

Aus dem Institut für Pathologie der Universität Tübingen

Abteilung für Spezielle Histo- und Zytopathologie

Direktor: Professor Dr. E. Kaiserling

Reaktive und neoplastische T-Zellen im menschlichen

Knochenmark:

Immunhistochemische und morphometrische

Untersuchungen mit den monoklonalen Antikörpern gegen

die Antigene CD5 und CD8

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu

Tübingen

vorgelegt von

Cornelia Jüngst

aus Karlsruhe

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Professor Dr. H.-P. Horny
2. Berichterstatter Professor Dr. B. Steinke

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Einleitung</u>	6
<u>2. Material und Methoden</u>	9
2.1. Patienten	10
2.2. Gewebe	10
2.3. Konventionelle Färbungen	10
2.4. Immunhistochemie	11
2.4.1. <u>Verwendete Antikörper</u>	11
2.4.2. <u>Methode</u>	11
2.5. Morphometrische Messung	12
2.6. Statistische Auswertung	13
2.7. Molekularbiologie	13
<u>3. Ergebnisse</u>	14
3.1. Hämatologisch gesunde Kontrollfälle	14
3.1.1. <u>Anamnestische, lichtmikroskopische und molekularbiologische Befunde</u>	14
3.1.2. <u>Morphometrische Messungen</u>	14
3.2. B-NHL	15
3.2.1. <u>Anamnestische, lichtmikroskopische und molekularbiologische Befunde</u>	15
3.2.2. <u>Morphometrische Messungen</u>	15
3.3. T-NHL	16
3.3.1. <u>Anamnestische, lichtmikroskopische und molekularbiologische Befunde</u>	16
3.3.2. <u>Morphometrische Messungen</u>	16

3.4.	LUD_m	17
3.4.1.	<u>Anamnestiche, lichtmikroskopische und molekularbiologische Befunde</u>	17
3.4.2.	<u>Morphometrische Messungen</u>	17
3.5.	LUD_p	18
3.5.1.	<u>Anamnestiche, lichtmikroskopische und molekularbiologische Befunde</u>	18
3.5.2.	<u>Morphometrische Messungen</u>	18
3.6.	Statistisch signifikante Ergebnisse beim Vergleich von LUD_m und LUD_p	19
 <u>4. Diskussion</u>		21
 <u>5. Zusammenfassung</u>		35
 <u>6. Tabellen</u>		49
 <u>7. Abbildungen</u>		46
 <u>8. Literaturverzeichnis</u>		52

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
B-CLL	Chronische lymphatische Leukämie vom B-Zell Typ
B-NHL	Non-Hodgkin Lymphom vom B-Zell Typ
T-NHL	Non-Hodgkin Lymphom vom T-Zell Typ
CD	Cluster of differentiation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
IgH	Schwere Kette des Immunglobulins
KF	Korrekturfaktor
KM	Knochenmark
LUD	Lymphozytosen unklarer Dignität
LUD _m	Monoklonale Lymphozytosen
LUD _p	Polyklonale Lymphozytosen
NASDCE	Naphthol-AS-D-Chloracetatesterase
PAS	Perjod-Schiff-Reagenz
PCR	Polymerase chain reaction
Tab.	Tabelle
TCR γ	γ -Kette des T-Zell-Antigen-Rezeptors
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

1. Einleitung

Das Knochenmark besteht aus einer Vielzahl von Zellen, die teils der Hämopoese, teils dem extravasalen Stroma zugerechnet werden. Lymphozyten stellen einen integralen, wenn auch relativ kleinen Bestandteil der Hämopoese im Knochenmark dar. Sie werden in zwei Linien unterteilt. Die B-Lymphozyten reifen im Knochenmark, besitzen die Fähigkeit zur Produktion von Antikörpern und werden der humoralen Komponente des Immunsystems zugerechnet. T- Lymphozyten werden ebenfalls im Knochenmark gebildet, sind Träger der zellulären spezifischen Immunität und gelangen im Thymus zur vollständigen Reife.

Den Lymphozyten im menschlichen Knochenmark wurde in der Forschung viel Aufmerksamkeit gewidmet. Allerdings finden sich bezüglich des Lymphozytenanteils (bezogen auf die Gesamtzahl kernhaltiger hämatopoetischer Zellen) und bezüglich des Anteils einzelner Lymphozytensubpopulationen stark divergierende Angaben. Sie liegen für den Gesamtanteil der Lymphozyten zwischen ca. 5% (Kröber et al., 1999) und bis zu 25% (Thaler et al., 1989). Eine Hauptursache für diese Unterschiede liegt vermutlich in der Art des verwendeten Materials (Knochenmarksaspirat oder Beckenkammtrepanat). Es ist davon auszugehen, dass eine Beimengung zirkulierender Blutzellen bewirkt, dass im Aspirat bis zu 50% mehr Lymphozyten gezählt werden als im Schnittpräparat des Knochenmarks (Clark et al., 1986). Weiterhin spielt die Aufbereitung der Schnittpräparate eine Rolle. Die technisch aufwendige Methode des "Gefrierschnittes" an unfixiertem Knochenmark liefert in der Regel deutlich höhere Werte als die Messung am routinemäßig aufbereiteten Paraffinschnitt, da viele Antikörper am paraffinbehandelten Gewebe geringere Sensitivität besitzen und die Zellen auch weniger intensiv angefärbt werden (Shin et al., 1992; Brown und Gatter, 1993). Das Verhältnis von T- Zellen zu B-Zellen soll im normalen Knochenmark zwischen 2:1 (Chetty et al., 1995) und 4:1 liegen (Horny et al., 1993).

Fokale lymphoide Infiltrate im Knochenmark sind in der hämatologischen Routinediagnostik ein häufiger Befund und stellen oft eine diagnostische Herausforderung dar. Benigne lymphozytäre Aggregate (Hashimoto, 1957) sollen in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter der Patienten in bis zu 50% aller Trepanate

vorkommen (Jones et al., 1972; Dick et al., 1974; Stein et al., 1976). Sie sind bei bestimmten entzündlich-reaktiven, insbesondere rheumatischen Erkrankungen besonders häufig (Navone, 1985).

Ein betont herdförmiger Befall des Knochenmarks wird jedoch auch bei mehr als 30% aller NHL beobachtet (Conlan et al., 1990). Die Abgrenzung neoplastischer Infiltrate von reaktiven Lymphfollikeln stellt hier das entscheidende diagnostische Problem dar. Das kleinzellige morphologische Muster niedrig-maligner Lymphome, die mehrheitlich zum B-Zell Typ gehören, lässt sich oft nur schwer von reaktiven Infiltraten unterscheiden. B-Zell Lymphome machen mit ca. 80-90% den größten Anteil aller NHL aus (Stansfeld, 1985; Herold, 1999). Die Abgrenzung neoplastischer von reaktiven Infiltraten ist für das Staging sowie zur posttherapeutischen Verlaufskontrolle von entscheidender Bedeutung (Bartl et al., 1987; Conlan et al., 1990).

Um eine Knochenmarksbeteiligung bei niedrig-malignem Lymphom eindeutig von reaktiven lymphoiden Infiltraten unterscheiden zu können, wurde eine Fülle morphologischer Kriterien aufgeführt (Juneja et al., 1990; Kluin et al., 1990; Salisbury et al., 1996; Thiele et al., 1995 und 1999). Es treten jedoch stets dann diagnostische Probleme auf, wenn nur eine geringe Lymphozytenvermehrung oder technische Mängel der Gewebeprobe vorliegen (Kröber et al., 1999). Molekularbiologische Untersuchungen zur Klonalität lymphozytärer Zellproliferate, beispielsweise zu Genumlagerungen der schweren Kette des IgH, der γ -Kette des T-Zell Rezeptors oder des bcl-2 Proteins, haben es in den letzten Jahren ermöglicht, monoklonale neoplastische lymphoide Infiltrate relativ sicher von reaktiven Lymphozytenansammlungen zu unterscheiden (Chetty et al., 1995; Kröber et al., 1999).

Um morphologische Kriterien zur Abgrenzung benigner lymphozytärer Aggregate im KM von fokalen Infiltraten niedrig-maligner NHL zu entwickeln, wurden in der vorliegenden Untersuchung Schnittpräparate des Knochenmarks (normales/reaktives KM sowie KM mit niedrig-maligner Infiltration durch NHL) mit Antikörpern gegen die T-Zell-assoziierten Antigene CD5 und CD8 immunhistochemisch untersucht. Das CD5 Antigen findet sich des weiteren auch auf einer kleinen, IgM Autoantikörper produzierenden Subpopulation von B-Lymphozyten bei B-Zell Lymphomen vom Typ der CLL oder des Mantelzell-Lymphoms (Cossman et al., 1984; Spier et al., 1986). Das

CD8-Antigen findet sich auf definierten Subpopulationen der T-Lymphozyten, zum einen auf Killerzellen, zum anderen auf Suppressorzellen, außerdem wird es auch von Endothelzellen der Milzsinus und Thymozyten exprimiert (Beyers et al., 1992; Ruck et al., 1994). Das CD8-Antigen ist an der Erkennung von MHC-Klasse-I-Molekülen beteiligt.

Die durchgeführten morphometrischen Messungen und statistischen Analysen sollten helfen, die folgenden Fragen zu klären:

1. Welches sind die Normwerte für den Prozentsatz CD5+ und CD8+ Lymphozyten, bezogen auf alle kernhaltigen Zellen im Knochenmark, bei hämatologisch gesunden Kontrollpersonen ?
2. Welche Unterschiede bestehen bezüglich der prozentualen Anteile von CD5+ und CD8+ Lymphozyten im normalen/reaktiven Knochenmark und bei Infiltraten niedrigmaligner NHL der B- und T- Zellreihe? Besonderes Augenmerk soll hierbei auf die Fälle mit nur geringer Lymphozytenvermehrung (< 20% der Gesamtzellzahl) gelegt werden.
3. Welcher Stellenwert ist in diesem Zusammenhang molekularbiologischen Zusatzuntersuchungen zuzuordnen?

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

Über einen Zeitraum von etwa 2,5 Jahren (1996-1998) wurden 86 Beckenkammtrepanate untersucht. Das Geschlechterverhältnis war etwa 1:1 (42 Frauen und 44 Männer).

Das Kollektiv wurde in die folgenden 4 Gruppen eingeteilt (Tab. 1):

1. Eine Gruppe von 9 hämatologisch gesunden Kontrollpersonen, bestehend aus 5 weiblichen und 4 männlichen Patienten. Der Altersmedian betrug 70 Jahre, wobei der jüngste Patient 40 Jahre und der älteste Patient 83 Jahre zählte. Anamnestisch war in keinem dieser Fälle ein NHL bekannt. Die Beckenkammtrepanation wurde hier zum Ausschluss einer Knochenmarkskarzinose durchgeführt.
2. Eine Gruppe von 5 Patienten mit histologisch gesichertem NHL der B-Zellreihe. Nur eine der 5 Personen war weiblich. Der Altersmedian lag bei 59 Jahren, mit einer Streuung zwischen 38 und 73 Jahren. In allen Fällen war auch anamnestisch ein NHL bekannt (1x hochmalignes diffuses großzelliges B-NHL, 1x Burkitt-ähnliches B-NHL, 1x Mantelzell-Lymphom, 2x B-CLL).
3. Eine Gruppe von 5 Patienten mit histologisch gesichertem NHL der T-Zellreihe. Hierunter war ebenfalls nur eine weibliche Patientin. Der Altersmedian betrug 62 Jahre, das minimale bzw. maximale Alter lag bei 22 bzw. 72 Jahren. Ein NHL war in 3 dieser Fälle anamnestisch bekannt (1x ein angioblastisches T-NHL, 1x ein diffuses großzelliges NHL, 1x T-CLL).
4. Die letzte und größte Gruppe bestand aus 67 Personen mit geringer Lymphozytenvermehrung im KM. In diese Gruppe der Lymphozytosen unklarer Dignität (LUD) wurden Fälle eingeordnet, die zumindest ein fokales Infiltrat und/oder einen Flächenanteil der lymphoiden Infiltrate $< 20\%$ aufwiesen. Die 35

Frauen und 32 Männer waren im Mittel 57 Jahre alt, mit dem Minimum bei 25 Jahren und dem Maximum bei 83 Jahren. Bei 38 Patienten (56% der Fälle) war ein NHL anamnestisch bekannt.

Entsprechend der molekularbiologischen Befunde wurde diese Gruppe in zwei Untergruppen eingeteilt: die LUD_p mit polyklonalem Genrearrangement und die LUD_m mit monoklonalem Genrearrangement für IgH bzw. TCR γ .

Die Subtypisierung der Lymphome erfolgte nach der REAL-Klassifikation (Harris et al., 1994).

2.2. Gewebe

Unmittelbar nach der Entnahme wurden alle Beckenkammpreparate in 5%-igem gepuffertem Formalin (pH 7,2) fixiert. Über Nacht erfolgte bei 37°C die schonende Entkalkung in 0,5 molarer EDTA-Lösung, um die Antigenstruktur möglichst optimal zu erhalten (Kaiserling et al., 1988; Horny et al., 1989). Nach Dehydrierung in aufsteigender Alkohol- und Xylolreihe wurde das Gewebe bei 56°C in Paraplast (R) (Monoject, St. Louis, USA) eingebettet. 4 μ m dicke Schnitte der Paraffinblöcke wurden auf beschichtete Objektträger aufgezogen und über Nacht bei 37°C getrocknet.

2.3. Konventionelle Färbungen

In allen Fällen wurden folgende Färbungen durchgeführt:

Hämatoxylin-Eosin (HE), GIEMSA, Perjod-Schiff-Reagenz (PAS) und Naphtol-AS-D-Chloracetatesterase (CAE) nach Leder (1964)

2.4. Immunhistochemie

2.4.1. Verwendete Antikörper

Die immunhistochemische Charakterisierung der Lymphozyten wurde mit monoklonalen Antikörpern gegen die Antigene CD5 bzw. CD8 (Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK) durchgeführt.

2.4.2. Methode

Zur immunhistochemischen Darstellung der Antigene CD5 und CD8 wurde die Avidin-Biotin-Komplex (ABC) Methode nach Hsu et al. (1981) verwendet.

Zur Darstellung von CD5 wurde folgendermaßen verfahren:

Zuerst wurden die Präparate in Xylol entparaffiniert sowie anschließend rehydriert. Im Druckkocher wurde mit 0.1M Natriumcitrat Puffer (ph 6,0) inkubiert und danach in TBS Puffer (ph 7,6) gewaschen. Daraufhin wurde die endogene Peroxidaseaktivität des Gewebes durch eine Inkubation in Wasserstoffperoxid-Methanol Lösung aufgehoben. Nach weiterer Waschung in destilliertem Wasser und TBS Puffer wurden eventuell vorhandene unspezifische Bindungsstellen des Antikörpers mit Normalserum blockiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Auftragung des primären Antikörpers. Gegen diesen ist ein sekundärer Antikörper gerichtet, der an seinem Fc-Anteil biotinyliert ist. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Complex (ABC-Complex), der Peroxidase enthält und mit dem biotinylierten Ende des Sekundärantikörpers reagiert. In 3.3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) wurde im letzten Schritt das Antigen sichtbar gemacht.

Zwischen den einzelnen Reaktionsschritten wurde mehrmals mit TBS Puffer gewaschen. Eine Gegenfärbung mit Hämatoxin wurde vorgenommen. Schlussendlich erfolgte nach der Dehydrierung in aufsteigender Alkohol-Xylol Reihe die Eindeckung in Eukitt (Kindler, Freiburg).

Die Darstellung von CD8 verlief identisch, mit der Ausnahme, dass anstelle von Natriumacetat-Puffer 1mM EDTA Lösung verwendet wurde.

2.5. Morphometrische Messung

Die Auswertung der gefärbten Schnitte wurde mit einem Computer-assistierten Bildanalyse-System (Quantimet 600, Leica, Cambridge, UK) durchgeführt.

In das Mikroskop ist hierbei eine Videokamera integriert, die elektronische Signale erzeugt. Diese sind proportional zu der Helligkeit einzelner Bildpunkte (Pixel). So erzeugt Quantimet 600 ein Bild aus einer definierten Anzahl einzelner Grauwerte. Durch einen Kalibrierungsvorgang werden die auf Pixelbasis durchgeführten Messungen in Messeinheiten umgewandelt.

