

Aus dem Zentrum für Pathologie der Universität zu Köln
Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H. P. Dienes

**Progression der Myelofibrose und ihre Beziehung zur
Makrophagenpopulation im Knochenmark bei der Primären Myelofibrose
(PMF)**

-
**Eine histochemische und morphologische Studie
an Sequenzbiopsien bei 79 Patienten**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Barbara Böltken
aus Köln

promoviert am 03. Februar 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln
im Jahr 2010

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Daten wurden nach Anleitung von Prof. Dr. J. Thiele und Prof. Dr. H.-M. Kvasnicka mit den beschriebene Methoden durch mich im Zentrum für Pathologie, Universität Köln, ermittelt und ausgewertet.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. J. Thiele für die freundliche Überlassung des Themas, und dass ich den Grundstein für die vorliegende Arbeit unter seiner Anleitung und Aufsicht legen konnte. Herrn Prof. Dr. H.-M. Kvasnicka bin ich besonderen Dank schuldig, da er mir bis zur Beendigung seine Unterstützung zukommen ließ.

Ansonsten danke ich Alex. Ohne Dich hätte ich es nicht geschafft.

Meinen Eltern und meiner Schwester

Inhaltsverzeichnis

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	VI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Allgemeine Anmerkungen zum Monozyten-Makrophagen-System (MMS) im Knochenmark.....	5
1.1.1 Differenzierungsschritte des Monozyten-Makrophagen-Systems	5
1.1.2 Aufgaben des Monozyten-Makrophagen-Systems.....	6
1.1.3 Aktivierte Makrophagen	7
1.1.4 Zelluläre Interaktion der Makrophagen	8
1.1.5 Bedeutung des Monozyten-Makrophagen-Systems bei den myeloproliferativen Neoplasien (MPN)	9
1.1.6 Funktionelle Beziehungen zur Erythropoese	10
1.2 Evolution und Progression des Krankheitsbildes der Primären Myelofibrose	13
1.2.1 Epidemiologie	13
1.2.2 Klinische Befunde.....	13
1.2.3 Hämatologische Befunde	16
1.2.4 Histopathologische Befunde	19
1.3 Molekulopathologische Entwicklungen in der Diagnostik der myeloproliferativen Neoplasien: Jak 2	22
1.4 WHO-Klassifikation 2008 für PMF.....	24
1.5 Graduierung der Knochenmarksfibrose und des Zellgehaltes nach dem Europäischen Konsens 2005	26
1.6 Entwicklung der Knochenmarksfibrose	27
1.6.1 Beziehung der Megakaryozyten zur Fibrogenese	28
1.6.2 Einflussnahme des Monozyten-Makrophagen-Systems auf die Fibrogenese.....	29
1.7 Fragestellung der Arbeit.....	31
2 MATERIAL UND METHODEN	32
2.1 Übersicht über das Patientengut.....	32
2.1.1 Klinische Daten zu verschiedenen Messzeitpunkten	33
2.1.2 Beckenkammbiopsien	33
2.2 Morphometrische Methode	36
2.2.1 Fasermessung.....	36
2.2.2 Myelofibrose Progressions Index (MPI).....	37
2.2.3 Quantifizierung der Makrophagen	37
2.3 Zur Problematik sogenannter aktivierter Makrophagen	39
2.4 Methoden zur Quantifizierung der Faserdichte im Knochenmark.....	40
2.5 Statistische Auswertung	42
3 ERGEBNISSE.....	43
3.1 Klinische Daten.....	43
3.2 Übersicht über das Knochenmark bei der Primären Myelofibrose.....	46
3.3 Faserentwicklung bei Sequenzbiopsien.....	48
3.3.1 Dynamik der Fibrogenese	50
3.3.2 Agyrophilie (retikulär-kollagene Fasern).....	51
3.4 Frequenz der Makrophagen im Knochenmark	52
3.5 Bezug der Makrophagenpopulation zur Faserentwicklung	54
4 DISKUSSION.....	55
4.1 Diagnose der Frühstadien der Primären Myelofibrose.....	55
4.2 Faserentwicklung und Krankheitsverlauf bei der Primären Myelofibrose	57
4.3 Makrophagenanzahl bei der Primären Myelofibrose.....	59
5 ZUSAMMENFASSUNG	61
6 LITERATURVERZEICHNIS	62
7 ERKLÄRUNG ZUR VORABVERÖFFENTLICHUNG VON ERGEBNISSEN.....	78
8 LEBENS LAUF.....	79

