsch-negativer Befunde 9% ergab.

Bei einem Ausmaß zwischen 10% und 19% diagnostizierte die Durchflußzytometrie in 13 Fällen einen und in vier Fällen keinen Befall, entsprechend einer falsch-negativen Rate von 24%. Schätzte die Histologie das Infiltrationsvolumen <10% ein, konnte in 7 Fällen durchflußzytometrisch ein Befall des Markraums erfaßt und in 8 Fällen nicht erfaßt werden, demnach lag der ermittelte Anteil falsch-negativer Befunde bei 53% (vgl. **Tab. IV.3**).

Die Untersuchungen verdeutlichen, dass der Anteil durchflußzytometrisch falsch-negativer Befunde mit dem knochenmarksbiotisch eingestuften Infiltrationsvolumen korreliert.

Mit abnehmendem Infiltrationsgrad nahm die Anzahl durchflußzytometrisch falsch-negativer Befunde zu.

<b>Tabelle IV.3:</b> Korrelation der falsch-negativen durchflußzytometrischen Ergebnisse mit dem Infiltrationsausmaß im Knochenmark				
<b>KM-Infiltration</b> (Histologie n=55)	<b>(n)</b>	<b>FACS</b> positiv	<b>FACS</b> negativ	<b>FACS</b> falsch-negativ
20%	23	21	2	9%
10-19%	17	13	4	24%
<b>&lt;10%</b>	<b>15</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>53%</b>

#### ***Diskordant negative Fälle***

In 5 von 139 Fällen (3,5%) konnte der durchflußzytometrische Nachweis einer Knochenmarksinfiltration morphologisch nicht bestätigt werden. Für diese Fälle betrug der Anteil der detektierten klonalen B-Zell-Populationen bezogen auf das Lymphozytengate nach Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque 1% bis 10%.

#### **4.2.3 Beurteilung des Infiltrationsvolumens im Knochenmark**

In weiteren Untersuchungen zeigte sich eine diagnostische Diskordanz zwischen beiden Methoden bei der Beurteilung des Infiltrationsvolumens im Knochenmark. Auffällig ist, daß das Infiltrationsvolumen knochenmarksbiotisch höher eingestuft wurde als durchflußzytometrisch. Hierzu wurde das im Screening eingesetzte Primärmaterial nach erfolgter Erythrozytenlyse auf den Anteil CD19 positiver B-Zellen untersucht und mit dem biotisch eingeschätzten Anteil CD20 positiver B-Lymphozyten verglichen. Insgesamt wurden 87 der 139 Studienfälle berücksichtigt. Die Histologie diagnostizierte in 33 der 87

Fälle (38%) einen Lymphombefall des Knochenmarks, in den restlichen 54 Fällen (62%) war dieses nicht infiltriert. In 11 der 87 Fälle (12,6%) wurde das Infiltrationsvolumen mit >20% angeführt. Im Primäraspirat entsprach dieses lediglich einem Anteil von 6,8% B-Zellen und 4,9% klonalen B-Zellen. Bei weiteren 12 Fällen (13,8%) lag das Ausmaß des Befalls zwischen 10% und 19%. Die entsprechenden Probenansätze erhielten nach erfolgter Erythrozytenlyse einen Anteil von nur 4,9% B-Zellen und 2,4% monoklonalen B-Zellen. In den verbleibenden knochenmarksbioptisch positiven Fällen (n= 10, 11,5%) wurde das Infiltrationsvolumen <10% eingeschätzt. Der in den Aspiraten erfasste Anteil an B-Zellen entsprach 2,1% und an klonalen B-Zellen 0,2%. Ebenfalls enthielten alle morphologisch negativen Fälle (n= 54) im Primärmaterial einen B-Zell-Anteil von 2,2%, wobei klonale B-Zellen fehlten (vgl. **Tab. IV.4**).

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass beide Methoden das Infiltrationsvolumen im Knochenmark unterschiedlich hoch einschätzen, da der durchflußzytometrisch ermittelte Anteil CD19 positiver B-Zellen im Primäraspirat nicht mit dem der CD20 positiven B-Lymphozyten im Trepanat übereinstimmt.

<b>Tabelle IV.4:</b> Vergleich CD20+ B-Zellen in der Biopsie mit CD19+ B-Zellen im Aspirat			
<b>Histologie</b>		<b>FACS</b>	<b>FACS</b>
KM-Infiltration (CD20+)	(n)	mittlere B-Zellzahl (ohne Ficoll CD19+)	mittlere klonale B-Zellzahl (nach Ficoll + zusätzl. Marker)
>20%	11	6,8% (1-20%)	4,9% (0-18,4%)
10-19%	12	4,9% (1-16%)	2,4% (0-11,3%)
<10%	10	2,1% (1-5%)	0,2% (0-0,7%)
<b>keine Infiltration</b>	<b>54</b>	<b>2,2% (0-7%)</b>	<b>-</b>

## 5 Diskussion

### 5.1 Einleitung

Die Standarduntersuchung zum Nachweis einer Knochenmarkinfiltration des folliculären Lymphoms ist zur Zeit die Knochenmarkbiopsie, welche eine adequate morphologische Beurteilung des knöchernen Gewebes garantiert. Doch kann auch mit der Histologie nicht immer eine eindeutige Aussage über eine Lymphominfiltration des Markraums getroffen werden. Unterschiedliche Ansichten bestehen u.a. in der bioptischen Probengewinnung. Einige Autoren sehen eine Überlegenheit der bilateralen KM-Biopsie gegenüber der unilateralen bezüglich des Nachweises einer Infiltration (Brunning RD, Bloomfield CD et al. 1975; Coller BS, Chabner BA et al. 1977; Haddy TB, Parker RI et al. 1989; Juneja SK, Wolf MM et al. 1990; Luoni M, Declich P et al. 1995; Barekman CL, Fair KP et al. 1997). Zudem divergieren die Meinungen über eine adequate Länge der Stanzprobe (Bishop PW, McNally K et al. 1992; Islam A 1997; Bain BJ 2001) um fokale Lymphominfiltrate bioptisch zu erfassen. Allerdings konnte mit Etablierung immunhistologischer Untersuchungen die Aussagekraft der Stanzbiopsie erhöht werden (Thaler J, Dietze O et al. 1991).

Eine andere Möglichkeit des Nachweises der Lymphominfiltration im Knochenmark sind nicht-invasive bildgebende Verfahren. Der Vorteil dieser Verfahren in der Lymphomdiagnostik liegt im Auffinden lymphoider Zellpopulationen fernab der Punktionsstelle, allerdings ist der Nachweis einer spezifischen Lymphomentität im Knochenmark nicht möglich. Aufgrund zu hoher Kosten und eingeschränkter Verfügbarkeit finden diese Verfahren bislang keine Anwendung in der Routinediagnostik des Knochenmarks.

Auch haben sich in den letzten Jahren zahlreiche Anwendungen der Durchflußzytometrie durchgesetzt, da die Immunphänotypisierung im Rahmen der Differentialdiagnose hämatologischer Erkrankungen eine immer größere Bedeutung einnimmt. Mit ihrer Hilfe ist es möglich eine Vielzahl an Oberflächen- und intrazellulären Antigenen von Zellsuspensionen hämatologischer Neoplasien näher zu analysieren (Groenevelden K, te Marvelde JG et al. 1996). Vorteile bestehen in einer raschen Analyse einer Vielzahl von Einzelzellen (bis zu 10000 Zellen in wenigen Sekunden) bei gleichzeitiger Erfassung der Zellgröße, Granularität sowie mehrerer Fluoreszenzsignale und der statistischen Auswertbarkeit gewonnener Daten zu einem späteren Zeitpunkt. Die genannten Vorzüge führten bislang zu ihrem überwiegenden Einsatz in der Immundiagnostik akuter und chronischer Leukämien (General Haematology

Task Force of BCSH 1994; Bene MC, Castoldi G et al. 1995; Di Giuseppe JA and Borowitz MJ 1998).

Darüberhinaus werden durchflußzytometrische Analysen immer häufiger zur Erfassung und Typisierung maligner Non-Hodgkin-Lymphome im Knochenmark durchgeführt, welche auf der Bestimmung der Linienzugehörigkeit und des Reifegrades der Lymphomzellen sowie dem Nachweis einer Leichtkettenrestriktion bei B-Zell-Noeplasien oder aberranter Antigenmuster bei T-Zell-Lymphomen basiert (Rothe G and Schmitz G 1996). Speziell in der Diagnostik von Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zelllinie nutzt die Durchflußzytometrie den Verlust bzw. das Auftreten von Differenzierungsantigenen während des B-Zell-Reifungsprozesses zur Abgrenzung der einzelnen Lymphomentitäten.

Ihre wesentlichen Nachteile liegen in der fehlenden Möglichkeit, die Knochenmarkarchitektur und das Wachstums- bzw. Infiltrationsmuster der verschiedenen NHL-Subtypen darzustellen. Diese Aspekte werden häufig als mögliche Ursachen für die diagnostische Diskordanz durchflußzytometrischer und morphologischer Untersuchungen angeführt. Insbesondere folliculäre Lymphome infiltrieren das Knochenmark überwiegend mit einem fokal paratrabekulären Wachstumsmuster (Brunner RD, Bloomfield CD et al. 1975; Juneja SK, Wolf MM et al. 1990; Duggan PR, Easton D et al. 2000). Die neoplastischen Infiltrate breiten sich in direktem Kontakt mit dem Knochen entlang der trabekulären Strukturen aus und neigen zur starken Fibrosierung, was den aspiratorischen Nachweis neoplastischer Zellen erschwert. Ein Anteil an durchflußzytometrisch nicht erfasster Lymphominfiltrate bei morphologisch positivem Befund ist für diesen NHL-Subtyp in der Literatur bekannt (vgl. **Abschnitt 5.3**, S. 51 ff).

Zur Zeit werden Untersuchungen hinsichtlich der diagnostischen Aussagekraft durchflußzytometrischer Analysen im Vergleich zur morphologischen Beurteilung der Beckenkammbiopsie kontrovers diskutiert (Dunphy CH 1996; Tabakhi A, Edinger M et al. 1996; Naughton MJ, Hess JI et al. 1998; Auer I and Luidner J 1999; Hanson CA, Kurtin PJ et al. 1999; Duggan PR, Easton D et al. 2000; Siebert JD, Weeks LM et al. 2000; Palacio C, Acebedo G et al. 2001; Stacchini A, Demurtas A et al. 2003).

Die vorliegende Arbeit vergleicht im Rahmen der Staginguntersuchung die diagnostische Wertigkeit der Durchflußzytometrie mit der herkömmlichen Knochenmarkbiopsie bezüglich des Nachweises einer Infiltration durch das folliculäre Lymphom.

## 5.2 Durchgeführte Studie

Unsere Studie führten wir ausschließlich an Patienten mit diagnostisch gesichertem Befund eines follikulären Lymphoms durch. Hierfür wurden 139 Knochenmarkbiopsien und Knochenmarkaspirate von 91 Patienten untersucht.

Das Knochenmark zeigte in 84 der Fälle (60,4%) keinen und 55 der Fälle (39,6%) einen Lymphombefall. In unseren Untersuchungen wurden die Knochenmarkbiopsien als positiv beurteilt, bei denen ein eindeutiges Infiltrationsmuster vermerkt werden konnte. Morphologisch nicht eindeutige Studienfälle wurden erneut histologisch evaluiert und zusätzlich immunhistologisch untersucht.

Sämtliche Knochenmarkaspirate wurden zunächst mittels der Dichtegradientenzentrifugationsmethode aufbereitet und immunphänotypisch mit einem Screening bzw. Standard-Panel einschließlich der Leichtkettenrestriktion analysiert und diejenigen als positiv bewertet, bei denen das Verhältnis der Immunglobulin-Leichtketten  $\kappa/\lambda$  zu gunsten von  $\kappa >3$ , bzw. jede  $\lambda/\kappa$  Ratio  $>1$  betrug. Ferner wurden die Proben als durchflußzytometrisch suspekt eingeschätzt, bei denen die neoplastischen Zellen eine schwache CD19-Positivität und das Oberflächenantigen CD10 aufwiesen. Die durchflußzytometrisch untersuchten Aspirate zeigten in 93 der Fälle (67%) ein negatives und in 46 der Fälle ein positives (33%) Ergebnis bezüglich einer Lymphominfiltration

Die Resultate der Morphologie und Durchflußzytometrie stimmten in 86% der Fälle (120 von 139) überein: in 29,5% (41 von 139) konnte sowohl histologisch als auch durchflußzytometrisch eine Knochenmarkinfiltration bestätigt und in 56,9% (79 von 139) nicht bestätigt werden.