Als diffuses lymphoides Infiltrat wurden locker über den Markraum verstreute Lymphozyten definiert. Eine herdförmige Infiltration des KM mit > 6 Lymphozyten wurde als fokales Infiltrat definiert. Bei 1.120facher Endvergrößerung (Objektiv $\times 20$, Okular $\times 10$, Bildschirmvergrößerung $\times 5,6$) wurde in 10 gleichmäßig über den Zylinder verteilten Messfeldern mit einer Gesamtmessfläche von $0,9\text{mm}^2$ die Anzahl diffus verteilter CD5+ bzw. CD8+ Lymphozyten gemessen. Im Falle von fokalen Infiltraten wurde die Messung sowohl im Zentrum des fokalen Infiltrates als auch im Randbereich, d.h. in der Grenzzone zum diffusen Infiltrat durchgeführt.

Der prozentuale Anteil der CD5+ bzw. CD8+ Zellen (jeweils bezogen auf 100 kernhaltige Markzellen) wurde für jeden Fall bestimmt und als $Z\%$ festgehalten, wobei hier unterschieden wurde zwischen $Z\%$ im diffusen Bereich ($Z\%_{\text{diff}}$), $Z\%$ im fokalen Infiltrat ($Z\%_{\text{fok}}$) und $Z\%$ in der Grenzzone ($Z\%_{\text{grenz}}$). Aus den Messdaten zu diffusen und fokalen lymphatischen Infiltraten wurde ferner ein repräsentativer Lymphozytenanteil ($Z\%_{\text{repr}}$) berechnet. Darunter versteht man die Summe aus diffusum und fokalem Infiltrat, bezogen auf 100 kernhaltige Markzellen, wobei die Gewichtung des diffusen und fokalen Infiltratanteils an der Gesamtsumme jeweils mit einem Korrekturfaktor (KF) erfolgt. Der KF für das fokale Infiltrat (KF_{fok}) entspricht seinem prozentualen Anteil an der Gesamtfläche; der KF für das diffuse Infiltrat (KF_{diff}) errechnet sich aus: $(100 - \text{KF}_{\text{fok}})$.

Der Flächenanteil des jeweiligen T-Lymphozyteninfiltrates, bezogen auf die Markraumfläche (ohne Knochen, jedoch einschließlich der Fettzellen), wurde im Bereich der diffusen Infiltration prozentual bestimmt und als $F\%_{\text{diff}}$ festgehalten.

Außerdem wurde die Lage, Form und Größe der lymphoiden Infiltrate in diesen Untersuchungen auch lichtmikroskopisch beurteilt.

Entsprechende Untersuchungen wurden im Rahmen synchron erstellter Doktorarbeiten auch zu CD3+ und CD20+ Lymphozyten durchgeführt. Sämtliche diesbezügliche Angaben sowie auch die Angaben von Flächenanteilen der lymphozytären Infiltrate basieren auf den Ergebnissen dieser Arbeiten (Dissertation Dauenhauer, 2001; Dissertation Küßwetter, 2001).

2.6. Statistische Auswertung

Die morphometrischen Daten wurden in allen Fällen als Median sowie als 25. und 75. Perzentile angegeben.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von Statistical Analysis System (SAS) für Windows PC, Version 6.12. Es wurden der Wilcoxon-Rangsummen-Test und der Fishers Exakte Test (2-seitig) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0.05$ festgelegt.

2.7. Molekularbiologie

Die Klonalität der IgH- und TCR γ -Genumlagerungen wurde in allen Fällen mit Hilfe eines standardisierten PCR-gestützten Verfahrens analysiert. Die Sensitivität des Assays betrug 0,5%, d.h., eine Tumorzelle konnte vor dem Hintergrund von 5×10^5 normalen Lymphozyten detektiert werden (Kröber et al., 1999).

3. Ergebnisse

3.1. Hämatologisch gesunde Kontrollfälle

3.1.1. Anamnestische, lichtmikroskopische und molekularbiologische Befunde

Die erste Diagnosegruppe setzte sich aus 9 hämatologisch unauffälligen Kontrollpersonen zusammen, bei denen ein Beckenkammtrepanat zum Ausschluss einer Knochenmarkskarzinose entnommen worden war. Bei keiner dieser Personen war anamnestisch eine hämatologische Erkrankung bekannt. Weder bei konventioneller noch bei immunhistochemischer Färbung wurden lichtmikroskopisch fokale lymphoide Infiltrate nachgewiesen. Die Lymphozyten waren locker über das Präparat verstreut und in konventioneller Färbung (GIEMSA) oft nicht sicher von erythropoetischen Vorstufen abzugrenzen. Molekularbiologisch lag in allen Fällen ein polyklonales Rearrangement für IgH und TCR γ vor.

3.1.2. Morphometrische Messung (Tabelle 3)

Der Prozentsatz locker verstreuter Lymphozyten betrug für CD5+ T-Lymphozyten im Median 2,0 Z%_{diff} (25. Perzentile: 1,5; 75. Perzentile: 2,7) mit Extremwerten zwischen minimal 1,1 und maximal 3,7. Der Medianwert für CD8+ Zellen lag bei 2,1 (25. Perzentile: 1,8; 75. Perzentile: 2,7) mit Extremwerten von minimal 1,0 und maximal 5,1. Der Quotient von CD3/CD5+ Zellen betrug im Median 2,2, in 75% der Fälle war er größer als 1,2. Die Extremwerte lagen zwischen minimal 0,7 und maximal 7,0. Für den Quotienten von CD3/CD8+ Zellen fand sich der Median bei 1,8, hier waren 75% der Werte größer als 1,3. Die Extremwerte betragen minimal 0,7 und maximal 3,6.

Der Median für F%_{diff} lag für CD5+ Zellen bei 0,1 (25. Perzentile: 0,1; 75. Perzentile: 0,4). Als Extremwerte wurden minimal 0,07 und maximal 0,19 gemessen. Ähnliche Werte ergaben sich für CD8+ T-Lymphozyten. Hier fand sich der Median bei 0,15 (25. Perzentile: 0,09; 75. Perzentile: 0,19). Die Werte streuten von minimal 0,05 bis maximal 0,31. Das Verhältnis der Flächenanteile von CD3+/CD5+ Zellen ergab im Mittel 2,69 (25. Perzentile: 2,09; 75. Perzentile: 3,42). Das Minimum lag bei 1,20 und das Maximum bei 6,83. Der Median des Verhältnisses der Flächenanteile von

CD3+/CD8+ Zellen ergab 2,41 (25. Perzentile: 1,55; 75. Perzentile: 4,09). Die Extremwerte waren minimal 0,73 und maximal 6,41.

3.2. B-NHL

3.2.1. Anamnestische, lichtmikroskopische und molekularbiologische Befunde

In der Diagnosegruppe der morphologisch sicher zu diagnostizierenden B-NHL war bei allen 5 Patienten ein NHL anamnestisch bekannt. Dabei wurde das maligne Lymphom in einem Fall als hochmalignes diffuses großzelliges B-NHL eingestuft. Weiterhin lag ein Burkitt-ähnliches B-NHL vor, zwei Fälle einer B-CLL und ein Mantelzell-Lymphom. Das Knochenmark war in allen Fällen von überwiegend kompakten Tumordinfiltraten durchsetzt. In die Studie wurden nur Fälle mit niedrigmaligner Infiltration des Knochenmarks aufgenommen, wobei nur in einem Fall ein diskordantes Grading vorlag. Alle 5 B-NHL wiesen ein monoklonales Genrearrangement des IgH auf.

3.2.2. Morphometrische Befunde (Tabelle 4)

In der Gruppe der B-NHL wurde mit einem Median von 2,9 in $Z\%_{\text{diff}}$ im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Vermehrung des Anteils CD5+ Lymphozyten um ca. 50% beobachtet. Die Anzahl CD8+ Lymphozyten war mit dem Median von 4,6 etwa doppelt so hoch wie im normalen Knochenmark. Im fokalen Infiltrat machten die CD5+ Lymphozyten im Vergleich zum diffusen Infiltrat mit 7,1 $Z\%_{\text{fok}}$ im Median mehr als den doppelten Anteil am gesamten lymphozytären Infiltrat aus. Der Anteil der CD8+ Lymphozyten sank auf 3,3. $Z\%_{\text{repr}}$ entsprach den Werten im diffusen Infiltrat.

Das Verhältnis von CD3+/CD5+ Lymphozyten war gegenüber dem diffusen Infiltrat in $Z\%_{\text{fok}}$ auf 6,3 und damit um das 3fache erhöht. Das Verhältnis von CD3+/CD8+ Lymphozyten stieg sogar um das 15fache auf 13,8 an.

Es ergaben sich in $Z\%_{\text{diff}}$ und $Z\%_{\text{fok}}$ weder für CD5+ noch für CD8+ Lymphozyten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den B-CLL sowie den Mantelzell-Lymphomen und den anderen B-NHL der Fallgruppe. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse für CD20+ Lymphozyten ergab sich in $Z\%_{\text{diff}}$ und $Z\%_{\text{fok}}$ auch für

CD5+/CD20+ Lymphozyten kein signifikanter Unterschied zwischen B-CLL und Mantelzell-Lymphomen im Vergleich zu den anderen B-NHL.

Entsprechend der Vermehrung CD5+ und CD8+ Lymphozyten im diffusen Infiltrat waren die Flächenanteile $F\%_{\text{diff}}$ mit Medianen von 0,22 bzw. 0,26 gegenüber den Kontrollfällen erhöht.

3.3. T-NHL

3.3.1. Anamnestische, lichtmikroskopische und molekularbiologische Befunde

Bei den Patienten mit T-NHL war das maligne Lymphom in 3 von insgesamt 5 Fällen bereits anamnestisch bekannt. In 2 Fällen lag ein hochmalignes Lymphom vor (1x ein angioblastisches T-NHL, 1x ein diffuses großzelliges T-NHL). Weiterhin war eine T-CLL bekannt. In 4 Fällen lag eine diffuse Infiltration des Knochenmarks vor, in nur einem Fall war sie fokal. In 2 Fällen wurden die Knochenmarksinfiltrate als hochmaligne eingestuft, in einem Fall als niedrigmaligne. In 2 Fällen war das Grading unbekannt. Molekularbiologisch wurde bei allen 5 T-NHL ein monoklonales Genrearrangement von TCR γ festgestellt.

3.3.2. Morphometrische Befunde (Tabelle 5)

In der Gruppe der T-NHL entsprach $Z\%_{\text{diff}}$ für CD5+ Lymphozyten mit einem Median von 1,8 etwa den Werten der hämatologisch gesunden Kontrollgruppe. Der Anteil CD8+ Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl hatte sich jedoch etwa verdoppelt, der Median betrug hier 4,1. Es lag nur in einem der 5 Fälle ein fokales Infiltrat vor. In diesem Fall ließ sich jedoch gegenüber dem diffusen Infiltrat eine starke Erhöhung der CD5+ T-Lymphozyten auf 32,4 $Z\%_{\text{fok}}$ beobachten. Die CD8+ T-Lymphozyten machten mit 3,9 $Z\%_{\text{fok}}$ nur 1/8 dieses Anteils aus.

Die Flächenanteile betragen 0,09 $F\%_{\text{diff}}$ für CD5+ Lymphozyten und 0,27 $F\%_{\text{diff}}$ für CD8+ Lymphozyten. Wie bei den Zellzahlen ist somit auch der Flächenanteil CD8+ Lymphozyten gegenüber den hämatologischen Kontrollfällen im diffusen Infiltrat etwa doppelt so hoch.

3.4. Lymphozytosen unklarer Dignität mit Monoklonalität der B-lymphozytären Infiltrate

3.4.1. Anamnestische, lichtmikroskopische und molekularbiologische Befunde

Bei 15 von 19 Patienten mit monoklonaler Lymphozytose war ein NHL anamnestisch bereits bekannt. In 9 Fällen lag ein hochmalignes NHL, in 6 Fällen lag ein niedrigmalignes NHL vor. Folgende Subtypen sind anzugeben: 6x diffuses großzelliges B-NHL, 5x B-CLL, 2x Keimzentrumslymphom, 2x B-CLL mit plasmazytoider Differenzierung, 1x Burkitt-artiges B-NHL, 1x Haarzelleukämie und 2x ein nicht weiter klassifiziertes niedrig malignes B-NHL. Entsprechend der Studienkriterien war in allen 19 Fällen der Diagnosegruppe LUD_m das Knochenmarksinfiltrat niedrigmaligne, und es wurde molekularbiologisch ein monoklonales Rearrangement des IgH nachgewiesen.

3.4.2. Morphometrische Messungen (Tabelle 6)

In der Gruppe der LUD_m entsprach $Z\%_{\text{diff}}$ mit dem Median von 1,6 für $CD5+$ und 2,5 für $CD8+$ Lymphozyten etwa den Werten bei LUD_p. Im fokalen Infiltrat stieg der Anteil $CD5+$ Lymphozyten gegenüber dem diffusen Infiltrat um das 3,5fache auf 5,7 $Z\%_{\text{fok}}$. Für $CD8+$ Lymphozyten war ein weniger starker Anstieg zu beobachten. Mit 4,3 $Z\%_{\text{fok}}$ wuchs ihr Anteil nur um das 1,7fache. Der Anteil der $CD8+$ Zellen an den $CD3+$ T-Lymphozyten betrug im fokalen Infiltrat 1/6. Die $CD5+$ T-Lymphozyten machten etwa die Hälfte der $CD3+$ T-Lymphozyten aus. In der Grenzzone waren $CD5+$ und $CD8+$ Lymphozyten mit 2,5 bzw. 2,6 $Z\%_{\text{grenz}}$ gleich häufig. Für $Z\%_{\text{repr}}$ entsprachen die Werte weitgehend den Ergebnissen im diffusen Infiltrat.

Der Flächenanteil $F\%_{\text{diff}}$ betrug für $CD5+$ Lymphozyten 0,08 und für $CD8+$ Lymphozyten 0,13 und war somit ähnlich den hämatologisch gesunden Kontrollfällen.

3.5. Lymphozytosen unklarer Dignität mit Polyklonalität der B-lymphozytären Infiltrate

3.5.1. Anamnestische, lichtmikroskopische und molekularbiologische Befunde

Bei 23 von 48 Patienten mit einer LUD_p war ein NHL anamnestisch bereits bekannt. In 21 Fällen lag ein hochmaligner Subtyp vor, in 2 weiteren Fällen ein niedrigmalignes NHL. Im Einzelnen waren 14 Fälle eines diffusen großzelligen B-NHL bekannt, außerdem 1x ein Keimzentrumslymphom, 1x ein Burkitt-ähnliches B-NHL, 1x ein niedrigmalignes B-NHL, 2x ein sekundär hoch malignes B-NHL, 1 hochmalignes B-NHL ohne genauere Spezifikation, 2x ein hochmalignes T-NHL und 1x ein peripheres, nicht weiter klassifiziertes T-Zell Lymphom . Im Knochenmark lag in 24 Fällen eine rein diffuse Infiltration des Knochenmarkes vor. Weitere 20 Fälle wiesen sowohl diffuse als auch fokale Infiltrate auf. In 4 Fällen waren nur fokale Infiltrate nachweisbar. Das Genrearrangement des IgH war in allen Fällen definitionsgemäß polyklonal.

3.5.2. Morphometrische Messungen (Tabelle 7)

In der Gruppe der LUD_p entsprach $Z\%_{diff}$ mit dem Median von 1,6 für CD5+ und 2,9 für CD8+ Lymphozyten etwa den Werten bei LUD_m. Im fokalen Infiltrat stieg der Anteil der CD5+ Lymphozyten gegenüber dem diffusen Infiltrat um das 6fache auf 9,7 $Z\%_{fok}$ und lag damit etwa 1,5 mal höher als bei den LUD_m. Für CD8+ Lymphozyten war, wie bei den LUD_m, ein weniger starker Anstieg zu beobachten: mit 6,7 $Z\%_{fok}$ wuchs ihr Anteil etwa um das Doppelte. Der Anteil der CD8+ Zellen an den CD3+ T-Lymphozyten lag im fokalen Infiltrat mit etwa 30% etwas höher als bei den LUD_m. Die CD5+ T-Lymphozyten machten jedoch mit 50% etwa den gleichen Anteil an den CD3+ T-Lymphozyten aus wie bei LUD_m. Für $Z\%_{repr}$ entsprachen die Mediane den Ergebnissen im diffusen Infiltrat.

Mit 0,08 und 1,16 $F\%_{diff}$ entsprachen die Werte für die Flächenanteile CD5+ und CD8+ Lymphozyten den Ergebnissen bei LUD_m.