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

α -IFN	α -Interferon (Leukozyten-IFN)
ALP	alkalische Leukozytenphosphatase
AMS	advanced myelosclerosis fortgeschrittene Myelosklerose
AMS.BS	advanced myelosclerosis plus bone sclerosis fortgeschrittene Myelosklerose mit Osteosklerose
AP	alkalische Phosphatase
β -IFN	β -Interferon (Fibroblasten IFN)
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia
CFU-GM	colony forming unit granulocyte macrophage
CMGM	chronic megakaryocytic granulocytic myelosis chronisch megakaryozytär-granulozytäre Myelose
CML	chronische myeloische Leukämie
CMPD	chronic myeloproliferative disorders chronische myeloproliferative Erkrankungen
CSF	colony stimulating factor
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECGF	endothelial cell growth factor
ECM	extracellular matrix extrazelluläre Matrix
EGF	epidermal growth factor
EI	erythroblastische Inseln
EMS	early myelosclerosis frühe Myelosklerose
EPO	Erythropoetin
ET	essentielle Thrombozythämie
G-6-PD	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
λ -IFN	λ -Interferon (Immun-IFN)
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
GVHD	graft versus host disease
HLA	human leukocyte antigens

IL	Interleukin
IMF	idiopathische Myelofibrose
JAK	Janus Kinase
LDH	Laktatdehydrogenase
MCP	monocyte chemoattractant
M-CSF	monocyte colony stimulating factor
MHC	major histocompatibility complex
MPI	Myelofibrose Progressions Index
MPN	Myeloproliferative Neoplasien
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PAS	Perjodsäure-Schiff
PDGF	Platelet derived growth factor
PMF	Primäre Myelofibrose
PV	Polyzythämia vera rubra
PVSG	Polycythemia Vera Study Group
RER	Raues Endoplasmatisches Retikulum
SCT	stem cell transplantation Stammzelltransplantation
TBS	tris-buffered-saline
TGF	transforming growth factor
TIMPs	tissues inhibitors of metalloproteinases
TNF	Tumornekrosefaktor

1 Einleitung

Als Myelofibrose (MF) bezeichnet man im Allgemeinen die Zunahme der Fasern im Knochenmark. Zu dieser Verfaserung kommt es im Rahmen verschiedener Krankheitsbilder. Es ergeben sich je nach Ursprung Unterschiede der Qualität (retikuline und kollagene Fasern), der Quantität und dem Grad der Progression der Myelofibrose. Ursachen für die MF können reaktiv (autoimmunbedingt, toxisch), osteopathisch (Vitamin D-Mangel, Osteopetrose), infektiös (Tbc, AIDS) aber auch neoplastisch bedingt sein. Die MF ist hierbei stets eine begleitende Reaktion der Knochenmarksfibroblasten auf eine andere zugrunde liegende Störung. Die Fibrogenese wird dabei zytokinvermittelt induziert.

Die Primäre Myelofibrose (PMF) ist, anders als die Bezeichnung „primär“ vermuten läßt, eine neoplastische Knochenmarkserkrankung mit ebenso induzierter MF. Sie wird in der neuen WHO-Klassifikation 2008 für myeloische Neoplasien in die Gruppe der myeloproliferativen Neoplasien (MPN), zu denen unter anderen die chronische myeloische Leukämie (CML), die essentielle Thrombozythämie (ET) und die Polyzythämia vera rubra (PV) gehören, eingeordnet. In den früheren Klassifikationen wurde diese Gruppe als chronische myeloproliferative Erkrankungen (CMPD) bezeichnet, die PMF als idiopathische Myelofibrose (IMF).

Einzelne Mitglieder der Gruppe der MPNs können gerade in den Anfangsstadien der Erkrankung auch mit einer MF einhergehen und zeigen damit ähnliche klinische Befunde, was deren Differenzierung erschwert. Bereits Dameshek wies auf die Möglichkeit der Übergänge zwischen den einzelnen Formen der MPN hin [37] und damit auf die Probleme, die verschiedenen Krankheitsbilder klar voneinander zu trennen. Bei der CML kommt es in bis zu 26% zu einer MF [57, 198, 200]. Silverstein berichtet über etwa ein Sechstel seiner PV Patienten, die myelofibrotische Veränderungen entwickelten und bezeichnete diese als postpolyzythämische myeloische Metaplasie [173]. Es besteht aber kein Zweifel an der Eigenständigkeit der PMF im Rahmen der MPN.

Die ersten PMF-Fälle wurden 1879 von Heuck erwähnt, der von zwei Leukämie-Patienten mit sklerotischen Veränderungen am Knochen und extramedullärer Blutbildung berichtete [80]. Seitdem wurden über 30 verschiedene Bezeichnungen in der Literatur verwendet. Begriffe wie „agnogenische myeloische Metaplasie“, „Myelofibrose“, „Osteomyelofibrose“, „osteosklerotische Anämie“, „osteosklerotische

Leukämie”, ”myeloische splenale Anämie”, ”megakaryozytäre Splenomegalie”, ”Myelofibrose mit myeloischer Metaplasie” oder ”chronische megakaryozytäre granulozytäre Myelose” spiegeln die Vielfalt der Synonyme wieder [54, 58, 121, 180, 229].