Insgesamt fanden sich 19 diskordante Studienfälle (14%). In 5 Fällen (3,5%) bestätigte der morphologische Befund nicht den durchflußzytometrischen Nachweis einer Lymphominfiltration. In weiteren 14 Fällen (10%) konnte ein morphologisch positiver Befall durchflußzytometrisch nicht diagnostiziert werden, obwohl sämtliche gewonnenen Beckenkammbiopsien als repräsentativ bewertet wurden.

Die vorgelegte Studie kommt zu dem Schluß, dass die histologische Untersuchung der Knochenmarkbiopsie nach wie vor die Standarduntersuchung beim Staging follikulärer Lymphome ist.

### 5.3 Vorliegende Literatur

Bislang beschäftigen sich nur einzelne Studien mit der simultanen Anwendung von Durchflußzytometrie und Knochenmarkbiopsie in der Ausbreitungsdiagnostik maligner Non-Hodgkin-Lymphome. Die wichtigsten Arbeiten zu dieser Thematik seien infolge aufgeführt.

So untersuchten Stacchini et al. (Stacchini A, Demurtas A et al. 2003) 210 Knochenmarkbiopsien bzw. Knochenmarkaspirate von Patienten mit B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen bzw. B-Zell lymphoproliferativen Erkrankungen histologisch und durchflußzytometrisch auf eine Lymphominfiltration. Die Einteilung der Studienfälle erfolgte nach ihrem morphologischen Befund in drei Gruppen: positiver und negativer oder morphologisch nicht eindeutiger Befund eines Befalls. Das Knochenmark zeigte in 104 der Fälle keinen und in 102 der Fälle eine Beteiligung des Markorgans. Bei suspekten Befunden wurden zusätzlich immunhistologische Untersuchungen durchgeführt. Allgemein wurden Proben als morphologisch positiv bewertet, wenn ein eindeutiges Infiltrationsmusters vermerkt werden konnte. Im Durchschnitt lag das KM-Infiltrationsvolumen in diesen Fällen bei 30% (3% bis 90%).

Bei allen aspirierten Knochenmarkproben kam die Dreifarbindurchflußzytometrie mit direkt-konjugierten Antikörpern zum Einsatz. Zur immunphänotypischen Analyse der Proben wurde zunächst ein Screening-Panel und dann ein Standardpanel verwendet. Sie wurden als positiv bewertet, wenn eine klonale Leichtkettenrestriktion vorlag, bzw. das Verhältnis der Immunglobulin-Leichtketten  $\kappa/\lambda < 0,5:1$  oder  $> 3:1$  betrug. Zudem wurden Proben mit einer bimodalen Leichtkettenexpression als positiv eingestuft. Bei 128 der Studienfälle lag ein negatives durchflußzytometrisches Ergebnis bezüglich einer Lymphominfiltration vor, bei 82 der Fälle ein positives.

In 83% waren die Ergebnisse der Morphologie und Durchflußzytometrie identisch. In 25 der Fälle konnte ein morphologisch positiver Befall durchflußzytometrisch nicht bestätigt werden. Diese Patienten waren mehrheitlich an einem follikulärem Lymphom oder diffus großzelligem Lymphom erkrankt. Die meisten Fälle zeigten ein paratrabekuläres Infiltrationsmuster oder nodulär lymphoide Aggregate, die 1% bis 40% des Markraums einnahmen. In weiteren 5 Fällen konnte der durchflußzytometrische Nachweis einer KM-Infiltration knochenmarksbiopsisch nicht bestätigt werden, wobei die Fälle unterschiedliche Entitäten präsentierten. Die durchflußzytometrisch detektierte klonale B-Zell-Population bewegte sich in den 5 Fällen zwischen 0,5% und 3,3%. In 4 der morphologisch suspekten Befunde ergab die Durchflußzytometrie ein negatives Ergebnis.

Stacchini et al. sind der Meinung, dass weder mit der morphologischen Beurteilung noch mit der durchflußzytometrischen Analyse allein eine Knochenmarkinfiltration durch ein B-Zell-Lymphom adequat diagnostiziert werden kann. Die Methoden sollten ergänzend eingesetzt werden. Nur mit der Durchflußzytometrie ist es nicht möglich den Nachweis fokal paratrabekulär infiltrierender B-NHL zu führen. Allerdings schätzen sie diese Methode als hoch sensitiv bezüglich der Fragestellung nach einer minimalen Lymphominfiltration von < 5% durch kleinzellige klonale B-NHL ein.

Duggan et al. (Duggan PR, Easton D et al. 2000) untersuchten 227 Knochenmarkproben von Patienten mit B-Zell- und T-Zell-NHL. Aus der Studie ausgeschlossen wurden Patienten mit Haarzell-Leukämie, CLL und Prolymphozytischer Leukämie. Die bioptisch gewonnenen Knochenmarkproben wurden eindeutig als negativ eingeschätzt, wenn morphologisch keine Lymphominfiltration vorhanden war und zudem das Trepanat mindestens 1 cm subkortikales Gewebe enthielt. Immunhistologische Untersuchungen der Präparate wurden nicht beschrieben. Die Gruppierung der 227 Studienfälle erfolgte nach der Morphologie in die Kategorien - Nachweis einer Infiltration im Knochenmark durch ein Lymphom bzw. kein Nachweis eines Befalls sowie morphologisch keine Diagnose möglich. Eine fehlende Beteiligung des Knochenmarks konnte bioptisch in 162 der Fälle gesichert werden, in 65 der Fälle war der Befund ein positiver.

Sämtliche Knochenmarkaspirate wurden mit der Dreifarben- und Vierfarbendurchflußzytometrie analysiert. Für eine exakte Immunphänotypisierung kam ein großes Panel an monoklonalen Antikörpern gegen T-Zell- und B-Zell-Antigene zum Einsatz inklusive einer Analyse der Leichtkettenrestriktion. Als positiv wurden Knochenmarkaspirate bewertet, bei denen eine Leichtkettenrestriktion und/oder eine abweichende Expression von B-Zell-Markern vorlag und die neoplastische Zellpopulation >5% aller kernhaltigen Zellen in der Probe betrug; bei einem Anteil <5% wurde die Probe als minimale Infiltration klassifiziert. In 75,4% der Fälle konnte ein morphologisch nachgewiesener Lymphombefall durchflußzytometrisch bestätigt werden. Zudem detektierte die Durchflußzytometrie in 27 der 162 morphologisch negativen Studienfällen eine Lymphominfiltration (<5%). Die klonale B-Zell-Population lag hier zwischen 1% und 5%. Bei einem Infiltrationsgrad >5% war auch das morphologische Ergebnis ein positives.

In 78% der Fälle stimmten die Ergebnisse der Morphologie und der Durchflußzytometrie überein. Insgesamt fanden sich 49 diskordante Studienfälle, davon konnte in 27 der Fälle der durchflußzytometrische Nachweis einer KM-Infiltration morphologisch nicht bestätigt werden. In 12 der 27 Fälle wurde die Diagnose eines follikulären Lymphoms gestellt. Die

verbliebenen 15 Fälle setzten sich aus diffus-großzelligen Lymphomen, Mantelzell-Lymphomen, monozytoiden B-Zell-Lymphomen/MALT, peripheren T-Zell-Lymphomen und einem nicht weiter spezifiziertem B-Zell-Lymphom zusammen. In weiteren 16 Fällen konnte ein knochenmarksbiotisch positives Ergebnis durchflußzytometrisch nicht bestätigt werden. Diese Patienten waren an follikulärem Lymphom, diffus-großzelligem Lymphom, monozytoidem B-Zell-Lymphom/MALT, peripherem T-Zell-Lymphom, T-Zell reichem B-Zell-Lymphom und small noncleaved Lymphom erkrankt. In 6 morphologisch suspekten Befunden zeigte die Durchflußzytometrie ein negatives Ergebnis.

Die Schlussfolgerung ihrer Studie entspricht der von Stacchini et al. (Stacchini A, Demurtas A et al. 2003). Allerdings sollte ab einer Infiltrationsrate von >5% die morphologische Beurteilung weiterhin als Standarduntersuchung angewendet werden.

Eine weitere Arbeit (Dunphy CH 1996) untersuchte 188 Knochenmarkstanzen- und Aspiate von Patienten mit einem B-Zell-NHL bzw. CLL. In 97 der Fälle war das Knochenmark durch ein Lymphom befallen und 83 der Fälle lymphomfrei. In 8 Fällen lag ein morphologisch suspekt positiver Befund vor. Die Schnittpräparate wurden mit Hämatoxylin-Eosin und Giemsa gefärbt, immunhistologische Untersuchungen werden vom Autor nicht näher beschrieben.

Mit einem großen Panel von monoklonalen Antikörpern einschließlich der Leichtkettenrestriktion wurden die Aspiate untersucht. Eine Knochenmarkinfiltration wurde dann angenommen, wenn das Verhältnis  $\kappa/\lambda > 3:1$  bzw.  $< 1:2$  vorlag. Anmerkungen zu immunophänotypischen Kriterien wurden nicht angeführt. In 84 der Studienfälle präsentierte die Durchflußzytometrie ein positives Ergebnis bezüglich einer Lymphominfiltration. Morphologische und durchflußzytometrische Ergebnisse stimmten in 81,4% der Fälle überein. In der Beurteilung des Infiltrationsvolumens stufte die Histologie das Ausmaß in 27 der 75 morphologisch und durchflußzytometrisch positiven Fälle höher ein als die Durchflußzytometrie, wobei es sich überwiegend um follikuläre Lymphome handelte. Hingegen stufte die Durchflußzytometrie in nur weiteren 4 Fällen den Infiltrationsgrad höher ein als die Morphologie, wobei sich überwiegend CLL/SLL präsentierten.

Eine diagnostische Diskordanz der Methoden zeigte sich in 27 aller Studienfälle. Von diesen konnte in 22 Fällen ein morphologisch verifizierter Lymphombefall durchflußzytometrisch nicht bestätigt werden. Davon zeigten 16 Fälle ein paratrabekuläres Wachstumsmuster, von denen 12 follikuläre Lymphome waren. In 5 der 27 Fälle wies die Durchflußzytometrie eine Knochenmarkinfiltration nach, die morphologisch nicht bestätigt werden konnte. Die detektierten klonalen B-Zell-Populationen lagen hier zwischen 2% und 5%.

Der Autor kommt zu der Überzeugung, daß die Durchflußzytometrie bei einer Infiltration von <5% aussagekräftig ist. Dagegen wies er eine höhere Sensitivität der morphologischen Untersuchung bei Lymphomen mit paratrabekulären Wachstumsmuster nach, das bei folliculären Lymphomen oder Mantelzell-Lymphomen häufig zu beobachten ist.

Palacio et al. (Palacio C, Acebedo G et al. 2001) untersuchten zu dieser Thematik 79 Knochenmarkbiopsien bzw. Knochenmarkaspirate von Patienten mit folliculärem Lymphom und diffus großzelligem Lymphom. Die unilateral entnommenen Trepanate maßen eine mittlere Länge von 1,5 cm (0,2 cm bis 4 cm). In 52 der Fälle ergab die Histologie keinen, in 16 der Fälle einen Lymphombefall und in 11 Fällen einen morphologisch nicht eindeutigen. Alle Biopsate wurden mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung sowie immunhistologisch mit Antikörpern gegen CD3, CD45, CD20, Bcl-2, CD10 und beide Immunglobulin-Leichtketten untersucht.

Bei Anwendung eines breiten Panels von monoklonalen Antikörpern einschließlich der Leichtkettenrestriktion wurden die Knochenmarkaspirate mittels der Dreifarbandurchflußzytometrie immunphänotypisch analysiert. Die durchflußzytometrisch untersuchten Aspirate zeigten in 51 der Fälle ein negatives und in 28 der Fälle ein positives Ergebnis bezüglich einer Lymphominfiltration. Als positiv wurden die Proben eingeschätzt, bei denen die getateten B-Zellen eine  $\kappa/\lambda$  Leichtkettenrestriktion aufzeigten bzw. das Verhältnis der Immunglobulin-Leichtketten  $\kappa/\lambda >3:1$  oder  $>1:1$  betrug oder eine fehlende Expression von Oberflächenimmunglobulin auf reifen B-Zellen vorlag. Durchflußzytometrische und morphologische Befunde zeigten in 82,3% der Fälle konkordante Ergebnisse. Nur in 3 der Studienfälle konnte der durchflußzytometrische Nachweis einer KM-Infiltration morphologisch nicht bestätigt werden. Alle 3 diskordanten Fälle zeigten in der Polymerasekettenreaktion (PCR) ein klonales Gen-Rearrangement. Auffälligerweisen gab es keinen morphologisch positiven Fall, der durchflußzytometrisch nicht bestätigt werden konnte. Patienten, bei denen nicht eindeutig eine Beteiligung des Markorgans vorlag, waren überwiegend an folliculärem Lymphom erkrankt. In 82% dieser Fälle konnte mit Hilfe der Durchflußzytometrie und PCR das Lymphom verifiziert werden. Abzüglich der morphologisch suspekten Befunde bestätigte die Durchflußzytometrie in 100% einen knochenmarksbiopsisch verifizierten Lymphombefall.