3.6 Statistisch signifikante Ergebnisse beim Vergleich von LUD_m und LUD_p

Unter Einbeziehung der Daten zu CD3+ und CD20+ Lymphozyten ergaben sich aus dem Vergleich von LUD_m und LUD_p mit dem Fishers Exakt Test die folgenden signifikanten Ergebnisse (Tabelle 8). Soweit nicht anders angegeben lag das Signifikanzniveau bei $p < 0,05$.

Bei den LUD_m überstieg der Anteil locker verstreuter CD20+ Lymphozyten signifikant häufiger ($p < 0,01$) die Zahl der CD8+ Lymphozyten als bei den LUD_p. Für $Z\%_{diff}$ war das Verhältnis von $\frac{CD20+}{CD8+}$ Lymphozyten bei 52,6% (10/19) der LUD_m größer als 1,0. Für die LUD_p galt dies nur in 16,7% (8/48) der Fälle.

Im fokalen Infiltrat wiesen die LUD_m einen geringeren Anteil an CD8+ Zellen am Gesamtanteil der CD3+ T-Lymphozyten auf als die LUD_p. Für $Z\%_{fok}$ ergab der Quotient aus $\frac{CD3+}{CD8+}$ Lymphozyten bei 31,6% (6/19) der LUD_m einen Wert $> 4,0$ während er nur für 8,3% (4/48) der LUD_p über 4,0 lag. Außerdem machten die CD5+ Lymphozyten im Vergleich zum Anteil der CD20+ B-Lymphozyten einen geringeren Anteil am gesamten lymphozytären Infiltrat aus. Das Verhältnis $\frac{CD20+}{CD5+}$ Lymphozyten war bei 31,6% (6/19) der LUD_m größer 3,0, aber nur bei 2,1% (1/48) der LUD_p ($p < 0,002$).

Wie im fokalen Infiltrat wurde bei den LUD_m im Vergleich zu den LUD_p auch für $Z\%_{grenz}$ ein geringerer Anteil von CD8+ Zellen an allen T-Zellen beobachtet. Der Quotient von $\frac{CD3+}{CD8+}$ Lymphozyten ergab für 21,1% (4/19) der LUD_m Werte über 2,7. Dahingegen war er nur bei 2,1% (1/48) der LUD_p größer als 2,7. Der Quotient $\frac{CD20+}{CD5+}$ Lymphozyten war ebenfalls den Verhältnissen im fokalen Infiltrat vergleichbar. Hier ergab sich für 26,3% (5/19) der LUD_m ein Wert größer 2,4. Bei den LUD_p lagen nur 6,3% (3/48) über diesem Wert. Weiterhin ergab sich bei den LUD_m für den Quotienten von $\frac{CD5+}{CD8+}$ Lymphozyten für 31,6% (6/19) der LUD_m ein Wert größer 0,3. Unter den LUD_p fanden sich nur 8,3% (4/48) der Fälle mit einem Wert größer 0,3. Bei den LUD_m lagen signifikant häufiger mehr CD20+ B-Lymphozyten als CD8+ T-Lymphozyten vor. Der Quotient $\frac{CD20+}{CD8+}$ Lymphozyten lag in 36,8% (7/19) der LUD_m über 1,0. Bei den LUD_p war dieser Wert in 6,25% (3/48) der Fälle größer 1,0 ($p < 0,005$).

Für $Z\%_{repr}$ konnte bei den LUD_m wiederum ein starkes Überwiegen von CD20+ B-Lymphozyten im Vergleich zu den CD5+ T-Lymphozyten sowie auch zu den CD8+ T-Lymphozyten festgestellt werden. Der Quotient von CD20+/CD5+ Lymphozyten lag in 52,6% (10/19) der LUD_m über 6,0, bei den LUD_p war er in 2,1% (1/48) größer als 6,0 ($p < 0,001$). Der Quotient von CD20+/CD8+ Lymphozyten war in 79,0% (15/19) der LUD_m größer 0,6. Bei den LUD_p war nur in 39,6% (19/48) der Fälle der Wert größer 0,6 ($p < 0,01$).

Beim Vergleich der LUD_p mit den 5 Fällen eines T-NHL lag ein auffallend höherer Flächenanteil an CD8+ Lymphozyten vor (Tabelle 9). Während nur bei 25% der LUD_p der Flächenanteil größer als 0,2 war, so galt dies für alle 5 Fälle von T-NHL ($p < 0,005$).

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden Beckenkammtrepanate von hämatologisch gesunden Kontrollfällen und Beckenkammtrepanate mit Knochenmarksinfiltraten eines B-NHL oder T-NHL und solche mit einer Lymphozytenvermehrung unklarer Dignität untersucht. Die malignen Lymphome wurden nach der REAL-Klassifikation in die entsprechenden Subtypen eingeteilt. In der Gruppe mit geringer lymphozytärer Infiltration unklarer Dignität (LUD), die bei GIEMSA Färbung lichtmikroskopisch keiner der beiden ersten Gruppen zugeordnet werden konnte, wurden anhand molekularbiologischer Analysen zur Klonalität der IgH- und TCR γ - Genumlagerungen die lymphoiden Infiltrate entweder als mono- oder polyklonal klassifiziert und dementsprechend in monoklonale (LUD_m) und polyklonale (LUD_p) Lymphozytosen unterteilt. Alle Knochenstanzen wurden formalinfixiert, in EDTA entkalkt und in Paraffin eingebettet sowie immunhistochemisch mit monoklonalen T-Zell-Antikörpern gegen CD5 und CD8 untersucht. Der monoklonale Antikörper Anti-CD5 ist ein pan-T-Zell Marker. Außerdem markiert er eine kleine, IgM-Autoantikörper produzierende Subpopulation von B- Lymphozyten, die bei CLL oder Mantelzell-Lymphom die neoplastischen Infiltrate darstellen (Cossman et al., 1984; Huber et al., 1986; Spier et al., 1986). Der monoklonale Antikörper Anti-CD8 markiert zytotoxische T-Zellen, T-Suppressorzellen sowie einen Teil der Thymozyten (Beyers et al., 1992; Ruck et al., 1994). Auf zusätzliche Untersuchungen zur Charakterisierung von T-Helferzellen wurde verzichtet, da weitere paraffingängige Antikörper derzeit noch keine ausreichende Sensitivität aufweisen (Macon und Salhany, 1998). Beide in dieser Untersuchung verwendeten Antikörper sind paraffingängig und in formalinfixiertem Gewebe anwendbar (Kaufmann et al., 1997; Macon und Salhany, 1998). Sie sind etabliert, kommerziell verfügbar und entsprechen somit dem aktuellen Standard der immunhistochemischen Diagnostik.

Folgende Fragen sollten geklärt werden:

1. Welches sind die Normwerte für den Prozentsatz CD5+ und CD8+ T-Lymphozyten, bezogen auf alle kernhaltigen Zellen im Knochenmark

- hämatologisch gesunder Kontrollpersonen und bei reaktiven Veränderungen des Knochenmarkes?
2. Welche Unterschiede bestehen bezüglich der prozentualen Anteile CD5+ und CD8+ Lymphozyten im normalen/reaktiven Knochenmark und bei NHL der B- oder T- Zellreihe?
 3. Welcher Stellenwert ist in diesem Zusammenhang molekularbiologischen Zusatzuntersuchungen zuzuordnen?

Ein wesentliches Problem in der hämatologischen Routinediagnostik stellt eine geringe diffuse Lymphozytenvermehrung im Knochenmark dar. Bei technischen Mängeln der Gewebeprobe können Lymphozyten in GIEMSA Färbung oft nur schwer erkannt werden, eine quantitative Einschätzung ist fast unmöglich (Horny et al., 1993; Kröber et al., 1999). Ein weiteres Problem sind fokale lymphoide Infiltrate. Sie finden sich in bis zu 20% aller Knochenmarksbiopsien des Erwachsenen und lassen sich schwer von einer geringen Infiltration durch ein niedrig-malignes NHL abgrenzen (Navone et al., 1985; Thiele, 1995). Auch bei extramedullär hochmaligner NHL kann ein Befall des Knochenmarkes durch ein niedrig-malignes Lymphom beobachtet werden (Bartl et al., 1988; Conlan et al., 1990; Budde und Schäfer, 1992; Crisan et al., 1995). Um eine Knochenmarksbeteiligung bei malignem Lymphom von nicht neoplastischen Infiltraten unterscheiden zu können, wurden eine Fülle von morphologischen Kriterien aufgeführt, Für das Vorliegen maligner lymphoider Infiltrate sprechen zum Beispiel eine peritrabekuläre Lage (Juneja et al., 1990; Crocker, 1996; Salisbury et al., 1996, Thiele et al., 1999), die unregelmäßige Begrenzung (McKenna et al., 1988; Crocker, 1996) oder ein erhöhter Gehalt an Retikulinfasern (Thiele et al., 1999). Dennoch fällt gerade bei einer geringen Lymphozytenvermehrung (10-20%) die sichere Abgrenzung reaktiver von neoplastischen Infiltraten allein aufgrund morphologischer Kriterien oft schwer (Kröber et al., 1999; Thiele, 1995; Thiele et al., 1999).

Am vorliegenden Probenmaterial wurden bereits Untersuchungen zu CD3+ und CD20+ Lymphozyten durchgeführt (Dissertation Dauenhauer, 2001; Dissertation Küßwetter, 2001). Diesen Arbeiten wurden alle im Folgenden genannten Werte für CD3+ und CD20+ Lymphozyten entnommen. Die bisher vorliegenden Daten wurden ergänzt durch eine morphometrisch-quantitative Studie zur Menge der CD5+ und CD8+ T-

Lymphozyten im Knochenmark. Da neoplastische lymphoide Infiltrate in der Regel monoklonalen Ursprungs sind, kann durch molekularbiologische Klonalitätsuntersuchungen (PCR) lymphozytärer Zellproliferate zumeist entschieden werden, ob ein neoplastisches oder ein reaktives Infiltrat vorliegt. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass der Prozentsatz polyklonaler Befunde bei sicherem malignem Lymphom (falsch-negativ) bei bis zu 30% liegt (Abdel-Reheim et al., 1996; Kröber et al., 1999).

Für die Gesamtlymphozytenzahl im Knochenmark ist mit 1-5% bis zu über 20% eine auffallend hohe Schwankungsbreite beschrieben (Horny et al., 1989; Shin et al., 1992; Loyson et al., 1997; Thaler et al., 1989). Nicht nur die Anwendung unterschiedlicher Antikörper kann variierende Lymphozytenzahlen bedingen, auch die Technik der Gewebentnahme kann für das Ergebnis entscheidend sein. Durch eine Beimengung von Zellen aus dem peripheren Blut wird im Aspirat der Prozentsatz von Lymphozyten meist zu hoch eingeschätzt. Vor allem die Werte für T-Zellen liegen mit 30-50% sehr viel höher als bei Schnittpräparaten (Clark et al., 1986). So wurden Werte bis 40% T-Lymphozyten im Knochenmarksaspirat beschrieben (Clark et al., 1990). Im Schnittpräparat des Beckenkammtrepanats konnten bis zu 50% weniger Lymphozyten gezählt werden (Clark et al., 1986). Eine verminderte Intensität der Zellanfärbung sowie eine verminderte Sensitivität vieler Antikörper am paraffinbehandelten und entkalkten Trepanat werden als weitere mögliche Ursachen angegeben (Shin et al., 1992; Brown und Gatter, 1993). Auch Gefrierschnitte liefern in der Regel höhere Lymphozytenzahlen. Hier fanden sich zwischen 5% und 9% T-Zellen (Chilosi et al., 1983; Thaler et al., 1989; Hilbe et al., 1994). Allerdings ist die Arbeit mit Gefrierschnitten technisch sehr aufwendig und wird nur in Ausnahmefällen in die Routinediagnostik eingeschlossen (Horny et al., 1989).

Bei den hämatologisch gesunden Kontrollfällen (n=9) waren bei der konventionellen Lichtmikroskopie in keinem Fall fokale lymphoide Infiltrate im Knochenmark nachweisbar. Locker verstreute CD5+ und CD8+ Lymphozyten waren nur immunhistochemisch erkennbar. Ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzahl kernhaltiger Zellen betrug für CD5+ Lymphozyten morphometrisch gemessen minimal 1,1 und maximal 3,7 Z%_{diff} bei einem Median von 2,0. Diese Werte liegen niedriger als in einer

vorangegangenen Untersuchung mit dem pan-T-Zell Marker Anti-CD3, wo ein Median von 3,6 Z%_{diff} angegeben wurde (Dissertation Dauenhauer, 2001). Da Anti-CD3 als T-Zellmarker mit hoher Sensitivität (95%) gilt (Anderson et al., 1991; Chadburn und Knowles, 1994), führen wir die niedrigeren Werte CD5+ Lymphozyten auf eine niedrigere Sensitivität des Antikörpers zurück (Shin et al., 1992; Pileri et al., 1997).

In einer Untersuchung an Gefrierschnitten wurden im normalen Knochenmark mit 3,5% CD5+ Lymphozyten im Vergleich zu unseren Ergebnissen etwas höhere Werte gemessen (Shin et al., 1992). Unseres Wissens nach liegen keine weiteren Untersuchungen zur prozentualen Menge CD5+ Lymphozyten im gesunden Knochenmark vor. In Bezug auf Untersuchungen mit anderen T-Zell Markern entsprechen unsere Ergebnisse etwa den Werten von 2-4%, die mit dem monoklonalen Antikörper UCHL1 (Anti-CD45RO) gemessen wurden (Horny et al., 1989). Dieser Antikörper ist ebenfalls weniger sensitiv als Anti-CD3, jedoch an mild dekalzifizierten Schnittpräparaten ausreichend spezifisch (Terry et al., 1987; Knapp et al., 1989; Kaiserling et al., 1989). In zwei weiteren Studien, die an paraffineingebetteten Schnittpräparaten durchgeführt wurden, ergaben sich Werte von 10-15% bzw. 5-10% CD3+ T-Zellen (Chetty et al., 1995; Loyson et al., 1997).

Für CD8+ Lymphozyten wurde in unserer Untersuchung ein Median von 2,1% aller kernhaltigen Markzellen im hämatologisch gesunden Knochenmark bestimmt. Diese Werte entsprechen in etwa den publizierten Zahlen, die zwischen 0,5-1% (Loyson et al., 1997) und 3,2 % ermittelt wurden (Hilbe et al., 1994). Im Aspirat wurden bis zu 18% CD8+ Lymphozyten gemessen, wobei eine hohe Kontamination mit peripheren Blutzellen vermutet wurde (Clark und Normansell, 1990). Die Gesamtzahl aller T-Zellen im Knochenmark ergibt sich aus der Summe der CD4+ und CD8+ Zellen (Clark et al., 1986; Schmidt-Wolf et al., 1992), da die Anzahl der T-Zellen, die beide Antigene bzw. keines der beiden Antigene exprimieren im gesunden Knochenmark vernachlässigbar klein ist (maximal 0,2% der Gesamtzellzahl, Porwit-MacDonald et al., 2000). Das Verhältnis von CD4+/CD8+ Zellen im Knochenmark wird mit 0,6 angegeben (Shin et al., 1992). Unsere Ergebnisse bestätigen, dass CD8+ Lymphozyten den größten Anteil der T-Zell Population im normalen Knochenmark ausmachen (Janossy et al., 1980; Chilosi et al., 1983). Das vorliegende Verhältnis von 1,8 für

CD3+/CD8+ Lymphozyten erscheint durchaus realistisch, da es rechnerisch einem Verhältnis von 0,8 für CD4+/CD8+ Lymphozyten entspricht.