Die PMF gilt als myeloproliferative Erkrankung mit Verfaserung bzw. im fortgeschrittenen Stadium Sklerosierung des Knochenmarks [1, 229]. Es liegt ursächlich ein klonaler Stammzelldefekt vor. Fibrosierung und Sklerose entstehen sekundär. Es ließ sich nachweisen, dass die Fibroblasten polyklonal sind und damit nicht direkt mit dem klonalen Stammzelldefekt in Verbindung stehen [62, 84, 237]. Im Gegensatz zu den anderen MPN tritt bei der PMF die Verfaserung obligat auf.

Auf die genauen Diagnosekriterien und die Abgrenzung zu den anderen Krankheitsbildern wird später genauer eingegangen. Die Differenzierung ist von großer Bedeutung, weil die Prognosen sich erheblich unterscheiden und die Patienten anderen Therapien zugeführt werden. Die Prognose der PMF ist im Vergleich zu der der anderen MPN eher schlecht [32, 168]. Es besteht generell eine Reduktion der Lebenserwartung [109, 232] und die mittlere Überlebenszeit beträgt etwa 9,3 – 11,9 Jahre [110].

Die PMF-Patienten können verschiedenen Risikogruppen mit deutlich anderer Prognose zugeordnet werden. Die Patienten mit dem geringsten Risiko zeichnen sich durch jüngeres Alter, nur geringe Anämie und normale Leukozytenwerte aus. Patienten dieser Gruppe haben eine mehr als achtfach höhere Lebenserwartung als diejenigen der Hochrisikogruppe (Alter > 70J. Thrombozyten < $300 \times 10^9/l$ bzw. Thrombozyten > $300 \times 10^9/l$ und gleichzeitig Leukozyten > $20 \times 10^9/l$).

Die Behandlung verläuft je nach Stadium der Erkrankung verschieden. In frühen Stadien ohne Fibrose und guten Prognosefaktoren wird zunächst nur beobachtet, während in klassischen Fällen mit schlechten Prognosefaktoren auch Stammzelltransplantationen (SCT) vorgenommen werden [138].

Nach allogenen SCT entwickeln relativ viele PMF-Patienten eine ausgeprägte ”graft versus host disease” (GVHD), welches an dem relativ hohem Alter der Patienten zu liegen scheint [67]. Nachweislich ist der am meisten signifikante Prognosefaktor im Rahmen einer allogenen SCT das Alter der Patienten. So sank in einer Studie die Überlebensraten von 62% bei Patienten unter 45 Jahren auf 14% bei Patienten über 45 Jahre [68]. Daher scheint es sinnvoll, diese Behandlung vergleichsweise jungen Patienten mit einer schlechten Prognose und geeigneten Spendern zukommen zu lassen [31, 43, 180]. Neuere klinische Studien untersuchen die Möglichkeit einer allogenen

SCT mit dosisreduzierter Chemotherapie ohne Knochenmarksablation [106, 167]. Auch diese Therapie ist durchaus wirksam und erscheint eine Option insbesondere für ältere Patienten zu sein.

Auch autologe Stammzelltransplantationen werden, unter der Vorstellung den Entwicklungsprozess von Fibrose und myeloischer Metaplasie bis zum erneuten Ausbruch der Erkrankung zu unterbrechen, durchgeführt [5]. Es zeigt sich bei vielen Patienten eine klinische Antwort durch Verminderung der Symptome wie Reduktion der Milzgröße, Regression der Knochenmarksfibrosierung oder durch Bedarf weniger Erythrozyten-Transfusionen. Eine dauerhaft Heilung durch eine autologe Stammzelltransplantation erscheint aber eher unwahrscheinlich [105].

Bei massiver Splenomegalie mit rezidivierenden Infarkten, vermehrten Transfusionen, die durch das Hyperspleniesyndrom bedingt sind, Milzruptur und portaler Hypertension kann die Splenektomie erforderlich sein [14]. Bestrahlung wird vor allem bei peritonealer, pleuraler und zentral nervöser Metaplasie eingesetzt [119]. Sie stellt aber keine wirkliche Alternative zur Splenektomie dar, da es häufig zu Panzytopenien kommt und insgesamt die Mortalität bei 13% liegt [45].

Zu medikamentöser Behandlung der Zytopenie stehen mehrere Substanzen zur Verfügung. Zur Behandlung der Anämie wird zum Beispiel Erythropoetin (EPO) eingesetzt. EPO scheint aber nur bei den Patienten mit Anämie und erniedrigten EPO-Konzentrationen zur Verlängerung der Transfusionsintervalle zu führen [30]. Auch eine Androgentherapie hat sich in der Behandlung der Anämie bewährt [18]. Am meisten scheinen bei dieser Therapie die Patienten mit einer noch nicht transfusionspflichtigen Anämie zu profitieren [29]. Etanercept ist ein Antagonist des TNF- α , welcher im Rahmen der PMF mit der Zytopenie in Verbindung gebracht wird. In 20% der Fälle ergab sich unter einer Therapie mit Etanercept eine Reduktion der Anämie bzw. der Splenomegalie [177].