In der Studie kamen Palacio et al. zu der Auffassung, dass die Durchflußzytometrie eine schnelle und leicht durchzuführende Methode zur Beurteilung einer Knochenmarkinfiltration darstellt. Ferner ist die Durchflußzytometrie ebenso aussagekräftig oder vielleicht sensitiver als die morphologische Beurteilung bezüglich des Nachweises einer Beteiligung des Markorgans

durch ein follikuläres Lymphom oder diffus großzelliges Lymphom. Die durchflußzytometrische Analyse sollte bei bioptisch unklarem Befund oder unzulänglicher Knochenmarkbiopsie angewendet werden.

In der 1998 publizierten Arbeit von Naughton et al. (Naughton MJ, Hess JI et al. 1998) wurde eine Serie von 273 Knochenmarkproben mit hoch- und niedrigmalignen Lymphomen sowie B- und T-Zell-Lymphomen auf eine Infiltration untersucht. Patienten mit Hodgkin-Lymphom und Plasmozytom sowie 34 CLL-Patienten, die histologisch und durchflußzytometrisch ein positives Ergebnis aufwiesen, wurden von der Studie ausgeschlossen. Entsprechend der histologischen Befunde wurden die Proben den drei Kategorien – vorhandene bzw. fehlende Infiltration des Knochenmarks sowie knochenmarksbioptisch suspekten Befunde – zugeordnet. In 162 der Fälle erfolgte eine bilaterale Entnahme der Knochenproben und in 111 der Fälle eine unilaterale. Morphologisch konnte in 188 der Fälle kein und in 62 der Fälle ein Lymphombefall im Markraum verifiziert werden. In den histologisch positiven Fällen lag das mittlere Infiltrationsvolumen bei 20% (<5 bis 80%). 23 der 273 Fälle zeigten einen morphologisch suspekten Befund, von denen die Durchflußzytometrie lediglich 2 Fälle als positiv bewertete.

Die Aufbereitung der durch Aspiration gewonnenen Knochenmarkproben erfolgte mittels der Dichtegradientenzentrifugationsmethode mit Ficoll-hypaque. Die anschließende Immunphänotypisierung wurde mit einem Standardpanel von 14 monoklonalen Antikörpern einschließlich der Leichtenkettenrestriktion durchgeführt. Bei 81 Proben wurde die Einfarben- und bei 192 die Zweifarbandurchflußzytometrie eingesetzt. Die Probenansätze der Patienten mit B-Zell-Lymphomen wurden als positiv (Nachweis eines NHL) eingeschätzt, wenn mehr als 50% der gateden B-Zellen einen Mangel an CD19 oder CD20 aufwiesen bzw. wenn das Verhältnis der Immunglobulin-Leichtketten von  $\kappa/\lambda \geq 6:1$  oder  $\lambda/\kappa \geq 2:1$  betrug. In 232 der Fälle konnten die Durchflußzytometrie keinen Nachweis einer Lymphominfiltration erbringen, in 40 der Fälle war das Ergebnis positiv.

Eine Konkordanz beider Methoden zeigte sich auf 82% der Fälle, d.h. in 37 von 273 Fällen wurde sowohl histologisch als auch durchflußzytometrisch eine Knochenmarkinfiltration ermittelt und in 187 von 273 blieb der Nachweis aus. Abzüglich der morphologisch suspekten Befunde bestätigte die Durchflußzytometrie in 60% ein morphologisch positives Ergebnis. Insgesamt fanden sich 26 diskordante Fälle in denen entweder die Histologie oder die Durchflußzytometrie falsch-negative Ergebnisse erzielten. In 25 der Fälle konnte die Durchflußzytometrie einen knochenmarksbioptisch positiven Befund nicht bestätigen,

hingegen wies sie nur in drei morphologisch negativen Studienfällen eine Beteiligung des Markorgans nach.

In ihrer Studie kamen sie zu dem Schluß, dass durchflußzytometrische Untersuchungen nur eine geringe Bedeutung beim Nachweis einer KM-Infiltration durch Lymphomzellen haben. Auch der Wechsel zur Zweifarbandurchflußzytometrie führte zu keiner signifikant höheren Sensitivität.

Hanson et al. (Hanson CA, Kurtin PJ et al. 1999) analysierte 175 Knochenmarkproben von Patienten mit hoch- und niedrigmalignen Lymphomen. Aus der Studie herausgenommen wurden Patienten mit M. Waldenström, Haarzell-Leukämie und CLL. Bei allen Patienten wurde der Beckenkamm bilateral biopsiert und die Trepanate zusätzlich immunhistologisch mit Antikörpern gegen CD3 und CD20 untersucht. Das Mark zeigte in 116 der Fälle keine und in 59 der Fälle einen Befall.

Die durchflußzytometrischen Untersuchungen basierten auf dem Nachweis der Expression von CD19 und der Leichtkettenrestriktion. In einigen Fällen erfolgte eine präzisere Immunphänotypisierung mit weiteren monoklonalen Antikörpern, die von den Autoren jedoch nicht näher erläutert werden. Hanson et al. definierte ein Verhältnis der Leichtketten  $\kappa/\lambda > 3:1$  bzw.  $\lambda/\kappa > 2:1$  als klonale B-Zell-Proliferation. Bei allen Proben kam die Zweifarben- und Dreifarbandurchflußzytometrie zum Einsatz. In 121 der Fälle beinhalteten die Aspirate keine Lymphomzellen und in 54 der Fälle war der Nachweis positiv. Bei 37 der positiven Fälle lag die detektierte klonale B-Zell-Population bei <5% des gesamten aspirierten Probenmaterials und bei 14 weiteren Proben bei <1%.

Die Ergebnisse der Morphologie und der Durchflußzytometrie stimmten in 91,4% der Fälle überein. In 5 der 175 Fälle verfehlten die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen den durchflußzytometrischen Nachweis einer KM-Infiltration. Diese Patienten waren alle an großzelligen Lymphomen erkrankt. Die entsprechenden bilateral gewonnenen Trepanate maßen eine Länge von 2 cm bis 6,5 cm, wobei die detektierten klonalen B-Zell-Populationen bei 1% bis 10% lagen. In weiteren 10 diskordanten Fällen ergab die Durchflußzytometrie ein falsch-negatives Ergebnis. Davon war die eine Hälfte der Patienten an follikulären Lymphomen und die andere an großzelligen Lymphomen mit minimaler Infiltration erkrankt. Das Ausmaß der Infiltration im Markraum differierte stark in diesen Fällen.

Hanson et al. sind der Meinung, dass die Immunphänotypisierung von Knochenmarkproben bei der Frage nach einer Infiltration kaum zusätzliche Informationen liefern kann und deshalb nur angewendet werden sollte, wenn die Biopsie einen unklaren Befund präsentiert.

Zusammenfassend sind die genannten Autoren ganz überwiegend der Auffassung, daß eine routinemäßige Anwendung durchflußzytometrischer Analysen zum Nachweis einer Knochenmarksinfiltration in der Staginguntersuchung maligner Non-Hodgkin-Lymphome von geringer Bedeutung ist.

**Tabelle V.1:** Zusammenfassung veröffentlichter Daten zur Thematik: Knochenmarksinfiltration beim Follikulären Lymphom: Vergleich von Histologie und Durchflußzytometrie

<b>Autor<sup>1*</sup></b>	<b>FL Fälle</b>	<b>KM+/FC+</b>	<b>KM+/FC-</b>	<b>KM-/FC+</b>	<b>% KM falsch-negativ</b>	<b>% FC falsch-negativ</b>
<b>Naughton</b>	69	11	8	0	0 (0 von 19)	42 (8 von 19)
<b>Dunphy</b>	55	13	12	2	7 (2 von 27)	44 (12 von 27)
<b>Stacchini</b>	70	9	13	1	4 (1 von 23)	56 (13 von 23)
<b>Perea<sup>2*</sup></b>	176	43	26	12	15 (12 von 81)	32 (26 von 81)
<b>Hanson</b>	58	25	5	0	0 (0 von 30)	17 (5 von 30)
<b>Schmidt</b>	139	41	14	5	8 (5 von 60)	23 (14 von 60)
	<b>567</b>	<b>142</b>	<b>78</b>	<b>20</b>	<b>8 (20 von 240)</b>	<b>33 (78 von 240)</b>

Anmerkung:

<sup>1\*</sup>: tabellarisch nicht aufgeführt sind die Ergebnisse von Palacio et al. und Duggan et al.. Beide Autoren ließen bei ihren Ergebnissen die verschiedenen Lymphomentitäten unberücksichtigt. Dennoch kommen sie zu dem Ergebnis, dass die Durchflußzytometrie sensitiver ist als die Morphologie bezüglich des Nachweises einer KM-Infiltration durch ein follikuläres Lymphom.

<sup>2\*</sup>: Perea G, Altes A, Bellido M, et al.: Clinical utility of bone marrow flow cytometry in B-cell non-Hodgkin lymphomas (B-NHL). Histopathology 2004, 45:268-74

Legende: FL: Follikuläres Lymphom; KM: Knochenmark; FC: Durchflußzytometrie.

## 5.4 Kritische Wertung

### 5.4.1 Datenkonstanz

Nach Darstellung der vorliegenden Literatur zur simultanen Anwendung von Durchflußzytometrie und Beckenkammbiopsie wird deutlich, dass unsere Resultate im Wesentlichen mit denen oben genannter Studien übereinstimmen. Auffallend ist, dass trotz methodischer und klinischer Unterschiede zwischen den einzelnen Studien die Ergebnisse mehrheitlich zu einer Konstanz konkordanter und diskordanter Daten führen. So wird in den Arbeiten von Stacchini et al. (Stacchini A, Demurtas A et al. 2003) und Hanson et al. (Hanson CA, Kurtin PJ et al. 1999) die diagnostische Konkordanz beider Methoden mit 83,8% bzw. 91,4% angegeben. In anderen Publikationen finden sich hierzu ähnliche Ergebnisse (Naughton MJ, Hess JI et al. 1998; Palacio C, Acebedo G et al. 2001). In unseren Untersuchungen erzielten die morphologischen Untersuchungen und durchflußzytometrischen Analysen in 86% der Fälle einen identischen diagnostischen Befund. Somit stimmen unsere Ergebnissen mit denen der zuvor genannten Autoren überein (siehe **Tab. IV.1**; S. 38).

Eine Datenkonstanz besteht auch hinsichtlich diskordanter Studienfälle. Dieser Anteil beläuft sich in den Studien von Stacchini et al. (Stacchini A, Demurtas A et al. 2003) und Duggan et al. auf 14,3% bzw. 22%. Auch die anderen publizierten Arbeiten präsentieren nahezu identische Ergebnisse (Dunphy CH 1996; Naughton MJ, Hess JI et al. 1998). In unserer Studie beträgt der Anteil diskordanter Befunde 13,7% (siehe **Tab. IV.1**; S. 38).

### 5.4.2 Patientenkollektiv

Die meisten publizierten Studien zur simultanen Anwendung von Durchflußzytometrie und Beckenkammbiopsie beschäftigen sich allgemein mit Lymphomen im Stanzmaterial (Dunphy CH 1996; Naughton MJ, Hess JI et al. 1998; Hanson CA, Kurtin PJ et al. 1999; Duggan PR, Easton D et al. 2000; Stacchini A, Demurtas A et al. 2003). Eine Ausnahme bildet die 2001 veröffentlichte Arbeit von Palacio et al. (Palacio C, Acebedo G et al. 2001), in der ausschließlich Knochenmarkproben von Patienten mit follikulärem Lymphom und diffus-großzelligem Lymphom histologisch und durchflußzytometrisch untersucht wurden.