In der Gruppe der 5 histologisch am Beckenkammtrepanat eindeutig gesicherten B-NHL konnten lichtmikroskopisch in allen Fällen fokale Infiltrate nachgewiesen werden. Die B-CLL und die Mantelzell-Lymphome wurden innerhalb der Gruppe der B-NHL getrennt von den anderen Fällen betrachtet, da sowohl bei B-CLL (2 von 5 B-NHL in vorliegender Studie) als auch bei Mantelzell-Lymphom (1 von 5 B-NHL in vorliegender Studie) CD5 auf den neoplastischen B-Zellen exprimiert wird (Cossman et al., 1984; Scott et al., 1985; Huber et al., 1986; Spier et al., 1986; Thaler et al., 1987; Kaufmann et al., 1997; Pileri et al., 1997). Es ergaben sich allerdings für CD5+ Lymphozyten weder im diffusen noch im fokalen Infiltrat statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der B-CLL/Mantelzell-Lymphome und den anderen B-NHL der Fallgruppe. Auch für das Verhältnis von CD20+/CD5+ Lymphozyten lagen keine signifikanten Unterschiede vor. Entgegen den Erwartungen war der Prozentsatz CD5+ Lymphozyten bei Mantelzell-Lymphom und B-CLL in den fokalen Infiltraten nicht höher als bei den anderen B-NHL. Wir erklären diese Befunde mit einer geringeren Sensitivität des Antikörpers gegen neoplastische CD5+ B-Lymphozyten. Schon früher wurde an Paraffinschnittpräparaten des Knochenmarks beobachtet, dass bei B-CLL und Mantelzell-Lymphom zwar reaktive CD5+ T-Zellen markiert wurden, der Antikörper aber in den gleichen Präparaten die B-Zellen nicht anfärbte (Ben-Ezra und Kornstein, 1996). Singh und Wright fanden an Paraffinschnitten nur bei einer Minderheit der Fälle von B-CLL und Mantelzell-Lymphom CD5+ B-Zellen. Diese waren im Vergleich zu den reaktiven T-Zellen auch deutlich schwächer markiert (Singh und Wright, 1997). Dieses Ergebnis wurde darauf zurückgeführt, dass CD5 auf neoplastischen B-Zellen in variierender und wesentlich geringerer Dichte exprimiert wird als auf T-Zellen (Gadol et al., 1986). Eine weitere Studie berichtet zwar von signifikanten positiven Ergebnissen für CD5+ B-Zellen in entkalkten Paraffinschnitten, allerdings wird auch hier die deutlich schwächere Markierung im Vergleich zu den reaktiven T-Zellen betont (Kauffmann et al., 1997). Mit dem selben Zellklon des Antikörpers wie in vorliegender Untersuchung wurden an lymphatischem Gewebe für CD5+ B-Lymphozyten vergleichbare Werte gemessen wie bei der FACS Analyse. Allerdings war im Gegensatz

zu Knochenmarkspräparaten keine Dekalzifizierung vorausgegangen (Watson et al., 2000). Zusammenfassend kann die geringe Sensitivität des Anti-CD5 Antikörpers in vorliegender Studie wohl folgendermaßen erklärt werden: Schon bei den hämatologisch gesunden Kontrollfällen war CD5 im Vergleich zu CD3 auf den T-Zellen schwächer exprimiert. Daher wurden möglicherweise die in wesentlich geringerer Dichte vorliegenden CD5-Antigene auf B-Zellen nicht ausreichend erfasst.

Im Folgenden betrachten wir die B-NHL als Gesamtgruppe. Der morphometrisch gemessene Prozentsatz CD5+ Lymphozyten lag bei 2,9 Z%_{diff}. Dies entspricht etwa dem Prozentsatz CD3+ T-Lymphozyten bei B-NHL (Dissertation Dauenhauer, 2001), liegt jedoch niedriger als der Anteil der T-Lymphozyten bei B-NHL von 4,2%, der mit UCHL-1 gemessen wurde (Horny et al., 1993). Im Vergleich zum Anteil CD5+ T-Lymphozyten in der hämatologisch gesunden Kontrollgruppe liegen in unserer Studie bei den B-NHL sowohl Z%_{diff} (2,9) als auch Z%_{repr} (3,0) für CD5+ Lymphozyten um etwa 1/3 höher. Die Ursache liegt vermutlich in einer reaktiven Vermehrung von T-Lymphozyten, da CD5+ B-Lymphozyten vom Antikörper, wie oben erläutert, nicht gut erfasst wurden. Bei B-Zell Neoplasien wird auch in der Literatur eine Vermehrung von T-Lymphozyten berichtet (Chilosi et al., 1983; Horny et al., 1993). Thaler et al. fanden sogar bis zu 60% T-Zellen in Infiltraten von B-NHL (Thaler et al., 1987). Die stärkste Vermehrung CD5+ Zellen (7,1 Z%_{fok}) lag im fokalen Infiltrat vor. Dementsprechend beobachteten auch Horny et al. bei B-NHL die meisten T-Zellen in den lymphomatösen Infiltraten oder deren direkter Nachbarschaft (Horny et al., 1993).

Im diffusen Infiltrat lagen 4,6 Z%_{diff} CD8+ Lymphozyten vor. Dies ist etwa das Doppelte des Anteils, der am gesunden Knochenmark gemessen wurde. Eine erhöhte Zahl reaktiver, diffus verstreuter T-Lymphozyten bei B-NHL wurde auch für die Antikörper UCHL1 und Anti-CD3 berichtet (Horny et al., 1989a; Budde und Schäfer, 1992). Im fokalen Infiltrat und im Grenzbereich nahm die Subpopulation CD8+ Lymphozyten trotz der stark erhöhten Gesamtzahl von T-Lymphozyten jedoch ab. Das Verhältnis von CD3/CD8+ Lymphozyten lag bei 13,8. Die vorliegenden Befunde bestätigen somit, dass in den fokalen Infiltraten bei B-NHL, im Unterschied zum normalen Knochenmark, der Anteil der zytotoxischen T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Lymphozyten geringer ist (Chilosi et al., 1983; Thaler et al., 1987).

Der repräsentative Prozentsatz an Lymphozyten pro 100 kernhaltiger Markzellen kann in der Routinediagnostik vor allem dann schwer zu bestimmen sein, wenn neben locker verstreuten lymphoiden Zellen auch fokale Infiltrate vorliegen. Der Flächenanteil pro Markraumfläche lässt sich in diesen Fällen leichter abschätzen. In der Gruppe der B-NHL war der Flächenanteil CD5+ Lymphozyten gegenüber dem normalen Knochenmark um etwa die Hälfte und der Anteil CD8+ Lymphozyten um etwa ein Drittel gestiegen.

In der Gruppe der T-NHL (n=5) entsprach sowohl $Z\%_{\text{diff}}$ als auch $Z\%_{\text{repr}}$ für CD5+ Lymphozyten den Werten der hämatologisch gesunden Kontrollgruppe. Mit dem Antikörper Anti-CD3 war in diesen Fällen aber eine Verdoppelung der Anteils an T-Lymphozyten gemessen worden (Dissertation Dauenhauer, 2001). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die geringere Sensitivität von Anti-CD5. Der Anteil CD8+ Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl im diffusen Infiltrat war mit 3,9 $Z\%_{\text{diff}}$ gegenüber den hämatologisch gesunden Kontrollfällen, entsprechend den Ergebnissen für CD3+ Lymphozyten, etwa doppelt so hoch. Es lag nur in einem der 5 Fälle ein fokales Infiltrat vor. In diesem Fall ließ sich jedoch erwartungsgemäß eine starke Erhöhung der CD5+ T-Lymphozyten auf 32,4 $Z\%_{\text{fok}}$ beobachten. Die CD8+ T-Lymphozyten machten nur 1/8 dieses Anteils aus. Dies lässt darauf schließen, dass, entsprechend den Beobachtungen verschiedener Studien, bei der Mehrzahl der T-NHL CD8 nicht exprimiert wird (Weiss et al, 1985; Borowitz et al., 1986; Picker et al., 1987; Knowles et al., 1989; Macon und Salhany, 1998)

Die Gruppe der Lymphozytosen unklarer Dignität (LUD) machte mit 67 von 86 Patienten (78%) den größten Anteil der untersuchten Fälle aus. In der Routinediagnostik sind gerade diese Fälle schwer zu beurteilen. Rein morphologisch ist eine sichere Beurteilung hinsichtlich der Dignität lymphoider Infiltrate meist nicht möglich. In die Gruppe der LUD wurden nur solche Fälle aufgenommen, die mindestens ein fokales Infiltrat aufwiesen und deren Flächenanteil lymphoider Infiltrate < 20% betrug. Die LUD konnten aufgrund der molekularbiologischen Befunde in zwei Untergruppen unterteilt werden. 19 Patienten wiesen ein monoklonales Genrearrangement (LUD_m) des IgH auf. In dieser Gruppe war in fast 80% (15/19) der Fälle ein malignes Lymphom

auch anamnestisch bekannt. Das Genrearrangement der anderen 48 Patienten war polyklonal. Bei nur 48% (23/48) der Patienten mit LUD_p war anamnestisch ein malignes Lymphom bekannt.

Im diffusen Infiltrat konnten zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Anzahl CD5+ bzw. CD8+ Lymphozyten festgestellt werden, die im wesentlichen den Ergebnissen im gesunden Knochenmark entsprach. Die Anzahl CD5+ und CD8+ Lymphozyten stieg im fokalen Infiltrat gegenüber dem diffusen Infiltrat um das 2-3fache, wobei für CD5+ Lymphozyten in beiden Gruppen ein stärkerer Anstieg als für CD8+ Lymphozyten zu erkennen war. Bei den LUD_p war sogar ein 6fach höherer Wert der CD5+ Lymphozyten im fokalen Infiltrat zu beobachten. Allerdings kann die prozentuale Anzahl CD5+ bzw. CD8+ Lymphozyten weder im fokalen Infiltrat noch in der Grenzzone statistisch als verlässliches Kriterium zur Unterscheidung zwischen malignen und reaktiven Infiltraten dienen. Für das gesamte lymphoide Infiltrat ($Z\%_{repr}$) entsprachen die Werte für CD5+ und CD8+ Lymphozyten den Werten im diffusen Infiltrat. Sie konnten nur in Bezug auf die Anzahl der B-Lymphozyten zur Beurteilung der Malignität der lymphoiden Infiltrate herangezogen werden.

Im einzelnen fanden wir im statistischen Vergleich die folgenden signifikanten Unterschiede zwischen LUD_m und LUD_p ($p < 0,05$):

- Mehr B-Lymphozyten als CD8+ T-Lymphozyten fanden sich in über der Hälfte der Fälle mit LUD_m im diffusen Infiltrat. Für die Gruppe der LUD_p galt dies jedoch nur in weniger als 20% der Fälle.
- Ein geringerer Anteil an CD8+ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD3+T-Lymphozyten war bei den LUD_m im fokalen Infiltrat festzustellen. In knapp 30% der Fälle war der Anteil kleiner als ein Viertel. Bei den LUD_p fand sich ein so kleiner Anteil an T-Zellen nur in 8% der Fälle. Dieser Befund korreliert mit den Ergebnissen anderer Untersucher. Frühere Studien haben festgestellt, dass bei B-NHL in den fokalen Infiltraten der Anteil an CD8+ T-Zellen zugunsten der CD4+ T-Lymphozyten abnehmen kann (Chilosi et al., 1983; Thaler et al., 1987).

Das Verhältnis von CD20+/CD5+ Lymphozyten ließ bei den LUD_m auf eine deutliche Vermehrung von B-Lymphozyten im fokalen Infiltrat schließen.

- Auch in der Grenzzone wurde, wie im fokalen Infiltrat, bei den LUD_m ein geringerer Anteil von CD8+ T-Zellen an allen T-Zellen beobachtet als bei den LUD_p. Weiterhin war auch hier im Vergleich zu CD5+ T-Lymphozyten der Anteil der B-Lymphozyten bei den LUD_m höher als bei den LUD_p. Bei den LUD_m lagen in fast 40% der Fälle mehr B-Lymphozyten als CD8+ T-Lymphozyten vor. Das Verhältnis der B-Lymphozyten zum Anteil der CD8+ T-Lymphozyten war damit deutlich höher als bei den LUD_p. Einen erstaunlichen Befund stellt die Tatsache dar, dass in der Gruppe der LUD_p 25% mehr CD8+ T-Lymphozyten als CD5+ T-Lymphozyten gemessen wurden, während bei den LUD_m beide gleich häufig vorkamen. Da keine Doppelmarkierung durchgeführt wurde, konnten wir nicht klären, ob dies messtechnisch bedingt ist oder eine CD5-CD8+ Subpopulation vorlag.
- Für den repräsentativen Anteil an lymphoiden Zellen schließlich konnte bei den LUD_m wiederum ein starkes Überwiegen von CD20+ B-Lymphozyten im Vergleich zu den CD5+ T-Lymphozyten festgestellt werden. In über der Hälfte der Fälle betrug das Verhältnis 6 zu 1. In knapp der Hälfte der LUD_m waren B-Lymphozyten 1,5mal häufiger als CD8+ T-Lymphozyten.

Im Vergleich von LUD_p und T-NHL ergab sich ein trotz der kleinen Fallzahl bemerkenswerter Befund. $F\%_{diff}$ für CD8+ Lymphozyten war nur in 25% der Fälle mit LUD_p größer als 0,2, während dies für alle T-NHL zutraf. Da bei den T-NHL gegenüber den LUD_p der Anteil CD8+ Lymphozyten am diffusen Infiltrat etwa 1,5mal größer war, ist auch diese Erhöhung des Flächenanteils verständlich. Unsere Ergebnisse bestätigen, dass das reaktive fokale Infiltrat aus einer Mischpopulation von T- und B-Lymphozyten besteht (Thiele, 1995). Sie bestätigen weiterhin, dass sowohl reaktive als auch durch ein B-NHL bedingte fokale Infiltrate des Knochenmarkes aus mehr B- als T- Zellen bestehen (Horny et al., 1989). Das Vorliegen reiner B- bzw. T-Zell Infiltrate bei Knochenmarksinfiltraten im Rahmen von Neoplasien konnte dagegen nicht bestätigt werden (Pileri et al., 1997; Thiele, 1999). Im Gegensatz zu der vorhergehenden Studie mit CD3+ T-Lymphozyten (Dissertation Dauenhauer, 2001) wurden statistische Signifikanzen im Verhältnis von B- zu T-Zellen festgestellt. Insbesondere das Verhältnis CD20+/CD5+ Lymphozyten kann sowohl in $Z\%_{fok}$ als auch in $Z\%_{grenz}$ und in $Z\%_{repr}$ zur Unterscheidung zwischen reaktiven und neoplastischen Infiltraten herangezogen werden.

Es lagen in dieser Untersuchung drei Fälle vor, deren molekularbiologische Befunde vor dem Hintergrund der klinischen und morphologischen Daten zu diskutieren sind. In einem Fall wurde die Monoklonalität einer LUD_m als fraglich falsch-positiv beurteilt. Es war hier kein NHL anamnestisch bekannt. Die morphometrisch quantitativen Untersuchungen ergaben mit 0,12 für CD20+/CD8+ Lymphozyten ein deutlich niedrigeres $Z\%_{diff}$, als für LUD_m zu erwarten wäre (Tabelle 8). Außerdem lagen in $Z\%_{repr}$ 5mal so viele CD5+ wie CD20+ Lymphozyten vor, während LUD_m sonst im völligen Gegensatz dazu in über der Hälfte der Fälle 6mal mehr CD20+ als CD5+ Lymphozyten aufwies. In $Z\%_{repr}$ sprach auch das Verhältnis von CD20+/CD8+ Lymphozyten mit nur 0,12 eher für einen polyklonalen Befund.

In 2 Fällen der LUD_p gab es Hinweise auf ein möglicherweise falsch-negatives Ergebnis der PCR. In beiden Fällen war anamnestisch kein NHL bekannt, jedoch wiesen die Befunde von CD3+ und CD20+ Lymphozyten auf das Vorliegen eines NHL hin. In einem Fall sprachen außerdem auch die CD5+ und CD8+ Lymphozyten betreffenden statistisch signifikanten Daten dafür. Hier lagen in $Z\%_{diff}$ 7mal mehr CD20+ als CD8+ Lymphozyten vor. Auch in $Z\%_{repr}$ waren die B-Lymphozyten stark vermehrt. CD20+ Lymphozyten waren mehr als 4mal so häufig wie CD5+ Lymphozyten. Im Bezug auf CD8+ Lymphozyten waren sie sogar 10mal häufiger. Unsere Studie ergab jedoch, dass nur in etwa 7 % aller LUD_p geringfügig mehr CD20+ Lymphozyten als CD8+ Lymphozyten vorlagen. In gesundem Knochenmark überwiegen in der Regel die T-Lymphozyten (Chetty et al., 1995; Horny et al., 1993). Daher wurde in diesem Fall eine molekularbiologisch nicht erkannte Neoplasie vermutet. Der zweite Fall mit fraglich falsch-negativem PCR Befund konnte anhand unserer Daten eher als polyklonal bestätigt werden. Im Bezug auf CD5+ Lymphozyten war in $Z\%_{repr}$ zwar die Anzahl von B-Lymphozyten 3mal höher, jedoch konnte weder für CD20+/CD8+ Lymphozyten in $Z\%_{repr}$ (0,43) noch für CD20+/CD8+ in $Z\%_{diff}$ (0,29) ein statistisch signifikanter Hinweis auf Monoklonalität ermittelt werden.