Ein anderer Ansatz ist die Suppression der Myeloproliferation. Hydroxyharnstoff ist das am meisten eingesetzte Chemotherapeutikum. Es reduziert unspezifisch die Myeloproliferation. Klinisch führt es zur Reduktion der Splenomegalie, der Leukozyten- und Plättchenzahl und in einigen Fällen auch zum Anstieg des Hämoglobins [122]. Es kann aber auch zu einer Zunahme einer Anämie führen und sollte dann mit einer EPO-Therapie kombiniert werden. Vitamin D-Analoga zeigen hemmende Eigenschaften auf die klonale Proliferation und die Kollagenbildung der Fibroblasten [38]. Sie haben die an sie gesetzten Erwartungen aber nicht erfüllt, da die Fibrosierung unter Therapie keine

Veränderungen aufzeigt [13]. Eine Therapie mit α -Interferon kann bei CML und PV zur Remission und in der PMF zur Unterdrückung der pluripotenten und linienspezifische Vorläuferzellen führen [28]. Außerdem wirkt es als Antagonist zu PDGF (platelet derived growth factor) und unterdrückt die unreifen Fibroblasten in Knochenmark. Die Ergebnisse der Behandlung bei PMF sind aber enttäuschend [79, 182].

Thalidomid ist durch Hemmung von Zytokinen immunmodulatorisch wirksam und erreicht damit eine positive Wirkung auf die Anämie, Thrombozytopenie und Splenomegalie [15]. Pirfenidon ist ein Inhibitor von PDGF, TNF- α und TGF- β und wurde in einer prospektiven Studie getestet. Es ergab sich keine signifikante Verbesserung der klinischen Symptome der PMF [136].

Ein neuer therapeutischer Ansatz ergibt sich durch die Entdeckung der Jak2-Mutation (siehe Kapitel 1.3) bei 50% PMF-Patienten. Es werden schon mehrere Substanzen getestet. Es liegen aber noch keine klinischen Studien vor.

1.1 Allgemeine Anmerkungen zum Monozyten-Makrophagen-System (MMS) im Knochenmark

1.1.1 Differenzierungsschritte des Monozyten-Makrophagen-Systems

Aschoff beschrieb 1924 das "retikulo-endotheliale System", zu dem er die histiozytären Retikulumzellen und bestimmte Gefäßwandzellen (z.B. Kupffer-Sternzellen der Leber) rechnete. Er hielt diese phagozytierenden Zellen für spezielle Endothelzellen. Später stellte sich heraus, dass es sich um perivaskuläre Makrophagen handelt. So ist der Begriff des "retikulo-endothelialen Systems" nicht mehr korrekt.

Heute spricht man vom Monozyten-Makrophagen-System und versteht darunter Promyelozyten und ihre Vorläuferzellen im Knochenmark, die Monozyten des Blutes und die gewebsständigen Makrophagen [227]. Alle diese Zellen haben als gemeinsamen Ursprung CD34⁺ Stammzellen im Knochenmark, welche unter Anwesenheit von GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) und M-CSF (monocyte colony stimulating factor) zu Monozyten ausdifferenzieren. Im Gewebe reifen diese zu Makrophagen aus. Die CSF-Glykoproteinhormone werden von Lymphozyten und Fibroblasten sezerniert [66].

Als erste histologisch identifizierbare Vorläuferzelle entwickelt sich über die in ihren Differenzierungsmöglichkeiten bereits eingeschränkten myeloischen Vorläuferzelle CFU-GM (colony forming unit granulocyte macrophage), der Monoblast. Er ist im Durchschnitt 10-12 µm groß und hat ein basophiles Zytoplasma, welches leicht granuliert ist. Die weitere Entwicklung führt zu Promyelozyten, großen Zellen (bis zu 18 µm Durchmesser) mit basophilem Zytoplasma und einem großen, seitlich eingestülpten Kern. Das Chromatin ist aufgelockert und die Nukleoli sind deutlich sichtbar. Van Furth wies nach, dass aus einem Monoblasten zwei Promyelozyten entstehen, jeder von diesen entwickelt sich zu weiteren zwei Monozyten. Vier dieser Zellen gehen also aus einem Monoblasten hervor [224]. Monozyten haben nach der Reifung kein Proliferationspotential mehr. Die Zeit, die der Reifungsvorgang vom ersten monozytären Vorläufer bis zum reifen Monozyten in Anspruch nimmt, wird auf 6 Tage geschätzt [62, 66]. Im Zytoplasma der noch im Knochenmark gespeicherten Monozyten kommt viel RER (Rauhes Endoplasmatisches Retikulum) und ein großer Golgi-Apparat vor, der dichte Granula bildet. Hierbei handelt es sich um primäre Lysosomen, die als zarte azurophile Granula in Erscheinung treten. Innerhalb von 24 Stunden nach der

Reifung verlassen die Monozyten das Knochenmark und gelangen in das periphere Blut und damit in den Blutkreislauf.