Für unsere Analysen erschien die follikuläre Lymphomentität das klinisch wichtigste Problem zu sein, da sich die Patienten häufig bei der Erstdiagnose in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien mit z.T. ausgedehnter Knochenmarkinfiltration präsentieren. Darüberhinaus sind follikuläre Lymphome mit 70% die häufigste Entität in der Gruppe der

niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphome (Glass AG, Karnell LH et al. 1997). Wir entschlossen uns daher, diese Entität gesondert zu betrachten.

### 5.4.3 Mögliche Fehlerquellen für diskordant-positive Fälle

Das Spektrum möglicher Fehlerquellen in den genannten Publikationen ist breit gefächert. Von den einzelnen Autoren werden unterschiedliche Aspekte für den Anteil falsch-negativer durchflußzytometrischer Befunde verantwortlich gemacht

- Modifikation der durchflußzytometrischen Methode (Probenaufbereitung mittels der Dichtegradienten-Zentrifugationsmethode vs. Erythrozytenlyse-Methode) (Naughton MJ, Hess JI et al. 1998)
- notwendige Durchführung von Mehrparametermessungen gegenüber den Einzelfarbmessungen (Palacio C, Acebedo G et al. 2001)
- Unterschiede in der bioptischen und aspiratorischen Probengewinnung (Stacchini A, Demurtas A et al. 2003)
- unterschiedliche Beurteilung des Infiltrationsvolumens (Dunphy CH 1996)
- falsche „Gating“-Strategien

Als Ursache für die Diskrepanzen in unseren Untersuchungen dürften im Wesentlichen anschließend aufgeführte Gesichtspunkte eine Rolle gespielt haben:

#### ***Kontamination der Probenansätze mit zirkulierenden Blutzellen***

Man kann davon ausgehen, dass unter Aspiration zirkulierende Blutzellen dem Probenmaterial beigemischt werden, die ursächlich zu falsch-niedrigen Werten in den einzelnen Lymphozytensubpopulationen führen. Gerät die Anzahl neoplastischer Zellen unter den festgelegten Grenzwert, können diese dem durchflußzytometrischen Nachweis entgehen (Duggan PR, Easton D et al. 2000). Um eine Kontamination unserer Probenansätze mit hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen, untersuchten wir daher alle Primäraspirate mit einem Screening-Panel u.a. auf ihren T-Zellanteil als Indikator. Im peripheren Blut liegt der T-Zell Anteil normalerweise zwischen 20% und 30%. Enthielten die aspirierten Knochenmarkproben einen T-Zell Anteil  $\geq 20\%$  wurden diese als nicht repräsentativ bewertet.

In den oben genannten Studien lassen sich mehrheitlich keine detaillierten Anmerkungen über die Durchführung eines Screenings finden (vgl. **Abschnitt 5.3**, S. 51 ff). Lediglich ein Autor (Stacchini A, Demurtas A et al. 2003) beschreibt ausdrücklich die Verwendung eines Screening-Panels in seinen durchflußzytometrischen Untersuchungen.

### ***Modifikation der durchflußzytometrischen Methode***

Ebenso stellte sich die Frage, ob eine Modifikation der Methodik für das ungünstige Abschneiden der Durchflußzytometrie in unseren Untersuchungen verantwortlich gemacht werden konnte. Zunächst wurden die im Primärmaterial vorhandenen Erythrozyten mittels der Peli Lyse (Hiss) eliminiert und anschließend die mononukleären Zellen durch Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten aus den Proben isoliert. In einigen unserer Fälle kann es unter Anwendung der Lysing-Solution und mehrfachen Zentrifugationen mit nachgeschalteten Waschschritten zu einem größeren Verlust verschiedener B-Zellpopulationen gekommen sein, was zu einer Unterschätzung durchflußzytometrisch positiver Fälle geführt hat (Fruttero A, Giroto M et al. 1992; Stelzer GT, Marti G et al. 1997). Lediglich die Arbeit von Naughton et al. (Naughton MJ, Hess JI et al. 1998) führte in ihren Untersuchungen diese spezielle Anreicherungsmethode durch. In den anderen oben genannten Studien wurden die Probenansätze überwiegend mit der Erythrozytenlyse-Methode aufbereitet (Hanson CA, Kurtin PJ et al. 1999; Duggan PR, Easton D et al. 2000). Im Gegensatz zum Ficollgradienten findet bei dieser Methode keine Anreicherung von Zellpopulationen statt. Die Erythrozyten werden direkt aus der mit den entsprechenden Antikörpern versetzten Vollblutprobe lysiert und anschließend eliminiert. Hierbei sind die Zentrifugationsschritte weitestgehend reduziert, was vermehrten Zellverlusten entgegenwirkt. Allerdings verdeutlichen die nahezu identischen Resultate, dass eine Modifikation der Methodik (die Anwendung der Dichtegradienten-Zentrifugation statt der Erythrozyten-Lysemethode) für das ungünstige Abschneiden der Durchflußzytometrie nicht verantwortlich gemacht werden darf.

### ***Unterschiede in der bioptischen und aspiratorischen Probengewinnung***

Ein Erklärungsansatz für die diskrepanten Befunde ergibt sich möglicherweise aus der unterschiedlichen Technik der Probenentnahme. So wird der Beckenkamm für die morphologische Knochenmarksdiagnostik gewöhnlich bilateral biopsiert, hingegen das Knochenmark für die immunphänotypische Analyse vorwiegend unilateral aspiriert. Es ist vorstellbar, dass insbesondere fokale Läsionen im Knochenmark häufiger dem durchflußzytometrischen Nachweis entgehen als diffus infiltrierende Prozesse. In diesem Zusammenhang beschreiben mehrere Autoren eine deutliche Überlegenheit der bilateralen Knochenmarkbiopsie gegenüber der unilateralen in dem Nachweis einer Knochenmarkinfiltration (Brunner RD, Bloomfield CD et al. 1975; Coller BS, Chabner BA et al. 1977; Haddy TB, Parker RI et al. 1989; Juneja SK, Wolf MM et al. 1990; Luoni M, Declich P et al. 1995; Berekman CL, Fair KP et al. 1997; Cheson BD, Horning SJ et al.

1999). Beispielsweise untersuchte eine Arbeit insgesamt 273 NHL-Patienten, von denen 111 unilateral und 162 bilateral biopsiert wurden. In 30% der Fälle war jeweils nur eine Knochenmarkstanze vom Lymphom befallen (Naughton MJ, Hess JI et al. 1998). Diese Ergebnisse unterstützen eine Reihe von Autoren, für die eine routinemäßige bilaterale Entnahme der Proben als sinnvoll erscheint (Brunning RD, Bloomfield CD et al. 1975; Collier BS, Chabner BA et al. 1977; Haddy TB, Parker RI et al. 1989; Juneja SK, Wolf MM et al. 1990; Luoni M, Declich P et al. 1995; Berekman CL, Fair KP et al. 1997).

Die vorliegende Arbeit ließ im Gegensatz zu anderen Autoren (Hanson CA, Kurtin PJ et al. 1999; Palacio C, Acebedo G et al. 2001; Stacchini A, Demurtas A et al. 2003) die Entnahmetechnik der Knochenmarkproben unberücksichtigt, sodaß eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse ungeklärt bleibt.

### ***Unterschiede bei der Beurteilung des Infiltrationsvolumens im Knochenmark***

Unterschiede zwischen beiden Methoden zeigten sich auch bei der Beurteilung des Infiltrationsvolumens im Knochenmark. Allgemein wird das Ausmaß des KM-Befalls morphologisch tendenziell höher eingestuft als durchflußzytometrisch erfassbar. Eine Arbeit (Dunphy CH 1996) untersuchte hierzu insgesamt 75 morphologisch und durchflußzytometrisch positive Befunde, von denen in 27 der Fälle (36%) das Infiltrationsvolumen morphologisch höher eingestuft wurde als durchflußzytometrisch. Der überwiegende Anteil dieser Fälle waren folliculäre Lymphome. In nur 4 der Fälle (5%) schätzte die Durchflußzytometrie den Infiltrationsgrad höher, wobei Fälle mit CLL/SLL dominierten. In unserer Arbeit verglichen wir den ermittelten Anteil CD19 positiver B-Zellen im Aspirat mit dem immunhistologisch gefärbten Anteil CD20 positiver B-Lymphozyten in der Biopsie. Die Daten veranschaulichen, dass der Anteil CD19 positiver Zellen in sämtlichen Fällen unter dem der CD20 positiven lag (siehe **Tabelle IV.4**; S. 47). Wir befinden uns damit in Übereinstimmung mit den Ergebnisse des genannten Autors.

In diesem Zusammenhang belegen vorhergehende Studien die begrenzte Rolle durchflußzytometrischer Analysen in der Knochenmarkdiagnostik folliculärer Lymphome (Collier BS, Chabner BA et al. 1977; Juneja SK, Wolf MM et al. 1990; Salisbury JR, Deverell MH et al. 1997). Die ungleichmäßige Verteilung der Infiltrate mit paratrabekulärem Infiltrationsmuster sind für diese Entität gut belegt (Collier BS, Chabner BA et al. 1977). Möglicherweise werden kleine bioptisch verifizierbare paratrabekuläre Infiltrate aus dicht gelagerten Lymphomzellen mit intrafokaler Fibrose während der Aspiration nicht suffizient aufgebrochen. Durch ihr Verbleiben im Knochenmark entgehen sie dem aspiratorischem

Nachweis. Ein derartiges Phänomen wird in der aktuellen Literatur häufig als Ursache für durchflußzytometrisch nicht erfasste, aber morphologisch verifizierte Lymphominfiltrate angeführt (Dunphy CH 1996; Hanson CA, Kurtin PJ et al. 1999; Duggan PR, Easton D et al. 2000; Stacchini A, Demurtas A et al. 2003). Allerdings verglich bislang keine der publizierten Studien den Anteil durchflußzytometrisch falsch-negativer Befunde mit dem morphologisch eingestuften KM-Infiltrationsvolumen. Folglich ist die vorliegende Dissertation die erste, die dieses in größerem Umfang unternommen hat. Hierzu wurden alle Studienfälle (n= 55) berücksichtigt, bei denen beide Methoden einen Befall des Markraumes diagnostizierten. Die Ergebnisse veranschaulichen, dass beide untersuchten Parameter miteinander korrelieren, insofern daß mit abnehmendem Infiltrationsvolumen die Anzahl durchflußzytometrisch nicht erfasster Lymphominfiltrate steigt (siehe **Tabelle IV.3**; S. 46).

#### **5.4.4 Mögliche Fehlerquellen für diskordant-negative Fälle**

Darüberhinaus zeigt sich ebenfalls eine Datenkonstanz in dem Anteil morphologisch nicht erfasster durchflußzytometrisch positiver Befunde. Dieser wird in den Studien von Stacchini et al. (Stacchini A, Demurtas A et al. 2003) und Duggan et al. (Duggan PR, Easton D et al. 2000) mit 2,4% bzw. 9,7% angegeben. Nahezu identische Ergebnisse konnten auch mit anderen Arbeiten erzielt werden (Dunphy CH 1996; Naughton MJ, Hess JI et al. 1998; Hanson CA, Kurtin PJ et al. 1999).

Als Ursache für die unterschiedlichen diagnostischen Ergebnisse werden von den oben genannten Autoren aufgeführt

- Unzureichende Probenrepräsentativität der KM-Stanze (Palacio C, Acebedo G et al. 2001)
- Kontamination der Probenansätze mit zirkulierenden Lymphomzellen im peripheren Blut (Hanson CA, Kurtin PJ et al. 1999)
- Morphologisch nicht erfassbare minimale KM-Infiltrationen (Duggan PR, Easton D et al. 2000)

Unsere Untersuchungen ergaben insgesamt 5 diskordant-negative Fälle (5 von 139; 3,5%), womit wir zu ähnlichen Resultaten kamen. Für uns liegen mögliche Gründe für morphologisch nicht erfasste Lymphominfiltrate in einer unzureichenden Stanzprobenlänge und Auslassung immunhistologischer Untersuchungen bei suspekten und minimalen Knochenmarkinfiltraten.

### ***Unzureichende Probenrepräsentativität der gewonnenen KM-Biopsie***

Die Meinungen über eine adequate Länge der Stanzprobe divergieren vor allem, wenn es um den bioptischen Nachweis fokaler Lymphominfiltrate geht. Einige Autoren sind der Auffassung, dass die optimale Probenrepräsentativität nur mit einer definierten Länge gegeben ist (Brynes RK, McKenna RW et al. 1978; Islam A 1997; Bain BJ 2001), im Gegensatz zu anderen, die ein Probenmaß eher beliebig sehen (Bishop PW, McNally K et al. 1992).