Auch in der Literatur wurde bei molekularbiologischen Untersuchungen über falsch-negative (ca.30%) und wenige falsch-positive Ergebnisse berichtet. Ursachen können zum Beispiel in atypischen Rearrangements, wie Inversion der Immunglobuline, liegen (Ramasamy et al., 1992; Abdel-Reheim et al., 1996; Kröber et al., 1999).

Zusammenfassend lassen sich die eingangs gestellten Fragen wie folgt beantworten:

1. Bei hämatologisch Gesunden lag die morphometrisch gemessene prozentuale Gesamtzahl CD5+ T-Lymphozyten zwischen minimal 1,1 Z%_{diff} und maximal 3,7 Z%_{diff}. Der Median betrug 2,0 Z%_{diff}. Für CD8+ T-Lymphozyten wurden minimal 1,0 und maximal 5,1 Z%_{diff} gemessen, mit dem Median bei 2,1 Z%_{diff}. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zum Zellanteil bei reaktiven Veränderungen des Knochenmarkes.
2. Der prozentuale Anteil CD5+ und CD8+ Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl unterschied sich statistisch nicht signifikant zwischen normalem/reaktivem Knochenmark und NHL der B-Zellreihe. Auch bei T-NHL konnte zwischen reaktiven und neoplastischen Infiltraten allein im Bezug auf den Anteil CD5+ und CD8+ Lymphozyten kein Grenzwert ermittelt werden. Wurden diese aber zu CD3+ oder CD20+ Lymphozyten in Beziehung gesetzt, so konnten hier signifikante Unterschiede zwischen LUD_m und LUD_p festgestellt werden.
3. Bei der Charakterisierung lymphoider Zellen im Knochenmark weisen immunhistochemische und morphometrische Befunde im allgemeinen eine gute Korrelation mit der molekularbiologischen Analyse der Klonalität auf. LUD, die anhand immunhistochemisch/morphometrischer Methoden nicht sicher eingeordnet werden konnten, ließen sich mit Hilfe der molekularbiologischen Klonalitätsanalysen in neoplastische (LUD_m) und reaktive (LUD_p) Infiltrate einteilen. Auch bei molekularbiologischen Untersuchungen können, z.B. aufgrund atypischer Rearrangements, wie Inversion der Immunglobuline, falsch-negative und falsch-positive Ergebnisse vorkommen (Ramasamy et al., 1992; Abdel-Reheim et al., 1996; Kröber et al., 1999). Allerdings sind Sensitivität und Spezifität der PCR bei NHL des Knochenmarks etwas höher als bei quantitativ morphometrischer Untersuchung. Wir empfehlen den Einsatz der Molekularbiologie bei T-NHL, da T-NHL von LUD_p morphometrisch-quantitativ nicht sicher abgegrenzt werden konnten. Außerdem sollte die molekularbiologische Untersuchung insbesondere zur Klärung einer geringen Lymphozytenvermehrung weiterhin in diagnostisch sehr schwierigen Fällen sowohl bei T-NHL als auch bei B-NHL angewendet werden.

Schlussfolgerung

Es wurden 86 formalinfixierte, in EDTA entkalkte und in Paraffin eingebettete Beckenkammtrepanate aus folgenden Diagnosegruppen untersucht: 9 hämatologisch Gesunde, 5 Patienten mit einer histologisch gesicherten Infiltration des Knochenmarks durch ein B-NHL, 5 Patienten mit einer Infiltration durch ein T-NHL, 19 Patienten mit LUD_m und 48 Patienten mit LUD_p. Die Schnittpräparate wurden immunhistochemisch mit monoklonalen Antikörpern gegen CD5 und gegen CD8 untersucht und der prozentuale Anteil CD5+ bzw. CD8+ Zellen bezogen auf 100 kernhaltige Markzellen ermittelt. Als wesentliche Befunde konnten wir feststellen:

1. In der Gruppe der hämatologisch Gesunden wurde für CD5+ Zellen ein Anteil von minimal 1,1 Z%_{diff} und maximal 3,7 Z%_{diff} gemessen, der Median lag bei 2,0 Z%_{diff}. Für CD8+ Zellen lagen die Extremwerte bei 1,0 und 5,1 Z%_{diff}, der Median betrug 2,1 Z%_{diff}.
2. In der Gruppe der B-NHL wurden CD5+ B-Zellen durch den Antikörper schlecht erfasst. So wiesen B-CLL und Mantelzell-Lymphome in der Regel keine höheren Werte für CD5+ Zellen auf als die anderen B-NHL. Insgesamt waren die CD5+ Lymphozyten gegenüber der Kontrollgruppe mit 2,9 Z%_{diff} und 3,0 Z%_{fok} um etwa 30% erhöht. Das Verhältnis von CD3+/CD8+ T-Lymphozyten von 13,8 bestätigte, dass bei B-NHL der Anteil CD8+ Lymphozyten an der Gesamtzahl der T-Lymphozyten deutlich geringer ist als im normalen Knochenmark, wo sie etwa 60% der T-Zellen ausmachen (Chilosi et al., 1983; Shin et al, 1992).
3. Mit 32,4 Z%_{fok} wurde in der Gruppe der T-NHL im fokalen Infiltrat erwartungsgemäß eine starke Erhöhung der Zahl CD5+ Zellen gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet. CD8+ Zellen machten nur etwa 1/8 dieses Anteils aus. Im diffusen Infiltrat war der Anteil der CD8+ Zellen mit 3,9 Z%_{diff} etwa doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe.
4. Wurden beim Vergleich der LUD_m mit den LUD_p zusätzlich die CD3+ und CD20+ Zellen betrachtet (Dissertation Dauenhauer 2001; Dissertation Küßwetter 2001), so ergaben sich folgende signifikante Unterschiede: Bei den LUD_m fanden sich im diffusen Infiltrat in über der Hälfte der Fälle mehr CD20+

B-Lymphozyten als CD8+ T-Lymphozyten, währen dies nur für < 20% der LUD_p galt.

Im fokalen Infiltrat wiesen die LUD_m einen geringeren Anteil an CD8+ T-Zellen am Gesamtanteil der CD3+ T-Lymphozyten auf als die LUD_p. Außerdem machten die CD5+ T-Lymphozyten im Vergleich zum Anteil der CD20+ B-Lymphozyten bei den LUD_m einen geringeren Anteil an der Gesamtlymphozytenzahl aus.

In der Grenzzone wurde, wie im fokalen Infiltrat, für die LUD_m ein geringerer Anteil an CD8+ T-Zellen am Gesamtanteil der CD3+ T-Lymphozyten beobachtet. Weiterhin war auch hier der Anteil CD5+ T-Lymphozyten im Vergleich zu den B-Lymphozyten bei den LUD_m niedriger als bei den LUD_p. Außerdem zeigten die LUD_m signifikant häufiger als die LUD_p ein Verhältnis von CD20+/CD8+ Lymphozyten > 1,0.

Für den repräsentativen Anteil lymphoider Zellen konnte bei den LUD_m ein signifikant geringerer Anteil von CD5+ T-Lymphozyten im Vergleich zu den CD20+ B-Lymphozyten bestätigt werden. Auch der Anteil CD8+ T-Lymphozyten war im Vergleich zum Anteil CD20+ B-Lymphozyten bei LUD_m erniedrigt.

Ein Teil der Antikörper, die an Gefrierschnitten angewendet werden können, weisen an formalinfixierten Schnittpreparaten keine ausreichende Sensitivität auf. Die in dieser Untersuchung verwendeten monoklonalen Antikörper gegen CD5 und CD8 sind paraffingangig und in formalinfixiertem Gewebe anwendbar (Kaufmann et al., 1997; Macon und Salhany, 1998). Für CD8+ Lymphozyten liegen unsere Befunde mit 2,1 Z%_{diff} im normalen Knochenmark etwas unter den Ergebnissen (3,2%) an Gefrierschnitten (Hilbe et al., 1994). Diese geringe Differenz zwischen Gefrierschnitten und paraffinierten Preparaten wurde schon in anderen Untersuchungen beobachtet (Shin et al. 1992; Brown und Gatter 1993). Somit erscheint die Sensitivität des Antikörpers in unserer Studie ausreichend. Auch für Anti-CD5 konnte im normalen Knochenmark mit 2,0 Z%_{diff} im Vergleich zu einer Studie an Gefrierschnitten (3,5%) (Shin et al., 1992) eine zufriedenstellende Sensitivität nachgewiesen werden. Bei B-CLL und Mantelzell-

Lymphom konnten wir allerdings auf den Tumorzellen keine Hinweise auf eine Koexpression von CD20 und CD5 ermitteln.

Zusätzlich zu einer Untersuchung des Knochenmarkes mit Antikörpern gegen CD3 und CD20 halten wir eine Ergänzung der Routinediagnostik durch Antikörper gegen CD5 und CD8 besonders in unklaren Fällen für sinnvoll. Dann kann ein Überwiegen von B-Zellen gegenüber CD8⁺ Zellen im diffusen Infiltrat auf eine B-NHL hindeuten. Außerdem kann ein Verhältnis von CD3⁺/ CD8⁺ Zellen > 4 in Lymphozytosen unklarer Dignität auf eine monoklonale Zellvermehrung hinweisen.

Molekularbiologische Untersuchungen empfehlen wir bei diagnostisch unklaren Fällen und bei T-NHL. Gerade bei nur geringem Knochenmarksbefall kann die Abgrenzung zu reaktiv-entzündlichen Veränderungen sehr schwierig sein. Die Zahl der T-Zellen allein gibt keinen Hinweis auf die reaktive oder neoplastische Natur der Infiltrate.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurden formalinfixierte, EDTA-entkalkte und in Paraffin eingebettete Beckenkammpreparate von 86 Patienten immunhistochemisch mit den monoklonalen Antikörpern Anti-CD5 und Anti-CD8 untersucht. Der monoklonale Antikörper Anti-CD5 ist ein pan-T-Zell Marker. Außerdem markiert er eine kleine, IgM-Autoantikörper produzierende Subpopulation von B- Lymphozyten, die bei CLL oder Mantelzell-Lymphom die neoplastischen Infiltrate darstellen (Cossman et al., 1984; Huber et al., 1986; Spier et al., 1986). Der monoklonale Antikörper Anti-CD8 markiert zytotoxische T-Zellen und T- Suppressorzellen (Beyers et al., 1992; Ruck et al., 1994). Die morphometrisch-quantitative Auswertung der Schnittpräparate erfolgte mit einem Computer-assistierten Bildanalysesystem, wobei der prozentuale Anteil der markierten Zellen an der Gesamtzahl kernhaltiger Markzellen ermittelt wurde. Der prozentuale Anteil der CD5+ bzw. CD8+ Zellen (jeweils bezogen auf 100 kernhaltige Markzellen) wurde für jeden Fall bestimmt und als Z% festgehalten, wobei hier unterschieden wurde zwischen Z% im diffusen Bereich ($Z\%_{diff.}$), Z% im fokalen Infiltrat ($Z\%_{fok}$) und Z% in der Grenzzone ($Z\%_{grenz}$). Aus den Messdaten zu diffusen und fokalen lymphatischen Infiltraten wurde ferner ein repräsentativer Lymphozytenanteil ($Z\%_{repr}$) berechnet. Zusätzlich wurde in jedem Fall eine PCR zum Nachweis oder Ausschluss eines klonalen Rearrangements des IgH oder des TCR γ durchgeführt.

Die 86 Fälle wurden in folgende 5 Diagnosegruppen unterteilt: 9 hämatologisch Gesunde zum Ausschluss einer Knochenmarkskarzinose, 5 Patienten mit einer histologisch gesicherten Infiltration des Knochenmarks durch ein B-NHL (1x hochmalignes diffuses großzelliges B-NHL, 1x Burkitt-ähnliches B-NHL, 1x Mantelzell-Lymphom, 2x B-CLL), 5 Patienten mit einer Infiltration durch ein T-NHL (1x ein angioblastisches T-NHL, 1x ein diffuses großzelliges NHL, 1x T-CLL, 2x Subtyp unbekannt) und 67 Patienten mit Lymphozytosen unklarer Dignität. Diese letzte Gruppe wurde wiederum unterteilt in 19 Fälle, in denen die PCR monoklonales Rearrangemant nachgewiesen hatte (=LUD_m) und 48 Fälle mit polyklonalem Rearrangement (=LUD_p).

In der Gruppe der hämatologisch Gesunden lagen die Grenzwerte für den Anteil CD5+ Zellen bei minimal 1,1 und maximal 3,7 Z%_{diff}, der Median wurde bei 2,0 Z%_{diff} ermittelt. Für CD8+ Zellen galten Extremwerte von minimal 1,0 und maximal 5,1 Z%_{diff} mit dem Median bei 2,1 Z%_{diff}. Unter Berücksichtigung der Untersuchung zu CD3+ Lymphozyten (Dissertation Dauenhauer, 2001) ergab sich so ein Anteil von 44% CD8+ Zellen an der Gesamtzahl der T-Lymphozyten.

In allen Diagnosegruppen fiel eine geringere Sensitivität des Antikörpers gegen CD5 im Vergleich zu den vorliegenden Werten für CD3 auf (Dissertation Dauenhauer, 2001). Besonders bei den B-NHL war diese geringere Sensitivität auffällig. Wir stellten fest, dass die Markierung CD5+ Lymphozyten bei B-CLL und Mantelzell-Lymphom keine statistisch relevanten Unterschiede zu den anderen B-NHL erbrachte. Somit kann die Markierung von B-Lymphozyten durch Anti-CD5+ an entkalkten und paraffinierten Schnittpräparaten in Frage gestellt werden. Auf neoplastischen B-Zellen wird CD5 in variierender und wesentlich geringerer Dichte als auf T-Zellen exprimiert (Gadol et al., 1986). Entsprechend den Untersuchungen anderer Studien ist zu vermuten, dass eine besonders eingeschränkte Sensitivität des Antikörpers für das CD5-Antigen auf neoplastischen B-Zellen vorliegt (Kaufmann et al, 1997). Insgesamt waren bei den B-NHL die CD5+ Lymphozyten gegenüber der Kontrollgruppe mit 2,9 Z%_{diff} und 3,0 Z%_{fok} um etwa 30% erhöht. Das Verhältnis von CD3+/CD8+ T-Lymphozyten von 13,8 zeigte, dass bei B-NHL der Anteil zytotoxischer T-Zellen an der Gesamtzahl der T-Lymphozyten deutlich geringer ist als im normalen Knochenmark.

In der Gruppe der T-NHL wurde im fokalen Infiltrat mit 32,4 Z%_{fok} erwartungsgemäß eine starke Erhöhung der CD5+ Zellen gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet. Der Anteil CD8+ T-Lymphozyten an der Gesamtzahl der T-Lymphozyten war mit 1/8 deutlich geringer als in der Kontrollgruppe. Schon in früheren Studien wurde beobachtet, dass CD8 bei der Mehrzahl der T-NHL im fokalen Infiltrat nur gering exprimiert wird (Weiss et al, 1985; Borowitz et al., 1986; Picker et al., 1987; Knowles et al., 1989; Macon und Salhany, 1998). Im diffusen Infiltrat war gegenüber der Kontrollgruppe der Anteil der CD8+ Zellen mit 3,9 Z%_{diff} etwa doppelt so hoch.

Im Hinblick auf die prozentualen Anteile CD5+ und CD8+ Zellen im normalen/reaktiven Knochenmark im Vergleich zu NHL der B- und T-Zellreihe wurde besonderes Augenmerk auf die Fälle mit geringer Lymphozytenvermehrung gelegt. Hier

zeigten sich, unter Einbeziehung der Befunde zu CD3+ und zu CD20+ Lymphozyten, folgende signifikante Unterschiede:

- Bei den LUD_m fanden sich im diffusen Infiltrat in über der Hälfte der Fälle mehr B-Lymphozyten als CD8+ T-Lymphozyten, während dies nur für < 20% der LUD_p galt.
- Im fokalen Infiltrat wiesen die LUD_m einen geringeren Anteil an CD8+ T-Zellen am Gesamtanteil der CD3+ T-Lymphozyten auf als die LUD_p. Er lag 4mal häufiger unter 25 % als bei den LUD_p. Außerdem machten die CD20+ B-Lymphozyten im Vergleich zum Anteil der CD5+ T-Lymphozyten bei den LUD_m einen höheren Anteil (> 3) aus.
- In der Grenzzone wurde, wie im fokalen Infiltrat, für die LUD_m ein geringerer Anteil an CD8+ T-Zellen an der Gesamtzahl der CD3+ T-Lymphozyten beobachtet. Weiterhin war auch hier der Anteil CD5+ T-Lymphozyten im Vergleich zu den B-Lymphozyten bei den LUD_m niedriger als bei den LUD_p. Außerdem zeigten die LUD_m signifikant häufiger als die LUD_p ein Verhältnis von CD20+/CD8+ Lymphozyten > 1,0.
- Für den repräsentativen Anteil lymphoider Zellen konnte bei den LUD_m ein signifikant höherer Anteil CD20+ B-Lymphozyten im Vergleich zu den CD5+ T-Lymphozyten bestätigt werden. In über der Hälfte der Fälle betrug das Verhältnis 6:1. Auch im Vergleich zu den CD8+ T-Lymphozyten war der Anteil der B-Lymphozyten bei LUD_m signifikant höher.