In Abhängigkeit von lokalen Reizen wandern die Blutmonozyten in das umgebende Gewebe ein und differenzieren sich zu Makrophagen. Die Anzahl der Lysosomen und Mitochondrien nimmt zu, und je nach Art des Gewebes erhält der Makrophage eine bestimmte Morphologie und Funktion. Auf diese Weise entstehen z.B. in der Leber Kupffer-Stern-Zellen, in der Lunge die Alveolarmakrophagen, im Knochen die Osteoklasten und nicht zuletzt die Makrophagen in den lymphatischen Organen (Knochenmark, Milz, Leber und Lymphknoten). Wie Monozyten haben Makrophagen keine Proliferationskapazität und können das Gewebe nicht mehr verlassen [224, 226]. Als gewebständiger Histozyt hat diese Zelle eine Überlebenszeit von mehreren Monaten, während die Halbwertszeit im Blut nur etwa drei Tage beträgt. Da Makrophagen unter physiologischen Bedingungen weder DNS synthetisieren noch mitotisch aktiv sind, erfolgt eine Erneuerung ihrer Population nur durch Zuwanderung von Monozyten aus dem peripheren Blut [225].

1.1.2 Aufgaben des Monozyten-Makrophagen-Systems

Alle Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems gehören einem physiologischen System an, welches im menschlichen Körper verschiedene Aufgaben übernimmt. Zu diesen Aufgaben gehört zum Beispiel die Wundheilung, Fibrosebildung, Tumorabwehr, der Abbau von überalterten Erythrozyten und anderen hämatopoetischen Zellen in der Milz, die Erhaltung der Homöostase im Blut und die Vermittlung von Entzündungsreaktionen. Zu diesem Zweck verfügt der Makrophage neben seiner Fähigkeit zur Diapedese und Phagozytose über vielfältige Reaktionsmechanismen als Antwort auf immunmodulatorische Stimuli. Dazu gehören Eigenschaften wie Chemotaxis, Adhäsion, Zytotoxizität, Antigenpräsentation und die Produktion von Zytokinen [165]. Bei Entzündungen steigert das Knochenmark die Bildung von Monozyten, deren Freisetzung in das Blut und die Extravasation in das entzündete Gewebe. Monozyten wandern selektiv in den Entzündungsfokus ein. Dies ist die Folge der lokalen Stimulation durch Zytokine wie M-CSF, GM-CSF, MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), TNF (Tumornekrosefaktor) oder TGF- β (transforming growth factor- β). Insbesondere MCP-1 besitzt ein hohes Potential zur Induktion der Monozyteninfiltration [247]. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Monozyten werden nicht alle von jeder einzelnen Zelle wahrgenommen sondern unterliegen in ihrer

Ausprägung einer beträchtlichen Variabilität. Die funktionelle Heterogenität der Makrophagen ist durch ihren Differenzierungs- und Aktivitätsgrad bedingt [242].

1.1.3 Aktivierte Makrophagen

Die Differenzierung beschreitet den oben beschriebenen Entwicklungsprozeß, der durch Wachstumsfaktoren gesteuert wird und irreversibel ist [139]. Die Aktivierung jedoch ist reversibel und beruht auf qualitativen und quantitativen Veränderungen in der Expression von Botenstoffen, die den Makrophagen befähigen, seine Funktionen schneller und effektiver auszuführen [88]. So wird die Präsentation von Antigenen angeregt, die zytolytischen und zytotoxischen Eigenschaften zur Vernichtung von Keimen oder Tumorzellen erworben und größere Mengen an Entzündungsmediatoren und reaktiven Sauerstoffprodukten gebildet und freigesetzt. Die aktivierte Zelle ist größer, zeigt eine verstärkte Riffelung der Basalmembran, vermehrte Pseudopodienentwicklung, eine erhöhte Anzahl der zur Pinozytose befähigten Vesikel und hat einen wesentlich höheren Sauerstoffverbrauch als ruhende Makrophagen [89]. Dieses Konzept des "aktivierten Makrophagen" beruht außerdem auf der Beobachtung, dass Makrophagen, die fakultativ pathogene Keime bekämpft haben, auch eine Vielzahl anderer Mikroorganismen besser abwehren können [145].