Palacio et al. (Palacio C, Acebedo G et al. 2001) kommt in seinen Untersuchungen zu der Überzeugung, dass der Gewinn an morphologisch verifizierten Lymphominfiltraten von der Länge der Stanzprobe abhängt. Die Studie enthielt insgesamt 11 Patienten, die einen morphologisch nicht eindeutigen KM-Befund aufwiesen. Bei 9 der Fälle maß die Knochenmarkstanze eine Länge von <2 cm. Für eine adäquate Stanzenlänge wird eine Mindestlänge von 2 cm empfohlen unabhängig davon, ob der Beckenkamm unilateral oder bilateral biopsiert wurde (Cheson BD, Horning SJ et al. 1999).

In unseren Untersuchungen lag die mittlere Stanzenlänge in den 5 diskordant-negativen Fällen bei 1,3 cm. In 2 der Fälle maß diese eine Länge von  $\leq 1$  cm. Folglich bewerteten wir die Gewebeproben als reduziert repräsentativ. Weiterhin gab es nur einen Fall mit repräsentativer Knochenmarkprobe, in dem morphologisch definitiv keine Lymphominfiltration nachgewiesen werden konnte. Die durchflußzytometrisch detektierte klonale B-Zell-Population, bezogen auf das Lymphozytengate nach Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten, betrug für diesen Fall 1% und war morphologisch nicht erfassbar.

Unserer Auffassung nach spielte die Länge der Knochenmarkstanze eine wesentliche Rolle, da wir beobachten konnten, dass die morphologisch nicht verifizierten Fälle eine zu geringe Probengröße aufwiesen.

### ***Auslassung immunhistologischer Untersuchungen bei suspekten und minimalen Infiltraten***

In der Literatur wird die diagnostische Wertigkeit der Immunhistochemie als zusätzliche Methode bislang kontrovers diskutiert. Einige Autoren sind der Auffassung, daß immunhistologische Färbungen an paraffin-eingebettetem Material in der Beurteilung maligner Lymphome von diagnostischem Nutzen sind (Kubic VL and Brunning RD 1989; van der Valk P, Mullink H et al. 1989; Pileri SA, Roncador G et al. 1997). Nach der publizierten Arbeit von Thaler et al (Thaler J, Dietze O et al. 1991) konnte durch die

Etablierung immunhistochemischer Methoden die Aussagekraft der Stanzbiopsie erhöht werden.

In den unter Abschnitt 5.3 genannten Studien wurden immunhistologische Untersuchungen nur teilweise durchgeführt. Stacchini et al. (Stacchini A, Demurtas A et al. 2003) untersuchten ausschließlich morphologisch suspekta Knochenmarkproben zusätzlich mit Antikörpern gegen CD3, CD5, CD20, CD10, CD79a, anti- $\kappa$ , anti- $\lambda$ , IgA, IgM und IgG. Nach ihren Ergebnissen konnte in 5 Fällen, die alle unterschiedliche Entitäten zeigten, der durchflußzytometrische Nachweis einer Infiltration weder morphologisch noch immunhistologisch bestätigt werden.

Hanson et al. (Hanson CA, Kurtin PJ et al. 1999) analysierten sämtliches Knochenmark-Stanzmaterial (n= 175) immunhistologisch mit Antikörpern gegen CD3 und CD20. Die Ergebnisse der Morphologie und Immunhistochemie stimmten in 97,7% (171 von insgesamt 175 Fällen) überein. Dabei verifizierten immunhistologische Untersuchungen in 48 der 175 Studienfälle lymphoide Infiltrate im Markraum, die allerdings morphologisch keine Eigenschaften eines malignen Lymphoms aufwiesen. Immunhistochemisch zeigten sämtliche Zellpopulationen eine Mischung aus kleinen CD20 positiven B-Zellen und CD3 positiven T-Zellen oder überwiegend T-Zell-Populationen.

In ihren Untersuchungen konnten alle relevanten Fälle mit Beteiligung des Knochenmarks anhand der morphologischen Beurteilung diagnostiziert werden. Hanson et al. stellten fest, daß die Einordnung suspekter lymphoider Infiltrate im Stanzmaterial auch nach Anwendung immunhistologischer Untersuchungen weiterhin Schwierigkeiten bereitete. Sie kamen zu dem Schluß, dass die Immunphänotypisierung mittels immunhistochemischer Färbungen keine kosten-effektive Zusatzuntersuchung in der Ausbreitungsdiagnostik maligner Lymphome darstellt.

Duggan et al. (Duggan PR, Easton D et al. 2000) untersuchte 227 Trepanate mit Hämatoxylin/Eosin, Periodsäure-Schiff und Giemsa. Immunhistologischer Färbungen wurden nicht durchgeführt. Anliegen seiner Studie war es nicht die diagnostische Wertigkeit der Immunhistologie zu evaluieren. Dennoch sind sie der Meinung, dass für eine adequate Bestimmung suspekter lymphoider Läsionen, die nicht eindeutig einer das Knochenmark infiltrierenden Erkrankung zugeordnet werden können, immunhistochemische Färbungen von diagnostischem Nutzen sind. Jedoch ist die Immunphänotypisierung mittels immunhistologischer Untersuchungen neben der Durchflußzytometrie überflüssig und nicht kostengerecht.

In unserer Studie wurden vor der Reevaluierung morphologischer und durchflußzytometrischer Daten alle diskordanten Befunde (n= 30) immunhistologisch mit Antikörpern gegen CD3, CD10 und CD20 untersucht. Nach wiederholter morphologischer Beurteilung und aufgrund zusätzlich durchgeführter immunhistochemischer Färbungen konnten 6 Fälle reklassifiziert.

Ferner ergaben sich nach Reevaluierung insgesamt 14 morphologisch positive/durchflußzytometrisch negative Fälle, von denen 8 Fälle ein Infiltrationsvolumen  $\leq 5\%$  im Mark aufwiesen. Auch bei diesen Fällen konnte die diagnostische Treffsicherheit durch ergänzende immunhistologische Untersuchungen erhöht werden.

Bei den insgesamt 5 diskordant-negativen Studienfällen konnte in 2 Fällen morphologisch jeweils ein kleines Infiltrat diagnostiziert werden ohne eindeutigen Nachweis eines folliculären Lymphoms. Aufgrund der markzentralen Lage und mit Hilfe zusätzlich immunhistologischer Färbungen wurden die Infiltrate als reaktiv gewertet.

Nach unseren Untersuchungen kamen wir zu dem Ergebnis, daß die ergänzende Anwendung immunhistologischer Untersuchungen in der Ausbreitungsdiagnostik folliculärer Lymphome geeignet ist.

## 6 Zusammenfassung

Die routinemäßige Entnahme von Beckenkammbiopsien zur morphologischen Beurteilung des Knochenmarks ist ein wesentlicher Bestandteil der klinischen Diagnostik beim Staging von Patienten mit niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphomen. Nach wie vor stellt sie die Standarduntersuchung dar, mit der die Diagnose eines Knochenmarkbefalls durch Lymphomzellen gesichert werden kann. Vor allem Patienten mit follikulären Lymphomen präsentieren sich bei Erstdiagnose häufig in fortgeschrittenen Krankheitsstadien mit ausgeprägter Infiltration des Knochenmarks, durch welche die Erkrankung immer noch als unheilbar gilt. Gewöhnlich wird zur weiteren Beurteilung der Erkrankung simultan zur Beckenkammbiopsie das Knochenmark aspiriert und immunphänotypisch mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. In diesem Zusammenhang ergibt sich immer wieder ein Anteil durchflußzytometrisch nicht erfasster Lymphominfiltrate bei morphologisch positivem Befund. Als Ursache werden die ungleichmäßige Verteilung der malignen Infiltrate im Markraum mit häufig fokal paratrabekulärem Infiltrationsmuster und intrafokaler Fibrose angeführt, die besonders für das follikuläre Lymphom belegt sind (Hanson CA, Kurtin PJ et al. 1999; Duggan PR, Easton D et al. 2000; Stacchini A, Demurtas A et al. 2003).

Die vorliegende Arbeit verglich die diagnostische Aussagekraft der Durchflußzytometrie mit der herkömmlichen Beckenkammbiopsie in bezug auf den Nachweis eines follikulären Lymphoms. Zur Sicherung der Diagnose erfolgte zu Beginn eine ausführliche Archivsuche, bei der zunächst die Patienten ermittelt wurden, die einen extramedullär lokalisierten Befund zeigten. Für die Untersuchungen wurden nur die Patienten berücksichtigt, bei denen eine Knochenmarkbiopsie durchgeführt worden war. Als positiv wurden die Knochenmarkproben bewertet, wenn ein eindeutiges Infiltrationsmuster vermerkt werden konnte. Insbesondere die morphologisch diskrepanten Studienfälle wurden erneut histologisch evaluiert und zusätzliche immunhistologische Untersuchungen mit Antikörpern gegen CD3, CD10 und CD20 durchgeführt. Ferner wurden die korrespondierenden Knochenmarkaspirate zunächst mittels der Dichtegradientenzentrifugationsmethode mit Ficoll-Paque aufbereitet und in durchflußzytometrischen Untersuchungen immunphänotypisiert sowie einschließlich der Leichtkettenrestriktion analysiert. Bei allen Probenansätzen kam die Zweifarben- und Dreifarbindurchflußzytometrie mit direkt-konjugierten monoklonalen Antikörpern zum Einsatz. Nach Reevaluierung aller durchflußzytometrischen und morphologischen Befunde mit zusätzlicher Immunhistochemie wurden insgesamt 11 Fälle reklassifiziert. Die Befunde der beiden Methoden stimmten in 86% der Fälle überein- in 14% unterschieden sie sich.

Insgesamt zeigte sich in 19 Studienfälle eine diagnostische Diskordanz zwischen beiden Methoden. In 5 Fällen konnte der durchflußzytometrische Nachweis einer Lymphominfiltration im Knochenmark morphologisch nicht bestätigt werden. Die mittlere Trepanatlänge betrug in diesen Fällen 1,3 cm. Aufgrund der geringen Probengröße wurden 3 der 5 Fälle als reduziert repräsentativ eingeschätzt. In zwei weiteren Fällen wurde jeweils ein kleines Infiltrat diagnostiziert, das wegen seiner markzentralen Lage und zusätzlich immunhistologischer Untersuchungen als reaktiv gewertet wurde. Nur in einem der fünf Fälle konnte in einer repräsentative Knochenmarkprobe morphologisch definitiv keine Lymphominfiltration nachgewiesen werden. Die für die 5 Fälle entsprechenden durchflußzytometrisch detektierten klonalen B-Zell-Populationen, bezogen auf das Lymphozytengate nach Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten lagen zwischen 1% und 10%. Die weiteren 14 der insgesamt 19 diskordanten Fälle waren ausschließlich knochenmarksbioptisch positiv, wobei die gewonnenen Beckenkammbiopsien mehrheitlich als repräsentativ bewertet wurden. Bei diesen Fällen betrug das mittlere KM-Infiltrationsvolumen 11% mit vorwiegend peritrabekulärem Infiltrationsmuster und ausgeprägter intrafokaler Fibrose. In weiteren Untersuchungen wurde der Anteil falsch-negativer durchflußzytometrischer Ergebnisse mit dem bioptisch eingeschätzten Infiltrationsvolumen verglichen. Hierzu wurden alle Studienfälle berücksichtigt, die einen Befall des Knochenmarks präsentierten. Die Ergebnisse verdeutlichten, dass beide untersuchten Parameter insofern korrelierten, dass mit abnehmendem Infiltrationsgrad die Anzahl falsch-negativer Befunde zunahm. Zudem differierten beide Methoden in der Beurteilung des Infiltrationsvolumens im Knochenmark. Der ermittelte Anteil CD19 positiver B-Zellen im Aspirat wurde immer unter dem der CD20 positiven B-Lymphozyten im Biopsat angegeben. Letzlich konnte die Durchflußzytometrie nicht zwischen einem minimalen und keinem Lymphombefall im Knochenmark unterscheiden.