Im Vergleich von LUD_p und T-NHL ergab sich trotz der kleinen Fallzahl ein bemerkenswerter Befund. Der Flächenanteil CD8+ Lymphozyten im diffusen Infiltrat betrug bei allen T-NHL > 20%, jedoch nur bei ¼ aller LUD_p.

Zusätzlich zu einer Untersuchung des Knochenmarkes mit Antikörpern gegen CD3 und CD20 halten wir eine Ergänzung der Routinediagnostik durch Antikörper gegen CD5 und CD8 besonders in unklaren Fällen für sinnvoll. Dann kann ein Überwiegen von B-Zellen gegenüber CD8+ Zellen im diffusen Infiltrat auf eine B-NHL hindeuten. Außerdem kann ein Verhältnis von CD3+/ CD8+ Zellen > 4 in Lymphozytosen unklarer Dignität auf eine monoklonale Zellvermehrung hinweisen.

Molekularbiologische Untersuchungen empfehlen wir bei diagnostisch unklaren Fällen und bei T-NHL. Gerade bei nur geringem Knochenmarksbefall kann die Abgrenzung zu

reaktiv-entzündlichen Veränderungen sehr schwierig sein. Die Zahl der T-Zellen allein gibt keinen Hinweis auf die reaktive oder neoplastische Natur der Infiltrate.

6. Tabellen und Diagramme

Tabelle 1: Patienten

	n	Alter (Jahre) min./Median/max	Geschlecht		anamnestisch bekanntes NHL	
			weiblich	männlich	ja	nein
negative Kontrolle*	9	40/70/83	5	4	0	9
B-NHL	5	38/59/73	1	4	5	0
T-NHL	5	22/62/72	1	4	3	2
LUD**	67	25/57/83	35	32	38	29
Summe	86		42	44	46	40

* Hämatologisch gesunde Kontrollpersonen

** Lymphozytosen unklarer Dignität

Tabelle 2: Definition der morphometrischen Abkürzungen

Abkürzung	Definition
Z%	Prozentsatz der CD5+ bzw. CD8+ T-Lymphozyten (pro 100 kernhaltige Markzellen)
Z% _{diff}	Z% locker verstreuter T-Lymphozyten
Z% _{fok}	Z% in fokal akzentuierten lymphozytären Infiltraten
Z% _{grenz}	Z% im Grenzzonenbereich fokaler/locker verstreuter Lymphozyten
Z% _{repr}	Z% im fokalen und diffusen Bereich (nach prozentualer Gewichtung)
F%	Flächenanteil der CD5+ bzw. CD8+ Lymphozyten
F% _{diff}	F% locker verstreuter T-Lymphozyten

Tabelle 3:

Morphometrische Befunde bei hämatologisch gesunden Kontrollfällen (n=9)

a) Z%_{diff}

	CD5+	CD8+	CD3+/CD5+	CD3+/CD8+
Minimum	1,1	1,0	0,7	0,7
25. Perzentile	1,5	1,8	1,2	1,3
Median	2,0	2,1	2,2	1,8
75. Perzentile	2,7	2,7	2,8	2,9
Maximum	3,7	5,1	7,0	3,6

b) F%_{diff}

	CD5+	CD8+	CD3+/CD5+	CD3+/CD8+
Minimum	0,07	0,05	1,20	0,73
25. Perzentile	0,1	0,09	2,09	1,55
Median	0,1	0,15	2,69	2,41
75. Perzentile	0,14	0,19	3,42	4,09
Maximum	0,19	0,31	6,83	6,41

Tabelle 4: Morphometrische Befunde bei B- NHL (n=5)

a) Z% für CD5+ und CD8+ Lymphozyten bei B-NHL

	CD5+				CD8+			
	Z% _{diff}	Z% _{fok}	Z% _{grenz}	Z% _{repr}	Z% _{diff}	Z% _{fok}	Z% _{grenz}	Z% _{repr}
Minimum	0,3	0,8	0,4	0,3	1,1	1,2	2,3	1,1
25. Perzentile	1,2	3,9	1,7	1,1	1,3	2,3	2,5	1,3
Median	2,9	7,1	3,0	3,0	4,6	3,3	2,6	4,5
75. Perzentile	5,6	8,4	5,0	5,8	5,3	3,3	3,5	5,3
Maximum	9,3	9,8	7,1	9,3	8,7	3,4	4,4	7,8

b) Z% für CD3+/CD5+ und CD3+/CD8+ Lymphozyten bei B-NHL

	CD3+/CD5+				CD3+/CD8+			
	Z% _{diff}	Z% _{fok}	Z% _{grenz}	Z% _{repr}	Z% _{diff}	Z% _{fok}	Z% _{grenz}	Z% _{repr}
Minimum	0,4	2,3	0,6	0,5	0,5	6,9	1,0	0,5
25. Perzentile	1,4	4,3	2,5	2,0	0,8	10,3	1,6	1,1
Median	2,0	6,3	4,4	2,4	0,9	13,8	1,2	1,3
75. Perzentile	2,8	20,0	11,3	2,9	1,3	17,2	2,7	1,5
Maximum	4,4	33,7	18,8	4,4	2,4	20,6	3,3	2,7

c) F%_{diff} bei B-NHL

	CD5+	CD8+	CD3+/CD5+	CD3+/CD8+
Minimum	0,03	0,06	0,50	1,25
25. Perzentile	0,09	0,08	1,41	1,31
Median	0,22	0,26	2,16	2,00
75. Perzentile	0,44	0,288	3,29	2,03
Maximum	0,78	0,30	5,31	5,31

Tabelle 5: Morphometrische Befunde bei T-NHL (n=5)

a) Z% für CD5+ und CD8+ Lymphozyten bei T-NHL

	CD5+				CD8+			
	Z% _{diff}	Z% _{fok}	Z% _{grenz}	Z% _{repr}	Z% _{diff}	Z% _{fok}	Z% _{grenz}	Z% _{repr}
Minimum	0,3	19,1	0,5	0,3	2,7	3,9	1,6	2,7
25. Perzentile	1,2	25,7	0,8	1,2	3,4	3,9	1,6	3,4
Median	1,8	32,4	1,1	2,0	4,1	3,9	1,6	4,1
75. Perzentile	3,2	39,0	1,4	3,5	5,8	3,9	1,6	5,8
Maximum	6,6	45,6	1,7	6,6	7,5	3,9	1,6	7,5

b) Z% für CD3+/CD5+ und CD3+/CD8+ Lymphozyten bei T-NHL

	CD3+/CD5+		CD3+/CD8+	
	Z% _{diff}	Z% _{repr}	Z% _{diff}	Z% _{repr}
Minimum	0,7	0,6	0,4	0,4
25. Perzentile	1,8	1,8	0,8	0,8
Median	2,2	2,2	1,9	1,9
75. Perzentile	8,7	8,7	2,6	2,6
Maximum	28,1	28,1	2,8	2,8

c) F%_{diff} bei T-NHL

	CD5+	CD8+	CD3+/CD5+	CD3+/CD8+
Minimum	0,01	0,22	1,00	0,52
25. Perzentile	0,05	0,23	2,49	0,97
Median	0,09	0,27	3,77	2,74
75. Perzentile	0,17	0,36	18,55	3,30
Maximum	0,33	0,43	60,54	3,83

Tabelle 6: Morphometrische Befunde bei LUD_m (n=19)

a) Z% für CD5+ und CD8+ Lymphozyten bei LUD_m

	CD5+				CD8+			
	Z% _{diff}	Z% _{fok}	Z% _{grenz}	Z% _{repr}	Z% _{diff}	Z% _{fok}	Z% _{grenz}	Z% _{repr}
Minimum	0,3	0,6	0,2	0,3	0,5	0,7	0,3	0,5
25. Perzentile	0,7	2,2	0,6	0,7	1,7	2,8	2,0	1,5
Median	1,6	5,7	2,6	1,6	2,5	4,3	2,5	2,5
75. Perzentile	2,6	15,9	3,2	2,6	3,4	5,7	5,3	3,4
Maximum	4,4	47,1	13,2	6,2	6,1	17,2	11,0	7,8

b) Z% für CD3+/CD5+ und CD3+/CD8+ Lymphozyten bei LUD_m

	CD3+/CD5+				CD3+/CD8+			
	Z% _{diff}	Z% _{fok}	Z% _{grenz}	Z% _{repr}	Z% _{diff}	Z% _{fok}	Z% _{grenz}	Z% _{repr}
Minimum	0,3	1,4	1,4	0,1	0,2	1,6	1,0	0,0
25. Perzentile	0,7	1,6	2,1	0,6	0,4	3,8	1,4	0,5
Median	1,1	1,9	2,4	1,3	0,9	5,8	2,7	1,0
75. Perzentile	2,3	3,5	11,3	2,0	1,9	8,0	4,9	2,4
Maximum	31,2	26,8	70,5	31,0	4,3	12,4	11,1	4,3

c) F%_{diff} bei LUD_m

	CD5+	CD8+	CD3+/CD5+	CD3+/CD8+
Minimum	0,01	0,02	0,00	0,00
25. Perzentile	0,04	0,08	0,84	0,62
Median	0,08	0,13	1,66	1,00
75. Perzentile	0,14	0,19	3,26	2,58
Maximum	0,33	0,32	49,35	8,81

Tabelle 7: Morphometrische Befunde bei LUD_p (n=48)

a) Z% für CD5+ und CD8+ Lymphozyten bei LUD_p

	CD5+				CD8+			
	Z% _{diff}	Z% _{fok}	Z% _{grenz}	Z% _{repr}	Z% _{diff}	Z% _{fok}	Z% _{grenz}	Z% _{repr}
Minimum	0,2	2,5	0,3	0,2	0,5	1,0	0,6	0,0
25. Perzentile	0,7	7,1	2,0	0,8	2,4	4,1	5,9	2,2
Median	1,6	9,7	2,8	1,6	2,9	6,7	3,8	2,9
75. Perzentile	2,2	17,8	4,3	2,4	4,2	8,5	8,1	4,2
Maximum	3,8	50,8	5,9	5,0	6,9	15,6	11,7	6,9

b) Z% für CD3+/CD5+ und CD3+/CD8+ Lymphozyten bei LUD_p

	CD3+/CD5+				CD3+/CD8+			
	Z% _{diff}	Z% _{fok}	Z% _{grenz}	Z% _{repr}	Z% _{diff}	Z% _{fok}	Z% _{grenz}	Z% _{repr}
Minimum	0,5	0,5	1,8	0,5	0,2	1,5	0,5	0,2
25. Perzentile	1,2	1,7	2,1	1,3	0,5	2,5	0,6	0,5
Median	1,7	2,0	2,4	1,8	0,9	3,6	1,5	1,0
75. Perzentile	2,9	2,8	3,1	2,9	1,2	8,6	2,2	1,4
Maximum	12,2	3,9	24,4	10,0	5,8	13,3	3,7	6,1

c) F%_{diff} bei LUD_p

	CD5+	CD8+	CD3+/CD5+	CD3+/CD8+
Minimum	0,01	0,00	0,76	0,34
25. Perzentile	0,04	0,10	1,98	0,87
Median	0,08	0,16	2,51	1,35
75. Perzentile	0,15	0,24	4,33	2,78
Maximum	0,26	0,50	21,20	11,85

Tabelle 8: Statistisch signifikante Ergebnisse bei LUD_m vs.LUD_p

a) Z%_{diff}

	CD20+/CD8+ > 1,0
LUD_m	10/19(52,6%)
LUD_p	8/48(16,7%)
<i>p</i>	< 0,01

b) Z%_{fok}

	CD3+/CD8+ > 4,0	CD20+/CD5+ > 3,0
LUD_m	6/19(31,6%)	6/19(31,6%)
LUD_p	4/48(8,3%)	1/48(2,1%)
<i>p</i>	< 0,05	< 0,002

c) Z%_{grenz}

	CD3+/CD8+ > 2,7	CD5+/CD8+ > 0,3	CD20+/CD5+ > 2,4	CD20+/CD8+ > 1,0
LUD_m	4/19(21,1%)	6/19(31,6%)	5/19(26,3%)	7/19(36,8%)
LUD_p	1/48(2,1%)	4/48(8,3%)	3/48(6,3%)	3/48(6,3%)
<i>p</i>	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,005

d) Z%_{repr}

	CD20+/CD5+ > 6,0	CD20+/CD8+ > 1,5
LUD_m	10/19(52,6%)	9/19(47,4%)
LUD_p	1/48(2,1%)	5/48(10,4%)
<i>p</i>	< 0,0001	< 0,01

7. Abbildungen

Abb. 1 Normales Knochenmark

Normales Knochenmark bei 72 J., weiblich.

Es handelt sich um ein normozelluläres Knochenmark mit intakter Hämatopoese. Bei konventioneller GIEMSA Färbung (a) sind die locker verstreuten Lymphozyten nicht zu erkennen. Bei immunhistochemischer Anfärbung mit Antikörpern gegen CD5 (b) und CD8 (c) fallen jeweils locker verstreute Lymphozyten auf.