Die wichtigste Rolle der Makrophagen in der unspezifischen Immunabwehr liegt in der Zerstörung von Mikroorganismen und entstandenen Tumorzellen [143]. Die unspezifischen Mechanismen sind im Gegensatz zum spezifischen System bereits bei der Geburt voll ausgeprägt [92]. Zu dem zellulären unspezifischen System gehören neben den Makrophagen die Granulozyten sowie die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Zu den humoralen Komponenten dieses Systems zählen u.a. das Lysozym, das C-reaktive Protein und die Interferone. Lysozym wird von Phagozyten (Makrophagen und neutrophilen Granulozyten) abgegeben und ist ein Enzym, das Polysaccharide von Bakterienwänden hydrolysiert, so dass diese von neutralen Proteasen weiter abgebaut werden können. Das C-reaktive Protein hat seinen Namen von seiner Funktion: es präzipitiert das C-Polysaccharid von Pneumokokken, bindet aber auch an Oberflächenstrukturen vieler anderer Bakterien und Pilze und kennzeichnet diese für das Komplementsystem und die Phagozyten. Durch die Anlage von Komplement wird die Phagozytose erleichtert, so erfolgt zum Beispiel die Aufnahme von mit Fc oder C3 opsonierten Partikel besonders rasch. Zu diesem Zweck besitzen Makrophagen auf ihrer Zelloberfläche spezifische Bindungsstellen für C3a und C5a sowie für das Fc-Fragment

von Immunglobulin G. Außerdem sezernieren Makrophagen selber Komplementfaktoren zur Opsonierung oder direkten Lyse geeigneter Ziele. Für die Verdauung aufgenommener Objekte steht eine Vielzahl von intrazellulären Enzymen zur Verfügung, durch diese werden intra- und extrazelluläre Bakterien, Parasiten und Pilze vernichtet.

Interferone sind Glykoproteine, die von virusinfizierten Zellen gebildet werden und die Virusausbreitung hemmen. Man unterscheidet drei Familien von Interferonen: α -Interferon (Leukozyten-IFN), β -Interferon (Fibroblasten-IFN) und γ -Interferon (Immun-IFN). Virale Infektionen werden vom Monozyten-Makrophagen-System mittels α -IFN bekämpft [50], welches die Virusreplikation hemmt, die lytische Funktionen der natürlichen Killerzellen aktiviert und die Expression von MHC-Molekülen (major histocompatibility complex) moduliert. Da $CD4^+$ zytotoxischen T-Zellen, die für die Viruselimination zuständig sind, nur jene Antigene erkennen, die an MHC-Moleküle gebunden sind, erfolgt die Effektorphase nach α -IFN Einwirkung wesentlich schneller [83]. Immun-Interferon wird u.a. von aktivierten T-Lymphozyten gebildet und ist ein wesentlicher humoraler Faktor bei der Vermittlung von Immunantworten. Somit zählt dieses Interferon zu den Vermittlern zum spezifischen Abwehrsystem.

1.1.4 Zelluläre Interaktion der Makrophagen

Die Makrophagen sind durch ihre vielfältigen Interaktionen mit B- und T-Lymphozyten in die Entwicklung dieses spezifischen Systems eingebunden, welches auf erworbener Immunität beruht. Die Effektorzellen dieses Systems sind die Lymphozyten. Sie erkennen Fremdartigene und bilden als Plasmazellen gegen diese Antikörper. Ein Antikörper erfüllt zwei Funktionen: er neutralisiert mit hoher Spezifität Antigene und aktiviert das unspezifische Immunsystem. Darüber hinaus ist er in der Lage, durch seine Gedächtnisfunktion Antigene in Erinnerung zu behalten. Das spezifische Immunsystem erkennt nicht nur Fremdartigene, die von außen in den Körper eingedrungen sind, sondern auch solche, die im Körper selber entstehen. Das letztere kann bei Neoplasien oder Autoimmunerkrankungen der Fall sein.

Die Hauptaufgabe der Makrophagen liegt hier im Aufspüren von Antigenen, deren Aufnahme und Verarbeitung zu einem löslichen Antigen, welches den T-Zellen in geeigneter Form präsentiert wird [222]. Darüber hinaus sezernieren Makrophagen verschiedene Faktoren, die eine B-Zellproliferation und Antikörperproduktion stimulieren. Die wichtigsten Mediatoren dieser Art sind Interleukin-1 und -6 (IL-1 und

IL-6). T-Lymphozyten setzen γ -Interferon (Immun-IFN) und GM-CSF frei, welches zur oben erwähnten Aktivierung der Makrophagen führt. Die Expression von MHC-Molekülen wird angeregt und damit die Fähigkeit zur Antigenpräsentation erworben [93]. Es kommt auch zur vermehrten Synthese der Monokine TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor) und IL-1 [25]. Diese Mediatoren sind die wirksamsten pro-inflammatorischen Substanzen des Körpers. Es kommt zum Anlocken von neutrophilen Granulozyten, T-Zellen und weiterer Phagozyten an den Ort der Entzündung und zur verstärkten Infektabwehr des Organismus mit Entwicklung des pyogenen Fiebers, Bildung von akute Phase Proteinen und Prostaglandinen, die eine Entzündungsreaktion triggern. Gemeinsam mit den von Makrophagen ausgeschütteten Faktoren TGF- β (transforming growth factor) und PDGF (platelet derived growth factor) unterstützen sie die Fibroblastenproliferation bei Entzündungen oder der Wundheilung.