Die vorgelegte Studie zeigt, dass die morphologische Methode gegenüber der durchflußzytometrischen Analyse bezüglich des Nachweises einer Knochenmarkinfiltration überlegen ist. Eine ausreichende Trepanatlänge und gegebenenfalls zusätzliche immunhistologische Untersuchungen bei minimalen Infiltraten erhöhen dabei die diagnostische Treffsicherheit. Hingegen ist die Durchflußzytometrie aufgrund falsch-negativer Befunde in der Ausbreitungsdiagnostik follikulärer Lymphome weniger geeignet. Als Ursachen werden die paratrabekuläre Lokalisation der Infiltrate und Fibrosierungsneigung follikulärer Lymphome angeführt, die einer Aspiration neoplastischer Zellen entgegenwirken. Zudem führen spezielle Anreicherungsmethoden wie die Zentrifugation über einen Ficoll-

Gradienten immer zu Zellverlusten. Die histologische Untersuchung der Beckenkammbiopsie ist weiterhin die Standarduntersuchung beim Staging follikulärer Lymphome.

## 7 Anhang

### 7.1 Die Ann-Arbor-Klassifikation

<b>Tabelle VI.1: Die Ann-Arbor-Klassifikation</b>		
<b>Stad.</b>	<b>Primär nodale Manifestation (70%)</b>	<b>Primär extranodale Manifestation (30%)</b>
<b>I</b>	Befall <u>einer</u> Lymphknotenregion oder <u>einer</u> lymphatischen Struktur (z.B. Milz, Thymus)	Befall <u>eines</u> extralymphatischen Organs oder Gewebes
<b>II<sub>1</sub></b>	Befall von benachbarten Lymphknotenregionen auf <u>derselben Seite des Zwerchfells</u> oder einer Lymphknotenregion mit lokalisiertem Übergang auf ein benachbartes Organ oder Gewebe	Befall eines extralymphatischen Organs einschl. der regionalen Lymphknoten oder eines weiteren benachbarten extralymphatischen Organs auf <u>derselben Seite des Zwerchfells</u>
<b>II<sub>2</sub></b>	Befall von zwei nicht benachbarten oder mehr als zwei benachbarten Lymphknotenregionen auf derselben Seite des Zwerchfells einschl. eines lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs oder Gewebes	Befall eines extralymphatischen Organs und Lymphknotenbefall, der über die regionalen Lymphknoten hinausgeht und auch einen weiteren lokalisierten Organbefall einschließen kann
<b>III</b>	Befall von Lymphknoten oder lymphatischen Strukturen auf beiden Seiten des Zwerchfells einschl. eines lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs oder Gewebes oder der Milz oder beides	Befall von extralymphatischen Strukturen und Lymphknoten auf beiden Seiten des Zwerchfells einschließlich eines weiteren lokalisierten extralymphatischen Organs oder Gewebes oder Milz oder beides
<b>IV</b>	Lymphknotenbefall mit diffusem oder dissimiliertem Befall extralymphatischer Organe und Gewebe; <u>jeglicher Befall des Knochenmarks</u> oder Leber	Diffuser oder dissimilierter Organbefall mit oder ohne Lymphknotenbefall; <u>jeglicher Befall des Knochenmarks</u> oder der Leber
<b>Zusätze:</b> A: Ohne Allgemeinsymptome B: Mit Fieber (> 38°C) und/oder Nachtschweiß und/oder Gewichtsverlust (> 10%) in den letzten 6 Monaten		

## 7.2 Immunhistochemisch verwendete Lösungen

### Citratpuffer ( 0,01 M, pH 6,0 ) für die Immunhistochemie

#### *Stammlösung*

##### Stammlösung A

0,1 M Zitronensäure

(19,2g Zitronensäure in 1000 ml Aqua dest. gelöst)

##### Stammlösung B

0,1M Natriumcitrat Dihydrat

(24,4g in 1000 ml Aqua dest. gelöst)

#### *Herstellung der Arbeitslösung für die Mikrowellen-Vorbehandlung von Paraffinschnitten*

Unabhängig von der Anzahl der zu untersuchenden Schnitte wurden immer 1,5 Liter Arbeitslösung für 2 volle Küvetten Objektträger hergestellt:

- 27 ml Stammlösung A und 123 ml Stammlösung B in 1,5 Liter destilliertem Wasser gelöst
- Langsame Zugabe von 1,5 Liter TWEEN 20 (hohe Konsistenz)
- Gründliche Durchmischung des Ansatzes mit dem Magnetrührer

### TBS-Puffer für die Immunhistochemie

Stammlösung 1      250 g NaCl in 3 Liter Aqua dest. lösen

Stammlösung 2      181,71 g Tris in 2400 ml Aqua dest. gelöst, mit HCl auf pH 7,6 eingestellt und auf 3 Liter mit Aqua dest. aufgefüllt

Arbeitslösung      300 ml Stammlösung 1 und 300 ml Stammlösung 2 (= 600 ml) mit destilliertem Wasser auf 3 Liter aufgefüllt

### 7.3 Durchflußzytometrie

#### Material und Geräte für die Durchflußzytometrie

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Quicklyse</b>	Medac
Phosphate-Buffered-Salt-Solution (PBS)	Dulbecco
Bovin Albumin Solution (BSA)	Sigma
Aqua dest.	Delta Pharma
Ficoll-Hypaque	Biochrom AG
Peli Lyse Buffer	Hiss
<b>Geräte</b>	
Lichtmikroskop Leitz	Leica
Vortex Mischer	IKA
Rollmischer	RM5 Assistent
Zentrifuge	Hettich Rotanter/RPC
Computer	PC
Coulter	Beckmann Coulter
FACS-Gerät: Coulter Epics XL	Beckmann Coulter
<b>Verwendete Materialien</b>	
Pipetten verschiedener Größen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen: 0,5-10µl; 10-100µl; 2000µl	Eppendorf, Hamburg
PS-Tubes	Greiner

## 7.4 Verwendete Antikörperkombinationen für die Durchflußzytometrie

**Tabelle .VII 4a:** Verwendete Antikörperkombinationen für das Screening

	PE-Cy5	PE	FITC
<b>Röhrchen 1</b>	45	33	71
<b>Röhrchen 2</b>	19	7	38

Legende: PE-Cy5: Cychrome; PE: Phycoerythrin; FITC: Fluoreszeinisothiocyanat

**Tabelle.VII 4b:** Verwendete Antikörperkombinationen für ficollierte Proben

FITC	PE
IgG1	IgG1
45	14
19	20
8	4
3	7
34	13
kappa	19
lamda	19

Legende: FITC: Fluoreszeinisothiocyanat; PE: Phycoerythrin

**Tabelle VII 4c:** Zusätzlich verwendete Antikörperkombinationen

FITC	PE
IgG1	IgG1
5	19
22	19
23	19
38	19
103	19
10	19
38	138

Legende: FITC: Fluoreszeinisothiocyanat; PE: Phycoerythrin

## 7.5 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Bcl-2 bzw. Bcl-6	“B-cell lymphoma 2- bzw. 6-Protein
CD	cluster of differentiation ( z.B. CD3)
CL-E	Chlorazetat-Esterase
FCC (cleaved/noncleaved)	Follicular Center Cell
HE	Hämatoxylin/Eosin Färbung
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin-Schwere-Ketten-Gen
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PAS	Periodsäure-Schiff Färbung
REAL	Revised European American Lymphoma
SLL	Small Lymphocytic Lymphoma
Tab.	Tabelle
WHO	World Health Organisation

Anmerkung: Hier sind nur Abkürzungen aufgeführt, die im laufenden Text verwendet wurden. Bei allen Tabellen findet sich eine Erläuterung der Abkürzungen in den zugehörigen Legenden.

## 7.6 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

<b>Tabelle</b>	<b>Seite</b>
II.1 virale/bakterielle Infektionen als Kofaktoren und/oder Auslöser an der Entstehung maligner Lymphome	5
II.2 Exposition gegenüber spezifischen Krankheiten und Umweltfaktoren, die ein erhöhtes Lymphomrisiko bedingen	5

II.3	Technische und biologische Störgrößen in der Durchflußzytometrie	20
III.1	Zusammenstellung der verwendeten Antikörper	28
III.2	Arbeitsanleitung für das Screening	35
III.3	Arbeitsanleitung für Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll	36
IV.1	Untersuchungsergebnis Biopsie/Knochenmarkaspirat	38
IV.2a	Klinische Daten der diskordant positiven Studienfälle	40
IV.2b	Klinische Daten der diskordant negativen Studienfälle	40
IV.3	Korrelation der falsch-negativen durchflußzytometrischen Ergebnisse mit dem Infiltrationsausmaß im Knochenmark	46
IV.4	Vergleich CD20+ B-Zellen in der Biopsie mit CD19+ B-Zellen im Aspirat	47
V.1	Zusammenfassung veröffentlichter Daten zur Thematik: KM-Infiltration beim follikulären Lymphom: Vergleich von Histologie und Durchflußzytometrie	57
VIII.1	Ann-Arbor-Klassifikation	69

	<b>Abbildungen</b>	<b>Seite</b>
III.1	Prinzip der LAB/LSAB-Methode	25
III.2	Beispiel „Gating“	31
III.3	Beispiel 4-Quadrantenstatistik	33
IV.1	Follikuläres Lymphom Grad I im Knochenmark (HE; 200fach)	41
IV.2a	Follikuläres Lymphom mit paratrabekulärem Infiltrationsmuster, Knochenmark (HE; 200fach)	42
IV.2b	Follikuläres Lymphom mit zentral/paratrabekulärem Infiltrationsmuster	42
IV.3a	Follikuläres Lymphom mit intrafokaler Fibrose Grad I, Knochenmark (CL-E; 400fach)	42
IV.3b	Follikuläres Lymphom mit intrafokaler Fibrose Grad II, Knochenmark (Gomori; 100fach)	42
IV.4a	paratrabekulär gelegene CD20-positive B-Lymphozyten im Knochenmark (100fach)	43

IV.4b	paratrabekulär gelegene CD3-negative B-Lymphozyten im Knochenmark (100fach)	43
IV.4c	Lymphomzellen mit schwacher CD10 Positivität im Knochenmark (200fach)	44
IV.5	Diskordant-negativer Studienfall mit einem kleinen markzentralen CD20 positiven lymphoiden Infiltrat ohne Nachweis eines Lymphoms (200fach)	44

## 8 Literaturverzeichnis

Anon (1993). "A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project." N Engl J Med **329**: 987-994.

Anon (1997). "A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project." Blood **89**: 3909-3918.

Armitage JO and Dan LL (2001). "Malignancies of lymphoid cells." In "Harrison's Principles of Internal Medicine 15<sup>th</sup> ed., Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Haase SL, Longo DL, Jameson JL (Ed.), McGraw-Hill, New York 2001, 15<sup>th</sup> edition.: 715-727.

Auer I and Luider J (1999). "Bone marrow staging of patients with non-Hodgkin's lymphoma: is flow cytometry a useful test?" Cancer **85**: 240-242.

Bain BJ (2001). "Bone marrow trephine biopsy." J Clin Pathol **54**: 737-742.

Barekman CL, Fair KP, Cotelingam JD (1997). "Comperative utility of diagnostic bone-marrow components: a 10-year study." Am J Hemathol **56**: 37-41.

Bartl R, Hansmann ML, Frisch B (1988). "Comparative histology of malignant lymphomas in lymph node and bone marrow." Br J Haematol: 229-237.

Bene MC, Castoldi G, Knapp W (1995). "Proposal for the immunological classification of acute leukemias. European group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL)." Leuemia **9**: 1783-1786.

Bishop PW, McNally K, Harris M (1992). "Audit of bone marrow trephines." J Clin Pathol **45**: 1005-1008.

Bizard F, Dreyfus B, Guilhot F (1997). "11q13 rearrangement in b-cell chronic lymphocytic leukemia." Leuk Lymphoma **25**: 539-543.

Brill N, Baehr G, Rosenthal N (1925). "Generalized giant lymph follicle hyperplasia of the lymph node and splenn: a hitherto undescribed type." JAMA **84**: 668-671.

Brunning RD, Bloomfield CD, McKenna RW, Peterson L (1975). "Bilateral trephine bone marrow biopsies in lymphoma and other neoplastic diseases." Annals of Internal Medicine **82**: 365-366.

Brynes RK, McKenna RW, Sundbeerg RD (1978). "Bone marrow aspiration and trephine biopsy: an approach to a thorough study." Am J Clin Pathol **70**: 753-759.

Burkitt DP (1969). "Etiology of Burkitt's lymphoma--a alternative hypothesis to a vectored virus." J Natl Cancer Inst. **42**: 19-28.

Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M (1971). "Report of the committee on Hodgkin's disease staging classification." Cancer Research **31**: 1860-1861.

Cartwright R, Brincker H, Carli PM (1999). "The rise in incidence of lymphomas in europe 1985-1992." Eur J Cancer **35(4)**: 627-633.