Abb. 1a GIEMSA, x 400

Abb. 1b ABC Methode, Anti-CD5, x 400

Abb. 1c ABC-Methode, Anti-CD8, x 400

Abb. 1a

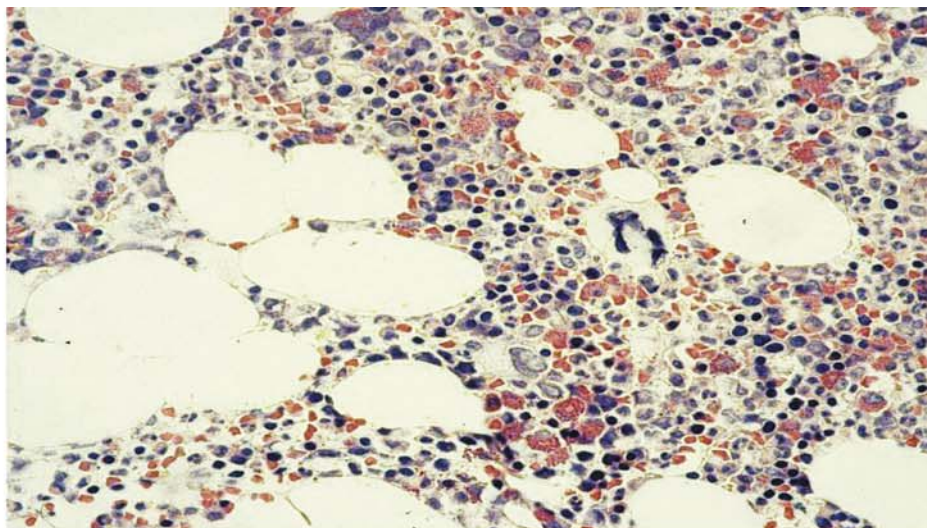


Abb. 1b

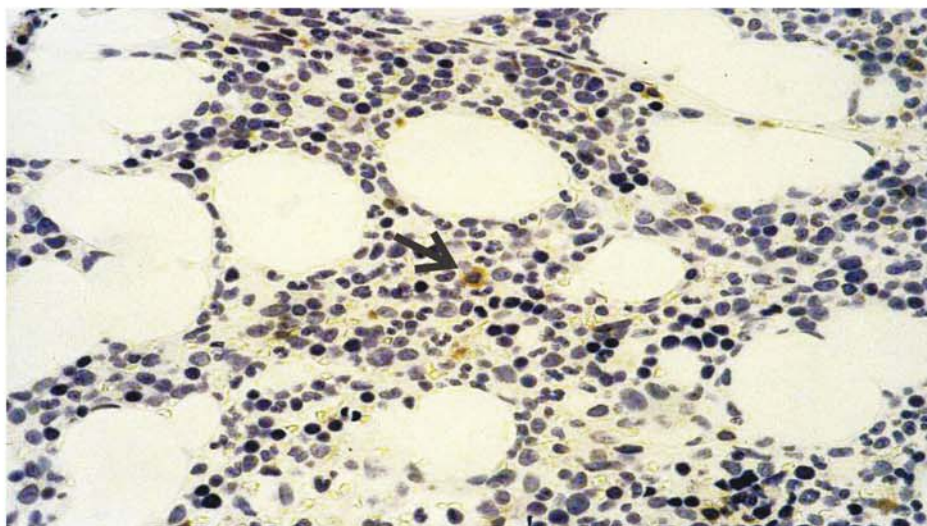


Abb. 1c

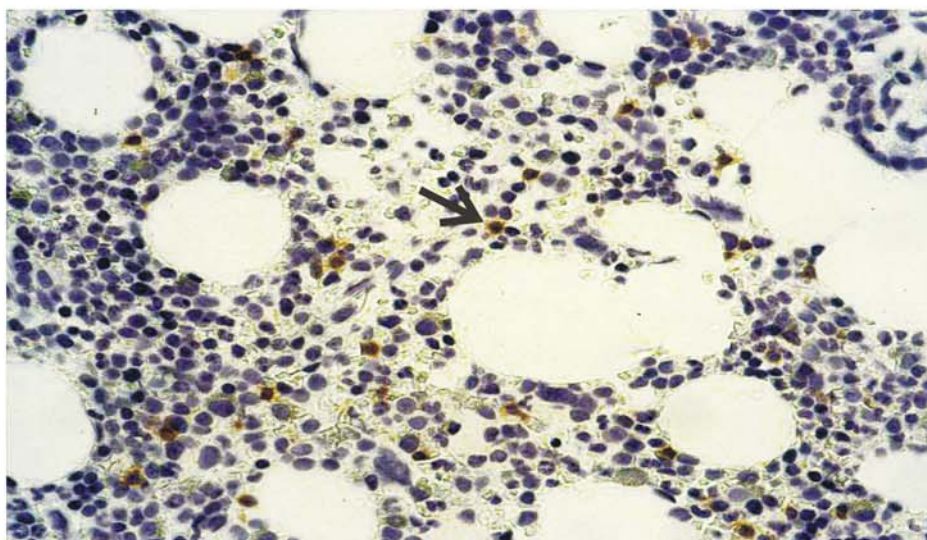


Abb. 2 **LUD_m**

KM mit Lymphozytenherd eines diffusen großzelligen B-NHL bei 68 J., männlich.

Die GIEMSA Färbung zeigt eine Prädominanz kleiner bis mittelgroßer Lymphozyten in einem scharf begrenzten Infiltrat. Immunhistochemisch findet sich im Vergleich zu den CD8+ Lymphozyten eine höhere Zahl CD5+ Lymphozyten (vgl. Abb. 2 und 3).

Abb. 2a GIEMSA, x 400

Abb. 2b ABC-Methode, Anti-CD5, x 400

Abb. 2c ABC-Methode, Anti-CD8, x 400

Abb. 2a

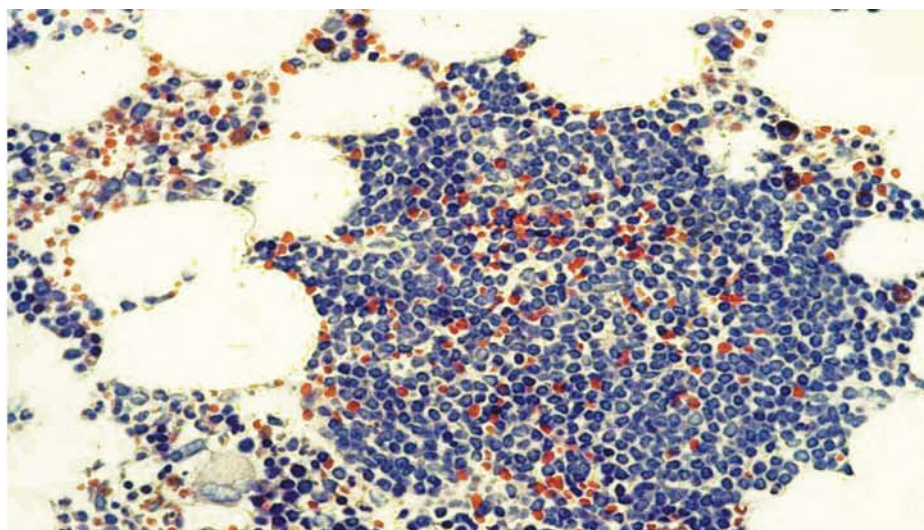


Abb. 2b

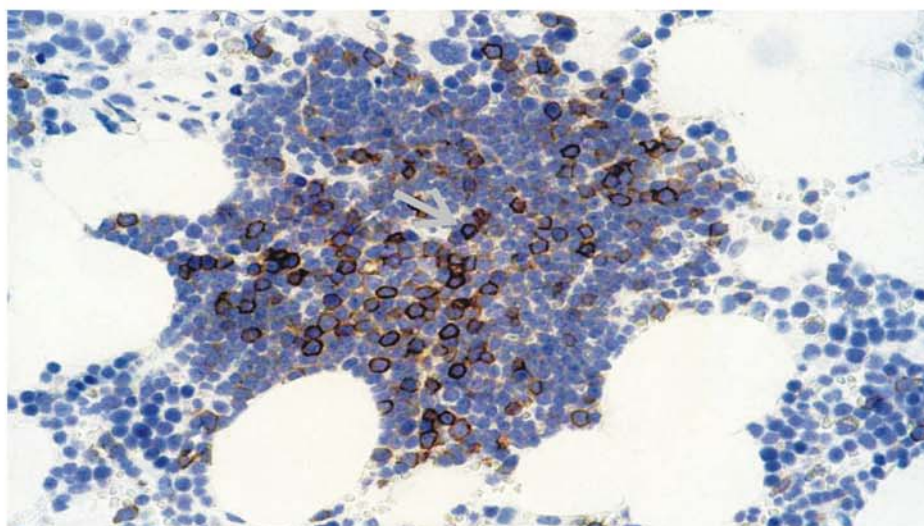


Abb. 2c

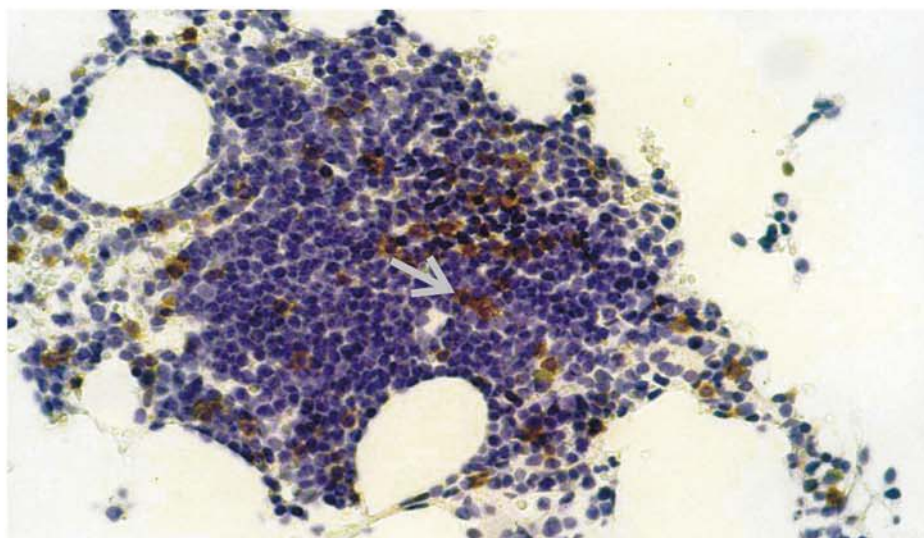


Abb. 3 T-NHL

KM mit Infiltraten eines diffusen großzelligen T-NHL bei 72 J., weiblich.

Bei konventioneller GIEMSA Färbung erkennt man eine geringe, diffuse Verteilung von Lymphozyten ohne Ausbildung kompakter Infiltrate. Immunhistochemisch sieht man ein Überwiegen der CD8+ gegenüber den CD5+ T-Zellen. Insgesamt machen die CD8+ Zellen etwa 10 bis 20% aller kernhaltigen Zellen aus.

Abb. 3a GIEMSA, x 400

Abb. 3b ABC-Methode, Anti-CD5, x 400

Abb. 3c ABC-Methode, Anti-CD8, x 400

Abb. 3a

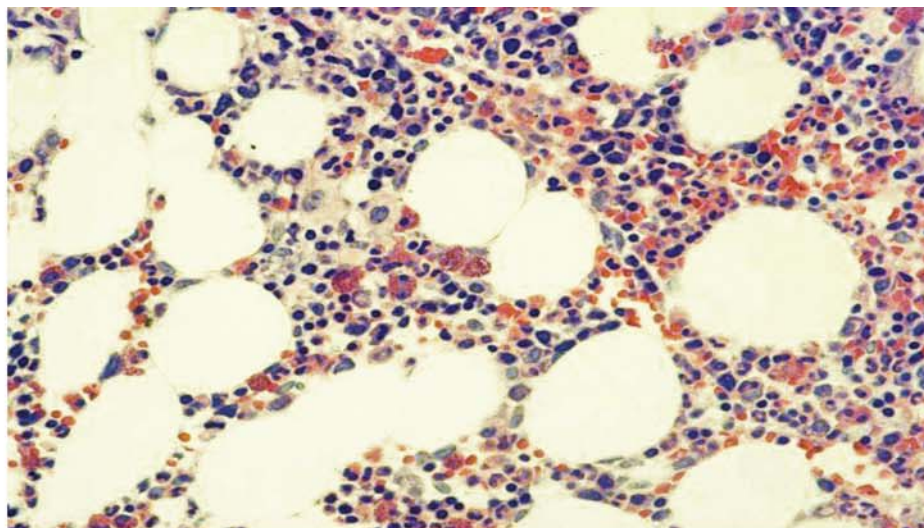


Abb. 3b

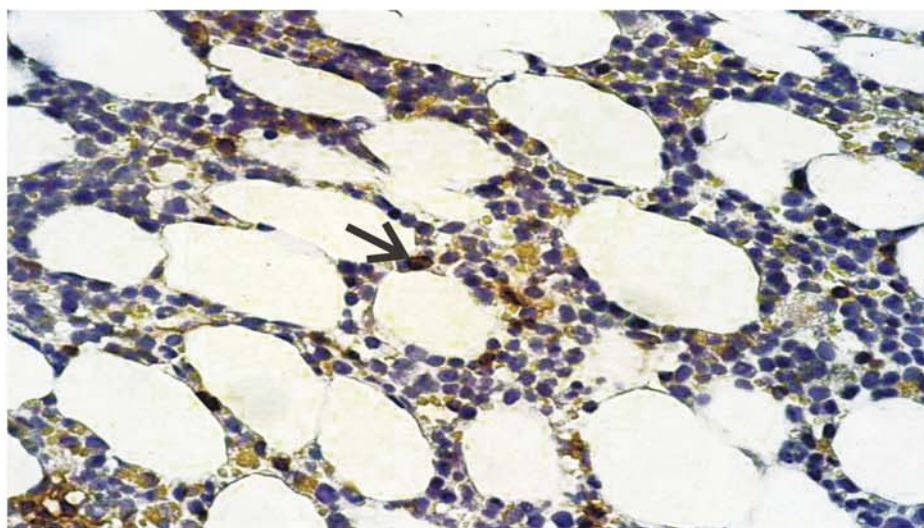
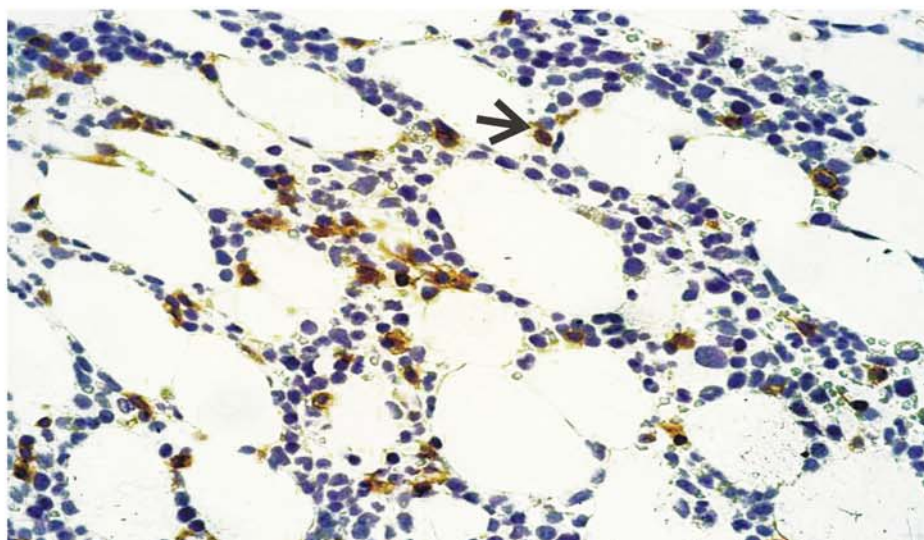


Abb. 3c



8. Literaturverzeichnis

Abdel-Reheim F, Edwards E, Arber DA (1996) Utility of a rapid polymerase chain reaction for the detection of molecular changes in B-cell lymphoma. Arch. Pathol. Lab. Med. 120: 357-63

Anderson P, Nagler-Anderson C, O'Brien C, Levine H, Watkins S, Slayter HS, Blue ML, Schlossman SF (1990) A monoclonal antibody reactive with a 15-kDA cytoplasmatic granule-associated proteine defines a subpopulation of CD8+ lymphocytes. J. Immunol. 144(2): 574-82

Bartl R, Hansmann ML, Frisch B, Burkhardt R (1988) Comparative histology of malignant lymphomas in lymph node and bone marrow. Br. J. Haematol. 69:229-37

Ben-Ezra JM, Kornstein MJ (1996) Antibody NCL-CD5 fails to detect neoplastic CD5+ cells in neoplastic sections. Am. J. Clin. Pathol. 106: 370-373

Berard CW, Hutchinson RE (1997) The problem of classifying lymphomas: an orderly prescription for progress. Ann. Oncol. 8 Suppl. 2: 3-9

Beyers AD, Spruyt LL, Williams AF (1992) Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2,CD4,orCD8 and CD5. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2945

Brown DC, Gatter CC (1993) The bone marrow trephine biopsy: a review of normal histology. Histopathology 22,411-22

Borowitz MJ, Reichert TA, Brynes RK (1986) The phenotypic diversity of peripheral T-cell lymphomas: the Southeastern Cancer Study Group experience. Hum. Pathol. 17: 567-74

Bluth RF, Casey TT, McCurley TL (1993) Differentiation of reactive from neoplastic small-cell lymphoid aggregates in paraffin-embedded marrow particle using L-26 (CD20) and UCHL-1 (CD45RO) monoclonal antibodies. Am. J. Clin. Pathol. 99:150-6

Budde R, Schäfer HE (1992) Die Bedeutung "unspezifischer" lymphoider Infiltrate im Knochenmark bei hochmalignen Non.Hodgkin Lymphomen. Verh. Dtsch. Ges. Path. 76: 136-9

Chabner BA, Fisher RI, Young RC, DeVita VT (1980) Staging of non-Hodgkins lymphoma. Semin. Oncol. 7:285-91

Chadburn A, Knowles DM (1994) Paraffin resistant antigens detectable by antibodies L26 and polyklonal CD3 predict the B- or T-cell lineage of 95% of diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphomas. Am J. Clin. Pathol. 102: 284-291