1.1.5 Bedeutung des Monozyten-Makrophagen-Systems bei den myeloproliferativen Neoplasien (MPN)

Das Monozyten-Makrophagen-System steht mit mehreren Erkrankungen in Verbindung. So ist zum Beispiel beim Diabetes mellitus die Migration und beim systemischen Lupus erythematoses die Phagozytose verringert.

Im Falle der CML finden sich die sogenannten "Pseudo-Gaucher-Zellen" und "Seeblaue-Histiozyten". Bereits 1966 erwähnte Albrecht das Vorhandensein dieser Makrophagen bei der CML. Die "Pseudo-Gaucher-Zellen" sind 20-80 μm große Zellen mit einem blaßblauen, gestreiften Zytoplasma und einem kleinen, exzentrisch gelegenen Kern [3]. Sie sind von großer Bedeutung, da ihre Anwesenheit anscheinend mit einer guten Prognose vergesellschaftet ist [4, 108, 214]. Dies ist auf die gesteigerte phagozytotische Aktivität der Pseudo-Gaucher-Zellen zurückzuführen, durch die es zu einer Reduktion der leukämischen Zellmasse im Knochenmark kommt [95]. Die Frequenz diese Makrophagenpopulation ist umstritten, und die Angaben reichen von 20-70%, wobei chemotherapeutisch behandelte Patienten größere Mengen der Zellen aufweisen [95, 189, 200].

"Seeblaue-Histiozyten" zeichnen sich durch kleine, runde Granula mit einem Durchmesser von 1-3 μm aus [78]. Ihre spezifische Bedeutung bei der CML ist noch weitgehend unbekannt [56].

Betrachtet man die PV hinsichtlich des Monozyten-Makrophagen-Systems, so fällt auf, dass man in der Regel mit der Berliner-Blau-Reaktion keine hämosiderinspeichernden

Makrophagen im Knochenmark nachweisen kann [46]. Nach Einführung der Immunfärbung mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers PG-M₁ [47], der zu der Gruppe der CD68-Antikörper gehört und nicht mit Granulozyten und ihren Vorläuferzellen reagiert, zeigt sich, dass eine erhebliche Differenz zwischen den beiden Färbemethoden besteht. Im normalen Knochenmark zeigen nur etwa 50% der Makrophagen Eisenablagerungen und sind somit mit der Berliner-Blau-Reaktion anfärbbar. Mit PG-M₁ dagegen kann die Gesamtheit der Makrophagen erfasst werden. Anhand von immunmorphometrischen Studien an Stanzbiopsien konnte gezeigt werden, dass im normalen Knochenmark 30 ± 12 Makrophagen pro mm^2 vorkommen [186].

Bei der PMF zeigt sich eine beträchtliche Zunahme der Makrophagenanzahl auf 74 ± 12 mm^2 . Auch die Anzahl der Osteoklasten ist in den fortgeschrittenen Stadien gesteigert [191]. Der Knochenumbau im fibro-osteosklerotischem Stadium der PMF ist im engen Zusammenhang mit den Osteoklasten zu sehen. Der Osteoklast ist 30-100 μm groß, mehrkernig und baut auf enzymatischem Wege den Knochen ab. Seinen Ursprung hat er im Monozyten-Makrophagen-System. Er entwickelt sich innerhalb von drei Tagen nach M-CSF-Einwirkung aus einer unreifen Vorstufe dieser Zellgruppe. Zudem benötigt er zu seiner Differenzierung die Anwesenheit von Knochenmark [221].

1.1.6 Funktionelle Beziehungen zur Erythropoese

Während der Embryonal- und Fetalzeit erfolgt die Blutbildung an verschiedenen Orten. Einige sind nur temporär in Benutzung. Es werden drei verschiedene Phasen unterschieden: die megaloblastische (prähepatische), die hepato-lienale und die medulläre (definitive) Phase, die ab dem 5. Fetalmonat einsetzt. Das Knochenmark ist das einzige Gewebe im menschlichen Körper, das zu einer andauernden Produktion von Blutzellen in der Lage ist. Auch in anderen Geweben kann man hämatopoetische Vorläuferzellen nachweisen, doch findet dort unter physiologischen Bedingungen keine Ausreifung in die verschiedenen Blutzellreihen statt. Experimentelle und klinische Studien anhand von Knochenmarkstransplantationen bestätigen diese Beobachtung [89]. Im Knochenmark werden täglich 2,5 Milliarden rote Blutkörperchen, 1 Milliarde Granulozyten und 2,5 Milliarden Plättchen pro kg Körpergewicht produziert. Die normale Blutbildung findet extravasal statt. Die wachsenden Vorläuferzellen werden in den sinusoidalen Räumen vom Knochenmarksstroma, welches aus Endothelzellen, Fibroblasten, Fettzellen und Makrophagen gebildet wird, umgeben. Die Zellen des Stromas schaffen ein geeignetes Mikromilieu für die Hämatopoese, indem sie die

extrazelluläre Matrix bilden, verschiedene Zytokine ausschütten und durch Adhäsionsmoleküle mit den Vorläuferzellen in Kontakt stehen [176]. Neu gebildete Blutzellen treten schließlich aus den extravaskulären Sinusoiden in das venöse System und damit in den Körperkreislauf ein.