Castellino RA and Marglin SI (1982). "Imaging of abdominal and pelvic lymph nodes: Lymphography or computed tomography." Invest Radiol **17**: 433-443.

Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, Zhang J, Ye BH, Falini B, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R (1995). "BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells." Blood **86**: 45-53.

Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, Shipp MA, Fischer RI, Connors JM, Lister TA, Vose J, Grillo-Lopez A, Hagenbeek A, Cabanillas F, Klippensten D, Hiddemann W, Castellino RA, Harris NL, Armitage JO, Carter W, Hoppe RT, Canellos GP (1999). "Report of an international workshop to standardize reponse criteria for non-Hodgkin's lymphoma." J Clin Oncol **17**: 1244-1253.

Colan MG, Bast M, Armitage JO (1990). "Bone marrow involvement by non-Hodgkin's lymphoma: the clinical significance of morphologic discordance between the lymph node and bone marrow." J Clin Oncol **8**: 1163-1172.

Coller BS, Chabner BA, Gralnik HR (1977). "Frequencies and pattern of bone marrow involvement in non-Hodgkin lymphomas: observations on the value of bilateral biopsie." American Journal of Hematology **3**: 105-119.

Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA, Saleh M, Gordon L, LoBuglio AF (1999). "Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy." J Clin Oncol(17): 268-276.

De Wolf-Peeters C (1991). "Bone marrow trephine interpretation: diagnostic utility and potential pitfall." Histopathology **18**: 489-493.

Di Giuseppe JA and Borowitz MJ (1998). "Clinical utility of flow cytometry in the chronic lymphoid leukemias." Semin Oncol **25**: 6-10.

Dick F, Bloomfield CD, Brunning RD (1974). "Incidence cytology, and histopathology of non-Hodgkin's lymphomas in the bone marrow." Cancer **33**: 1382-1398.

Dogan A, Bagdi E, Munson P, Isaacson PG (2000). "CD10 and BCL-6 expression in paraffin sections of normal lymphoid tissue and B-cell lymphomas." Am J Surg Pathol **24**: 846-852.

Drexler HG and Minowada J (1998). "History and Classification of Human Leukemia-Lymphoma Cell Lines." Leuk Lymphoma **31**: 305-316.

Duggan PR, Easton D, Luider J, Auer I (2000). "Bone marrow staging of patients with non-Hodgkin lymphoma by flow cytometry." Cancer **88**: 894-899.

Dunphy CH (1996). "Combined cytomorphologic and imunophenotypic approach to evaluation of effusions for lymphomatous involvement." Diagn Cytopathol **15**: 427-430.

Dyer MJS, Hale G, Hayhoe FGJ (1989). "Effects of CAMPATH-1 antibodies in vivo in patients with lymphoid malignancies: Influence of antibody isotype." Blood **73**: 1431-1439.

Fisher DE, Jacobson JO, Ault KA (1989). "Diffuse large cell lymphoma with discordant bone marrow histology: clinical features and biological implications." Cancer **64**: 1879-1887.

Foucar K, McKenna RW, Frizzera G (1982). "Bone marrow and blood involvement by lymphoma in relationship to the Lukes-Collins classification." Cancer **49**: 888-897.

Freedman AS and Nadler LM (1999). "Maligne Erkrankungen lymphatischer Zellen." In: Harrison's Innere Medizin. MCGraw-Hill. 14.Auflage: 833-854.

Fruttero A, Girotto M, Anania A, Ciriello MM (1992). "Selective loss of lymphocyte subpopulation by gradient separation of human lymphocytes." Forum **4**: 5-11.

Gall EA, Morrison HR, Scott AT (1941). "The follicular type of malignant lymphoma: a survey of 63 cases." Ann intern Med **14**: 2073-2090.

Gallo RC and Wong-Staal F (1982). "Retroviruses as etiologic agents of some animal and human leukemias and as tools for elucidating the mechanisms of leukemogenesis." Blood **60**: 545-557.

Gelb AB, Rouse RV, Dorfman RF, Warnke R (1994). "Detection of immunophenotypic abnormalities in paraffin-embedded B-lineage non-Hodgkin's lymphomas." Am J Clin Pathol **102**: 825-834.

General Haematology Task Force of BCSH (1994). "Immunphenotyping in the diagnosis of chronic lymphoproliferative disorders." J Clin Pathol **47**: 871-875.

Gerard-Marchant R, Hamlin I, Lennert (1974). "Classification of non-Hodgkin's lymphomas." Lancet **2**: 406-408.

Glass AG, Karnell LH, Menck HR (1997). "The national Cancer Data Base report on non-Hodgkin's lymphoma." Cancer **80**: 2311-2320.

Gospodarowicz MK, Bush RS, Brown TC (1984). "Prognostic factors in nodular lymphomas: A multivariate analysis based on the Princess Margaret Experience." Int J Radiat Oncol Biol Phys. **10**: 489-497.

Groeneveld K, te Marvelde JG, van den Beemd MW, Hooijkeas H, van Dongen JJ (1996). "Flow cytometric detection of intracellular antigens for immunophenotyping of normal and malignant leukocytes." Leukemia **10**: 1383-1389.

Günther C, Helbig W, Püschel W, Hofmann FA (1982). "Zum Stellenwert der Beckenkambbiopsie bei der Diagnostik maligner Lymphominfiltrate im Knochenmark." Zeitschrift für die Gesamte Innere Medizin und ihre Grenzgebiete **37**: 445-453.

Haddy TB, Parker RI, Magrath IT (1989). "Bone marrow involvement in young patients with Non-Hodgkin's lymphoma: the importance of multiple bone marrow samples for accurate staging." Medical and Pediatric Oncology **17**: 418-423.

Hanson CA, Kurtin PJ, Katzmann JA, Hoyer JD, Li CY, Hodnefield JM, Meyers CH,

Habermann TM, Witzig TE (1999). "Immunphenotypic analysis of peripheral blood and bone marrow in the staging of B-cell malignant lymphoma." Blood **94**: 3889-3896.

Harris N and Data R (1982). "The distribution of neoplastic and normal B-lymphoid cells in nodular lymphomas: use of an immunoperoxidase technique on frozen sections." Hum Pathol **13**: 610-617.

Harris NL and Ferry JA (2001). "Follicular Lymphoma." Knowles DM. Neoplastic Hematopathology. Baltimore: Williams and Wilkins **chapter 24**: 831.

Harris NL, Jaffe E, Diebold J (2000). "Lymphoma classification- from controversy to consensus: the R.E.A.L. and WHO classification of lymphoid neoplasms." Ann Oncol **11 (Suppl 1)**: 3-10.

Harris NL, Jaffe ES, Stein H (1994). "A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group." Blood **84**: 13621-1392.

Hodges GF, Lenhardt TM, Cotelingam JD (1994). "Bone marrow involvement in large-cell lymphoma: prognostic implications of discordant disease." Am J Clin Pathol **101**: 305-311.

Horning SJ and Rosenberg SA (1984). "The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's lymphomas." N Engl J Med **311**: 1471-1475.

Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, Coldman AJ, Adomat SA (1995). "Comparison of cytogenetic analysis, southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14;18) in follicular lymphoma." Am J Clin Pathol **103**: 472-478.

Hsu FJ, Caspar CB, Czerwinski D, Kwak LW, Liles TM, Syrengelas A, Taidi Laskowski B, Levy R (1997). "Tumor-specific idiotyp vaccines treatment of patients with B-cell lymphoma-long-term results of a clinical trial." Blood **89**: 3129-3135.

Islam A (1997). "Manual of bone marrow examination." Amsterdam: Overseas Publishers Association.

Jaffe E, Shevach E, Frank M (1974). "Nodular lymphoma: evidence for origin from follicular B lymphocytes." N Engl J Med **290**: 813-819.

Jones SE, Rosenberg SA, Kaplan HS (1972). "Non-Hodgkin's lymphomas: I. Bone marrow involvement." Cancer **29**: 954-960.

Juneja SK, Wolf MM, Cooper IA (1990). "Value of bilateral bone marrow biopsy specimens in non-Hodgkin' lymphoma." J Clin Pathol **43**: 630-632.

Kaufmann O, Flath B, Spath-Schwalbe E, Possinger K, Dietel M (1999). "Immunohistochemical detection of CD10 with monoclonal antibody 56C6 on paraffin sections." Am J Clin Pathol **111**: 117-122.

Kemona A, Dzieciol J, Sulik M (1989). "Lymphocytic aggregations in the bone marrow: their occurrence and morphologic analysis." Patol Pol **40**: 219-225.

- Kluin Pm, van Kierken JH, Kleiverda K (1990). "Discordant morphologic characteristics of B-cell lymphomas in bone marrow and lymph node biopsies." **94**: 59-66.
- Korsmeyer Sj (1992). "Bcl-2 initiales a new category of oncogenes: regulators of cell death." Blood **80**: 879-886.
- Korsmeyer Sj (1999). "BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death." Cancer Res **59**: 1693s-1700s.
- Kreft A, Busche G, Bernhards J, Georgii A (1997). "Immunophenotype of hairy-cell leukaemia after cold polymerization of methyl-methacrylate embeddings from 50 diagnostic bone marrow biopsies." Histopathology **30**: 145-151.
- Kremer M, Cabras AD, Fend F, Schulz S, Schwarz K, Hoefler H, Werner M (2000). "PCR analysis of IgH-gene rearrangement in small lymphoid infiltrates microdissected from section of paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens." Hum Pathol **31**: 847-853.
- Kroft SH and McKenna RW (2001). "Bone marrow manifestations of Hodgkin's and Non-Hodgkin's lymphomas and lymphoma-like disorders." Knowles DM. Neoplastic Hematopathology. Baltimore: Williams and Wilkins: 1447-1495.
- Kubic VL and Brunning RD (1989). "Immunohistochemical evaluation of neoplasms in bone marrow biopsies using monoclonal antibodies reactive in paraffin-embedded tissue." Mod Pathol **2**: 618.
- Lai R, Arber DA, Chang KL, Wilson CS, Weiss LM (1998). "Frequency of bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphoma: a study of 778 cases with comparison of marginal." Mod Pathol **11**: 864-869.
- Lawrence TS, Urba WJ, Steinberg SM (1988). "Retrospective analysis of stage I and II indolent lymphomas at the national Cancer Institute." Int J Radiat Oncol Biol Phys. **14**: 417-424.
- Lennert K (1969). "Germinal centers and germinal center neoplasia." Acta Haematol Jpn **32**: 495-500.
- Lennert K, Mohri N, Stein H (1975). "The histopathology of malignant lymphoma." Br J Haematol **31 (Suppl)**: 193-203.
- Liao KT (1971). "The superiority of histologic sections of aspirated bone marrow in malignant lymphomas." Cancer **27**: 618-628.
- Limpens J, de Jong D, van Krieken JH, Price CG, Young RC, van Ommen GJ, Kluin PM (1991). "Bcl-2/JH rearrangement in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia." Oncogene **6**: 2271-2276.
- Limpens J, Stad R, Vos C (1995). "Lymphoma-associated translocation t(14;18) in blood B cells of normal individuals." Blood **85**: 2528-2536.
- Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, Rosenberg SA, Coltman CA, Tubiana M (1989). "Report of committee convened to discuss the evaluation

and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswold Meeting." Journal of Clinical Oncology **7**: 1630-1636.

Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnell TI (1999). "Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma." Blood **93**: 3081-3087.

Lui PI, Takanari H, Yatani R (1989). "Comparative studies of bone marrow from the United States and Japan." Ann Clin Lab Sci **19**: 345-351.

Lukes RJ and Collins R (1974). "Immunologic characterization of human malignant lymphomas." Cancer **34**: 1488-1503.

Luoni M, Declich P, De paoli AP (1995). "Bone marrow biopsy for the staging of non-Hodgkin's lymphoma: bilateral or unilateral trephine biopsy?" Tumori **81**: 410-413.

Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, Bodkin D, Schilder RJ, Neidhart JA, Janakiraman N, Foon KA, Liles Tina-Marie, Dallaire BK, Wey K, Royston I, Davis T, Levy R (1997). "IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-cd20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade Non-Hodgkin's Lymphoma." Blood **90**: 2188-2195.

Mann RB and Berard CW (1983). "Criteria for the cytologic subclassification of follicular lymphoma: a proposed alternative method." Hematol Oncol **1**: 187-192.

McKenna RW (1992). "The bone marrow manifestations of Hodgkin's disease, the non-Hodgkin lymphomas, and lymphoma-like disorders." Knowles DM. Neoplastic Hematopathology. Baltimore: Williams and Wilkins: 1135-1180.