- Chetty R, Echezarreta, G, Comley M, Gatter K (1995) Immunohistochemistry in apparently normal bone marrow trephine specimens from patients with nodal follicular lymphoma. *J. Clin. Pathol.* 48:1035-8
- Chilosi M, Pizzolo G, Fiore-Donati L, Bofill M, Janossy G (1983) Routine immunofluorescent and histochemical analysis of bone marrow involvement of lymphoma/leukemia: the use of cryostat sections
- Clark P, Normansell DE, Innes DJ, Hess CE (1986) Lymphocyte subsets in normal bone marrow. *Blood* 67:1600-1606
- Clark P, Normansell DE (1990) Phenotype analysis of lymphocyte subsets in normal human bone marrow. *Am J. Clin. Pathol.* 94(5): 632-6
- Conlan MG, Bast M, Armitage JO, et al. (1990) Bone marrow involvement by non-Hodgkins lymphoma: the clinical significance of morphologic discordance between the lymph node and bone marrow. Nebraska Lymphoma Study Group. *J. Clin. Onc.* 8:1163
- Cossman J, Neckers LM, Hsu SM, et al. (1984) Expression of developmentally regulated B-cell antigens. *Am. J. Pathol.* 115:117
- Crisan D, Mattson JC (1995) Discordant morphologic features in bone marrow by malignant lymphomas: Use of gene rearrangement patterns of diagnosis. *Am. J. Haematol.* 49,299-309
- Crocker J (1996) Lymphoid aggregates in bone marrow trephines: New approaches to a continuing problem. *J. Pathol.* 178:367-368
- Dauenhauer V (2000) Reaktive und neoplastische T-Zellen im menschlichen Knochenmark: Immunhistochemische und morphometrische Untersuchungen mit dem polyklonalen Antikörper Anti-CD3.
- Deverell MH, Best E, Salisbury JR (1997) Lymphoid infiltrates in B-cell non-Hodgkin's lymphoma: comparing nuclear characteristics between lymph node and bone marrow; and evaluating diagnostic features of bone marrow infiltrates in paraffin embedded tissues. *Anal. Cell. Pathol.* 14(1): 1-7
- Dick F, Bloomfield CD, Brunning RD (1974) Incidence cytology and histopathology of non-Hodgkin's lymphomas in the bone marrow. *Cancer* 33:1382-98
- Faulkner-Jones BE, Howie AJ, Boughton BJ, Franklin IM (1988) Lymphoid aggregates in bone marrow: study of eventual outcome. *J. Clin. Pathol.* 41(7): 768-75
- Gadol N, Ault, KA (1986) Phenotypic and functional characterisation of human leu-1 (CD5) B cells. *Immunol. Rev.* 93: 23-34

- Graham SJ, Sharpe RW, Steinberg SM, Cotelingam JD, Sausville EA, Foss FM (1993) Prognostic implications of a bone marrow histopathologic classification system in mycosis fungoides and the Sezary syndrome. *Cancer* 72:726-34
- Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Clary ML, Delsol G, De-Wolff-Peters E, Falini B, Gatter KC (1994) A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: A proposal from the international lymphoma study group. *Blood* 84: 1361-1392
- Hashimoto M, Higuchi N, Saito T (1957) Lymph nodules in human bone marrow. *Acta. Pathol. Jpn.* 7:33-52
- Hilbe W, Eisterer W, Schmid C, Starz I, Silly H, Duba C, Ludescher C, Thaler J (1994) Bone marrow lymphocyte subsets in myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Pathol.* 47(6): 505-7
- Herold G (1999) *Innere Medizin*. Herold, Köln
- Hodges E, Stacey G, White D, Howell H, Smith J (1991) Histologic, immunophenotypic and genotypic analysis of bone marrow trephines from patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Leuk. Res.* 15(12): 1117-24
- Horny HP, Engst U, Walz RS, Kaiserling E (1989) In situ immunophenotyping of lymphocytes in human bone marrow: an immunohistochemical study. *Brit. J. Haematol.* 71:313-321
- Horny HP, Wehrmann M, Griesser H, Tiemann M, Bultmann B, Kaiserling E (1993) Investigation of bone marrow lymphocyte subsets in normal, reactive and neoplastic states using paraffin-embedded biopsy specimens. *Am. J. Clin. Pathol.* 99(2): 142-9
- Huber H, Thaler J, Greil R, Gattringer C, Radaszkiewicz T (1986) Immunologische Markeruntersuchungen bei malignen Lymphomen: Diagnostische und prognostische Relevanz. *Onkologie* 9 (2): 108-13
- Janossy G, Tidman N, Selby WS, Thomas JA, Granger S, Kung PC, Goldstein G (1980) Human T-lymphocytes of inducer and suppressor type occupy different microenvironments. *Nature* 288(5786): 81-4
- Jones SE, Rosenberg SA, Kaplan HS (1972) Non- Hodgkin's lymphomas. 1. Bone marrow involvement. *Cancer* 29:954-60
- Juneja SK, Wolf AM, Cooper IA (1990) Value of bilateral bone marrow biopsy specimens in non-Hodgkin's lymphoma. *J. Clin. Pathol.* 43:630-2
- Kaiserling E, Horny HP, Engst U, Walz R (1989) Immunohistology for quantification of normal bone marrow lymphocyte subsets. *Br. J. Haematol.* 72:576-577

Kaufmann O, Flath B, Späth-Schwalbe E, Possinger K, Dietel M (1997) Immunohistochemical detection of CD5 with monoclonal antibody 4C7 on paraffin sections. *Am. J. Clin. Pathol.* 108 (6): 669-73

Kußwetter K (Dissertation in Vorbereitung) Reaktive und neoplastische B-Zellen im menschlichen Knochenmark: Immunhistochemische und morphometrische Messungen mit dem monoklonalen Antikörper CD20.

Kluin PM, van-Krieken JH, Kleiverda K, Kluin-Nelemans HC (1990) Discordant morphologic characteristics of B-cell lymphomas in bone marrow and lymph node biopsies. *Am. J. Clin. Pathol.* 94:59-66

Knowles DM (1989) Immunophenotypic and antigen receptor gene rearrangement analysis in T-cell neoplasia. *Am. J. Pathol.* 134(4): 761-85

Kroeber SM, Horny H-P, Greschniok A, Kaiserling E (1999) Reactive and neoplastic lymphocytes in human bone marrow: morphological, immunohistological, and molecular biological investigations on biopsy specimens. *J. Clin. Pathol.* 52:0-5

Kurtin PJ (1998) Mantle cell lymphoma. *Adv. Anat. Pathol.* 5(6): 376-98

Lai HS, Tien HF, Hsieh HC, Chen Yc, Su IJ, Wang CH, Liu MC, Cheng AL, Shen MC, Liu CH (1989) Bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphoma. *Taiwan I. Hsueh. Hui. Tsa. Chih.* 88:114-21

Lamberthegni-Delilieri G, Annaloro C, Soligo D, Oriani A, Pozzoli E, Quirici N, Luksch R, Polli EE (1992) Incidence and histological features of bone marrow involvement in malignant lymphomas. *Ann. Hematol.* 65(2): 61-5

Ledbetter JA, Evans RL, Lipinski M, et al. (1981) Evolutionary conservation of surface molecules that distinguish T-lymphocyte helper/ inducer and cytotoxic/suppressor subpopulations in mouse and man. *J. Exp. Med.* 153:310

Lennert K, Feller AC (1992) Histopathology of non-Hodgkin's lymphomas based on the updated Kiel classification. ed 2, Springer Verlag

Loyson SA, Rademakers LH, Joling P, Vroom TM, Van den Tweel JG (1997) Immunohistochemical analysis of decalcified paraffin-embedded human bone marrow biopsies with emphasis on MHC class I and CD34 expression. *Histopathology* 31 (5): 412-9

McKenna RW, Hernandez JA (1988) Bone marrow in malignant lymphoma. *Haematol.Oncol.* 2: 617-35

Macon WR, Sallhany KE (1998) T-cell subset analysis of peripheral T-cell lymphomas by paraffin section immunohistology and correlation of CD4/CD8 results with flow cytometry. *Am. J. Clin. Pathol.* 109(5): 610-7

Macon WR, Salhany KE (1998) T-cell subset analysis of peripheral T-cell lymphomas by paraffin section immunohistology and correlation of CD4/CD8 results with flow cytometry *Am J. Clin. Pathol.* 109(5): 610-7

National Cancer Institutes sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphoma (1982) Summary and description of a working formulation for clinical usage. The non-Hodgkin's lymphoma pathologic classification project. *Cancer* 49:2112

Navone R, Pich A, Fiammotto M, Magagni C (1992) Bone marrow histopathology and prognosis in malignant lymphomas. *Tumori.* 78(3): 176-80

Navone R, Valpreda M, Pich A (1985) Lymphoid nodules and nodular lymphoid hyperplasia in bone marrow biopsies. *Acta. Haematol.* 74:19-22

Picker LJ, Weiss LM, Medeiros LJ (1987) Immunophenotypic criteria for the diagnosis of non-Hodgkin's lymphomas. *Am. J. Pathol.* 75: 816-21

Pileri SA, Roncador G, Ceccarelli C, Piccioli M, Sabattini E, Briskomatis A, Santini D, Leone O, Piccaluga PP, Leoncini L, Falini B (1997) Immunohistochemistry of bone marrow biopsy. *Leuk. Lymphoma* 26 Suppl. 1: 69-75

Porwit-MacDonald A, Bjorklund E, Lucio P, van Lochem EG, Mazur J, Parreira A, Van den Beemd MW, van Wering ER, Baars E, Gaipa G, Biondi A, Ciudad J, Van Dongen JJ, San Miguel JF, Orfao A (2000) BIOMED-1 concerted action report: Flow cytometric characterization of CD7+ cell subsets in normal bone marrow as a basis for the diagnosis and follow up of T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia* 14(5): 816-25

Ramasamy I, Brisco M, Morley A (1992) Improved PCR method for detecting monoclonal immunoglobulin heavy chain rearrangement in B cell neoplasms. *J. Clin. Pathol.* 45: 770-5

Ruck P, Horny HP, Xiao JC, Bajinski R, Kaiserling E (1994) Diffuse sinusoidal hemangiomatosis of the splen. A case report with enzyme –histochemical, immunohistochemical, and electron microscopic findings. *Pathol. Res. Pract.* 190:708-14

Salisbury JR, Deverell MH, Seaton JM, Cookson MJ (1997) Three-dimensional reconstruction of non- Hodgkins's lymphoma in bone marrow trephines. *J. Pathol.* 181(4): 451-4

Schmid C, Isaacson PG (1992) Bone marrow trephine biopsie in lymphoproliferative disease. *J. Clin. Pathol.* 45:745-50

Schmidt-Wolf IG, Dejbakhsh-Jones S, Ginzton N, Greenberg P, Strober S (1992) T-cell subsets and suppressor cells in human bone marrow *Blood* 80(12): 3242-50

Scott C, Limbert H, Mackarill I, Roberts B (1985) Membrane phenotypic studies in B-cell lymphoproliferative disorders. *J. Clin. Pathol.* 38: 995-1001

Shin SS, Sheibani K, Kezirian J, Nademanee A, Forman SJ, Lee SK, Winberg CD (1992) Immunoarchitecture of normal human bone marrow: A study on frozen and fixed tissue. *Hum. Pathol.* 23 (6): 686-94

Singh N, Wright DH (1997) The value of immunochemistry on paraffin wax embedded tissue sections in the differentiation of small lymphocytic and mantle cell lymphomas. *J. Clin. Pathol.* 50 (1): 16-21

Spier CM, Grogan, TM, Fielder K, et al. (1986) Immunophenotypes in "well-differentiated" lymphoproliferative disorders, with emphasis on small lymphocytic lymphoma. *Hum. Pathol.* 17:1126

Stansfeld AG (1987) Non-Hodgkin's Lymphomas: Low-grade B-Cell lymphomas. in: Stansfeld AG (Hrsg.): *Lymph node biopsy interpretation*, 228-276
Churchill Livingstone, Edinburgh

Stansfeld AG, Diebold J, Noel H, Kapanci Y, Rilke F, Kelenyi G, Sundstrom C, Lennert K, van Unnick JA, Mioduszewska O, et al. (1988) Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet* Feb 6; 1(8580):292-3

Stein RS, Ultmann JE, Byrne GE jr., Moran GM, Golomb HM, Oetzel N (1976) Bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphoma: implications for staging and therapy. *Cancer* 37:629-36

Thaler J, Denz H, Gattringer H, Gassl H, Lechleitner M, Dietze O, Huber H (1987) Diagnostic and prognostic value of immunohistological bone marrow examination: Results in 212 patients with lymphoproliferative disorders. *Blut* 54: 213-222

Thaler J, Greil R, Dietze O, Huber H (1989) Immunohistology for quantification of normal bone marrow lymphocyte subsets. *Br. J. Haematol.* 71:313-21

Thiele J (1995) Die Differentialdiagnose "lymphoider Zellinfiltrate" im Knochenmark. *Pathologie* 16(2): 106-19

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(4):294-300

Watson P, Wood KM, Lodge A, McIntosh GG, Milton I, Piggott MH, Proctor SJ, Taylor PR, Smith S, Jack F, Bell H, Steward M, Anderson JJ, Horne CHW, Angus B (2000) Monoclonal antibodies recognizing CD5, CD10 and CD23 in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: production and assessment of their value in the diagnosis of small B-cell lymphoma. *Histopathology* 36,145-150

Weiss LM, Crabtree GS, Rouse RV (1985) Morphologic and immunologic characterization of 50 peripheral T-cell lymphomas. *Am. J. Pathol.* 118: 316-24

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. H.-P. Horny danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Betreuung.

Frau Dr. A. Greschniok danke ich besonders für die außergewöhnlich gute Betreuung, ihre konstruktive Kritik, ihren Humor und die stetige Ermutigung.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Pathologie danke ich für die sympathische und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Frau E. Schröder vom ZMF Derendingen bin ich für ihre Einführung und Unterstützung in der Benutzung des Quantimet Bildanalyseystems dankbar.

Meinen Vorgängerinnen Frau Verena Dauenhauer und Katrin Küßwetter danke ich für die Erlaubnis zum Einbezug ihrer Daten in meine Ergebnisauswertung.

Herrn Florian Schenk und Volker Jahns danke ich für ihre Hilfe beim Einscannen und Ausdrucken der Bilder.

Meinen Eltern danke ich besonders herzlich für die treue und tatkräftige Unterstützung während meines Studiums. Meiner ganzen Familie danke ich für die Ermutigung zum "Dranbleiben" und ihr liebevolles Interesse.

Allen meine Freunden ein herzliches Dankeschön, Ihr habt mir in verschiedenster Weise sehr geholfen.

Insbesondere danke ich meinen Mitbewohnern Karen Wulf, Christine Leiler und Dorothea Reber sowie auch Wilfried Dolderer für Eure Hilfe und Ermutigung bei Computer- und anderen Problemen. Herzlichen Dank auch Patrizia Hoffmann für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ich danke Astrud Lang, Michael Tappe, Simone Pauly, Tanja Herckelrath, Selina Böhm und allen Freunden aus der Semestergruppe und von Campus für Christus Tübingen, dass Ihr mich immer wieder neu motiviert habt. Danke auch Dr. Alexander Kugler, Dr. Cornelia Taut, Dr. Günther Slesak, Dr. Gerhard Slesak und Dr. Andreas Weidling, dass Ihr die Erfahrungen von Freud und Leid Eurer eigenen Dissertationen mit mir geteilt habt.

Vor allem bedanke ich mich bei Gott, der mich für diesen Studienweg ausgestattet hat, der mich treu weiterführt und dessen Liebe meinem Leben Ziel und Sinn gibt.

Lebenslauf

Name: Cornelia Jüngst
Geboren: 29. März 1976 in Karlsruhe
Eltern: Dr. Wolfgang Jüngst, Physiker
Irene Jüngst, geb. Buchner, Drogistin

Schulbildung: 1982 – 1986 Grundschule Grünwinkel, Karlsruhe
1986 – 1995 Humboldt Gymnasium, Karlsruhe

Freiwilliges Soziales Jahr: 09/1995 - 06/1996 FSJ im Altenheim Maison Blanche
Beaucourt, Frankreich

Studium: 10/1996 – 03/1997 Geschichte und Romanistik an der
Eberhard-Karls-Universität
in Tübingen

04/1997 – 03/1998 Humanmedizin an der
Friedrich-Alexander-Universität
in Erlangen-Nürnberg

seit 04/1998 Humanmedizin an der
Eberhard-Karls-Universität
in Tübingen

03/1999 Ärztliche Vorprüfung

03/2000 Erstes Staatsexamen
03/2001 Zweites Staatsexamen
Auslanddssemester Ecuador
04/11/2003 Drittes Staatsexamen

Famulaturen: 1999 Allgemeinchirurgie,
Kreiskrankenhaus Husum

2000 Deutsche Christliche Ambulanz,
Tirana, Albanien

2001 Anästhesie,
Universitätsklinik Tübingen

Pädiatrie,
Kreiskrankenhaus Reutlingen

Kardiologische Ambulanz,
Universitätsklinik Tübingen