Mead GM, Hyun BH, Rebeck JW (1977). "Lymphoid follicles in bone marrow aspirates." Am J Clin Pathol **67**: 41-48.

Meeker T, Lowder J, Maloney DG (1985). "A clinical trial of anti-idiotypic therapy for B cell malignancy." Blood **65**: 1349-1363.

Metter GR, Nathwani BN, Burke JS, Winberg CD, Mann RB, Barcos M, Kjeldsberg CR, Whitecomb CC, Dixon DO, Miller TP (1985). "Morphological subclassification of follicular lymphoma: variability of diagnoses among hematopathologists, a collaborative study between the Repository Center and Pathology Panel for Lymphoma Clinical Studies." J Clin Oncol **3**: 25-38.

Monfardini S, Banfi A, Bonadonna G (1980). "Improved five year survival after combined radiotherapy-chemotherapy for stage I-II non-Hodgkin's lymphoma." Int J Radiat Oncol Biol Phys. **6**: 125-134.

Morra E, Lazzarino M, Castello A (1989). "Bone marrow and blood involvement by non-Hodgkin's lymphoma: A study of clinicopathologic correlations and prognostic significance in relationship to the Working Formulation." Eur J Haematol. **42**: 445-453.

Mueller N (1999). "Overview of the epidemiology of malignancy in immune deficiency." J Acquir Immune Defic Syndr. **21 (suppl 1)**: 5-10.

Nah EH, King DE, Craig FE (1997). "CD4 and CD8 Antigen Coexpression." Arch Pathol Lab Med **121**: 381-384.

Nathwani BN, Metter GR, Miller TP, Burke JS, Mann RB, Barcos M, Kjeldsberg CR, Dixon DO, Windberg CD, Whitecomb CC (1986). "What should be the morphologic criteria for the subdivision of follicular lymphomas." Blood **68**: 837-845.

Naughton MJ, Hess JL, Zutter MM, Bartlett NL (1998). "Bone marrow staging in Patients with non-Hodgkin's lymphoma: is flow cytometry a useful test?" Cancer **82**: 1154-1159.

Neubauer A and Hermann R (1989). "(Treatment of low malignancy non-Hodgkin lymphomas with recombinant interferon. Current status.)" Med Klin **84**: 355-358.

Ohno H and Fukuhara S (1997). "Significance of rearrangement of the BCL6 gene in B-cell lymphoid neoplasms." Leuk Lymphoma **27**: 53-63.

Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rudiger T, Wilhelm M, Kalla J, Muller JG, Ott MM, Muller-Hermelink HK (2002). "Cytomorphologic, immunohistochemical and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3." Blood **99**: 3806-3812.

Palacio C, Acebedo G, Navarrete M, Ruiz-Marcellan C, Sanchez C, Blanco A, Lopez A (2001). "Flow cytometry in the bone marrow evaluation of follicular and diffus large B-cell lymphomas." Hematologica **86**.

Panayiotidis P and Kotsi P (1999). "Genetics of small lymphocyt disorders." Semin Hematol. **36**: 171-177.

Pezzella F, Munson PJ, Moiller KD, Goldstone AH, Gatter KC (2000). "The diagnosis of low-grade peripheral B-cell neoplasms in bone marrow trephines." Br J Haematol **108**: 369-376.

Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Sabattini E, Briskomatis A, Santini D, Leone O, Piccaluga PP, Falini B (1997). "Immunohistochemistry of bone marrow biopsy." Leuk Lymphoma **26 (suppl 1)**: 69.

Pittaluga S, Ayoubi TA, Wlodarska I, Stul M, Cassiman JJ, Mecucci C, Van den BH, Van DE Ven WJ, Wolf-Peeters C (1996). "BCL-6 expression in reactive lymphoid tissue and in B-cell non-Hodgkin's lymphomas." J Pathol **179**: 145-150.

Press OW, Appelbaum F, Ledbetter JA (1987). "Monoclonal antibody 1F5 (anti-CD20) serotherapy of human B cell lymphomas." Blood **69**: 584-591.

Rankin EM, Hekman A, Smers R (1985). "Treatment of tow patients with B cell lymphoma with monoclonal ant-idiotyp antibodies." Blood **65**: 1373-1381.

Rappaport H (1956). "Tumors of the hematopoietic system. In Atlas of tumor pathology." Armed Forces Institute of Pathology **1, Section III**.

- Richards MA, Gregory Wm, Hall PA (1989). "Management of localized non-Hodgkin's lymphoma: The experience at St. Bartholomew's Hospital 1972-1985." Hematol Oncol **7**: 1-18.
- Rosenberg SA (1977). "Validity of the Ann Arbor staging classification for the non-Hodgkin's lymphomas." Cancer Traet Rep **31**: 1860-1861.
- Rothe G and Schmitz G (1996). "Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies." Leukemia **10**: 877-895.
- Rywlin A (1976). "Histopathology of the bone marrow." Boston: Little, Brown.: 110-113.
- Rywlin AM and D. C. Ortega RS (1974). "Lymphoid nodules of bone marrow: normal and abnormal." Blood **43**: 389-400.
- Salisbury JR, Deverell MH, Seaton JM (1997). "Three-dimensional reconstruction of non-Hodgkin's lymphoma in bone marrow trephines." J Pathol **181**: 451-454.
- Scheinberg SA, Straus DJ, Yeh SD (1990). "A phase I toxicity, pharmacology, and dosimetry trial of monoclonal antibody OKB7 in patients with non-Hodgkin's lymphoma: Effects of tumor burden and antigen expression." J Clin Oncol **8**: 792-803.
- Schmid C, Pan L, Diss T, Isaacson PG (1991). "Expression of B-cell antigens by Hodgkin's and Reed-Sternberg cells." Am J Pathol **139**: 701-707.
- Shipp Ma (1997). "Can we improve upon the International Index." Ann Oncol. **8 Suppl 1**: 43-7.
- Siebert JD, Weeks LM, List LW, Kugler JW, Knost JA, Fishkin PA, Georgen MH (2000). "Utility of flow cytometry immunophenotyping for the diagnosis and classification of lymphoma in community hospital clinical needle aspiration/biopsies." Arch Pathol Lab Med **124**: 1792-1799.
- Stacchini A, Demurtas A, Godio L, Martini G, Antinoro V, Palestro G (2003). "Flow cytometry in the bone marrow staging of nature B-cell neoplasms." Cytometry **54B**: 10-18.
- Stansfeld A, Diebold J, Kapanci Y, Kelenyi G, Lennert K, Mioduszewska O, Noel H, Rilke F, Sundstrom C, van Unnik J, Wright D (1988). "Kiel Classification." Lancet **1**: 292-293.
- Stein H, Gerdes J, Mason D (1982). "The normal and the malignant germinal centre." Clin Haematol **11**: 531-559.
- Stein RS, Ultmann JE, Byrne GE Jr (1976). "Bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphoma: implications for staging and therapy." Cancer **37**: 629-636.
- Stelzer GT, Marti G, Hurly A, Mc Coy P, Lovett Ej, Schwartz A (1997). "U.S.-Canadian consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematologic neoplasia by flow cytometry: standardization and validation of laboratory procedures." Cytometry **30**: 216-230.

- Sun T (2002). "Factors influencing flow cytometry graphs." Flow cytometric analysis of hematologic neoplasms; Lippincott Williams&Wilkins.: 11-27.
- Swerdlow SH (1999). "Small B-cell lymphomas of the lymph nodes and spleen: practical insights to diagnosis and pathogenesis." Mod Pathol **12**: 125-140.
- Swerdlow SH, Angermeier PA, Hartman AL (1988). "Intrathymic ontogeny of the cell receptor associated CD3 (T3) antigen." Lab Invest. **58**: 421-427.
- Symmers D (1927). "Follicular lymphadenopathy with splenomegaly: a newly recognized disease of the lymphatic system." Arch Pathol **3**: 816-820.
- Tabakhi A, Edinger M, Myles J, Pohlman B, Tubbs RR (1996). "Flow cytometric immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphomas and related disorders." Cytometry **25**: 113-124.
- Tavani A, La Vecchia C, Franceschi S (2000). "Medical history and risk of Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas." Eur J Cancer Prev. **9(1)**: 59-64.
- Thaler J, Dietze O, Denz H, Demuth R, Nachbaur D, Stauder R, Huber H (1991). "Bone marrow diagnosis in lymphoproliferative disorders: comparison of results obtained from conventional histomorphology and immunohistology." Histopathology **18**: 495-504.
- The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project (1982). "National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage." Cancer **49**: 2112-2135.
- Thiele J (1995). "Die Differentialdiagnose lymphoider Zellinfiltrate im Knochenmark." Pathologie **1995** **16**: 106-119.
- Thiele J, Zirbes TK, Kvasnicka HM, Fischer R (1999). "Focal lymphoid aggregates (nodules) in bone marrow biopsies differentiation between benign hyperplasia and malignant lymphoma-- a practical guideline." J Clin Pathol **52**: 294-300.
- van der Valk P, Mullink H, Huijgens PC, Tadema TM, Vos W, Meijer CJ (1989). "Immunohistochemistry in bone marrow diagnosis: Value of a panel of monoclonal antibodies on routinely processed bone marrow biopsies." Am J Surg Pathol **13**: 97.
- Wang T, Lasota J, Hanau CA, Miettinen M (1995). "Bcl-2 oncoprotein is widespread in lymphoid tissue and lymphomas but its differential expression in benign versus malignant follicles and monocytoid B-cell proliferations is of diagnostic value." APMIS **103**: 655-662.
- Weisenburger DD (1994). "Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma: recent findings regarding an emerging epidemic." Ann Oncol (in press) **5 Suppl 1**: 19-24.
- Witzig TE, Vukov AM, Habermann TM, Geyer S, Kurtin PJ, Friedenberg WR, Witte WL, Chalhah HI, Flynn PJ, Fitch TR, Welker DA (2005). "Rituximab therapy for patients with newly diagnosed, advanced-stage, follicular grade I Non-Hodgkin's Lymphoma: a phase II trial in the north central cancer treatment group." J Clin Oncol **23**: 1103-1108.

Wranke R and Levy R (1974). "Follicular Lymphoma: a model of B lymphocyt homing." N Engl J Med **298**: 481.

## 9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München unter Leitung von Prof. Dr. Heinz Höfler angefertigt.

Mein herzlicher Dank gilt besonders

Herrn Prof. Dr. Falko Fend für die Anregung zu dieser Arbeit, seinen steten Rat und förderndes Interesse bei der Durchführung der Erhebungen und Untersuchungen.

Herrn Dr. Marcus Kremer möchte ich danken für die Betreuung des praktischen und theoretischen Teils der Arbeit.

Besonders sei auch Dr. Burkhard Schmidt gedankt, der mir bei der durchflußzytometrischen Methode mit seinem fachlichen Rat und menschlicher Kompetenz tatkräftig zur Seite stand.

Ebenso gilt auch mein Dank der Leiterin des FACS-Labors Frau Scholze für ihre organisatorische Hilfe im Teil der Durchflußzytomtrie.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Mutter Sigrid John und meinem Bruder Michael John für ihre Unterstützung während der Fertigstellung der Arbeit.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

---

Kristina John  
 Geburtsdatum: 18 September 1973  
 Geburtsort: Hamburg  
 Familienstand: ledig  
 Staatsangehörigkeit : deutsch

## Ausbildung

---

1980 – 1993 Grundschole und Gymnasium in Hamburg  
 1993 Abitur  
 1994-1995 Freiwilliges Soziales Jahr, UK - Eppendorf, Hamburg  
 04/95-05/02 Studium der Medizin an der Universität Göttingen  
 09/97 Physikum  
 04/99 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 04/01 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 05/02 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## Praktisches Jahr 2001-2002

---

1. Terial Chirurgie: Hôpital Saint – Eloi Montpellier / Frankreich  
 2. Terial Gynäkologie: Kantonsspital Winterthur / Schweiz  
 3. Terial Innere Medizin: St. Martinikrankenhaus / Duderstadt

## Ärztin im Praktikum

---

08/02 – 07/04 Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen Universität München

## Sonstiges

---

1997/1999 Studentische Assistenz im Institut für Mikroskopische Anatomie der Universität Göttingen  
 1998 – 2001 Studentische Intensivpflegekraft im Ev. Krankenhaus Weende / Göttingen  
 12/01 – 03/02 Lehrtätigkeit an der Pflegeschule St.Martinikrankenhaus / Duderstadt

Kristina John