Zu den hämatopoetischen Wachstumsfaktoren gehören die CSF-Glykoproteine, Interleukine (IL), Erythropoetin (EPO) und andere Glykopeptide. Man unterscheidet zwei Gruppen von Wachstumsfaktoren: multifunktionelle, die die Entwicklung von verschiedenen Zellreihen beeinflussen, und linienspezifische mit einem schmalen Spektrum und einer nur auf diese Zellreihe beschränkten Wirksamkeit. Zur ersten Gruppe gehören IL-3 (multi-CSF) und GM-CSF, während G-CSF und EPO linienspezifisch sind. EPO ist verantwortlich für die Reifung der roten Blutkörperchen. Es wird hauptsächlich in der Niere produziert und erreicht das Knochenmark über die Blutbahn. Die Ausschüttung wird über den Sauerstoffbedarf des Körpers reguliert, welcher von sensorischen Zellen der Niere gemessen wird. Das Protein EPO stimuliert verschiedene Mechanismen wie zum Beispiel die Eisenaufnahme, Synthese von Globin, Häm und anderen Strukturproteinen. Der letzte Schritt der Reifung zum Retikulozyten ist EPO-abhängig, ebenso die Freisetzung dieser Zellen aus dem Knochenmark [40, 166]. EPO-Rezeptoren sind auf Proerythroblasten sehr zahlreich und verringern sich im Laufe der Entwicklung bis sie beim Retikulozyten nicht mehr vorhanden sind [149]. Die Erythropoese ist eng mit dem Vorhandensein von Makrophagen verknüpft. Es ist schon lange bekannt, dass Makrophagen in den erythroblastischen Inseln (EI) einen festen Platz einnehmen. Es wurde angenommen, dass sie als "Ammenzellen" fungieren [20]. In der Gegenwart von EPO heften sich die Vorläuferzellen an die Makrophagen und durch den Makrophagen-Erythroblasten-Kontakt werden sie zur Proliferation und Reifung bis zum kernlosen Retikulozyten angeregt [71]. Diese enge Beziehung ließ sich erst vor kurzem auch bei der Neu- bzw. Wiederentstehung von EIs nach allogenen Knochenmarkstransplantationen bei Patienten mit CML sehen. Man konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl von aktivierten BSA-I⁺ Makrophagen und der Menge der erythropoetischen Vorläuferzellen nachweisen. Der enge Kontakt galt nicht nur für die CD68⁺ Makrophagen, sondern auch für Pseudo-Gaucher-Zellen, die besonders in den ersten zwei Monaten nach Transplantation wieder auftraten [195]. Dies konnte in verschiedenen Studien an Mäusen mit Defekt der Granulozyten und Makrophagen oder nach Zerstörung der Makrophagenpopulation gezeigt werden. Hohe EPO-Konzentrationen können die Rolle der Makrophagen ausgleichen [132]. Einige

Ergebnisse deuten darauf hin, dass erythropoetische Vorläuferzellen ohne EPO durch Apoptose untergehen [101]. Koury et al. entwickelten das Konzept der Regulation des programmierten Zelltodes durch EPO [102]. So unterliegen bei niedriger EPO-Konzentration die meisten Vorläuferzellen der Apoptose, während bei hoher Konzentration die Zellen überleben und sich weiter zu Erythrozyten differenzieren. Andere Studien zeigen, dass auch das lokale Mikromilieu eine entscheidende Rolle spielt. Es wird ein Zusammenspiel von Makrophagen und EPO angenommen. Makrophagen verhindern die Apoptose bei geringen EPO-Konzentrationen durch adhäsive Interaktionen und/oder durch lokale EPO-Produktion. Bei Mäusen konnte die EPO-Bildung von Knochenmarks-Makrophagen nachgewiesen werden [233].

Makrophagen regulieren die Erythropoese durch Ausschüttung verschiedener Zytokine wie IL-1, TNF- α , IL-6, IL-12, M-CSF, GM-CSF und TGF- β . Inhibitorische Zytokine wie IL-1, TNF- α und TGF- β werden bei Entzündungen vermehrt gebildet [86] und könnten so zur Infektanämie beitragen. Außerdem hemmen sie zusätzlich die EPO-Produktion in der Niere

1.2 Evolution und Progression des Krankheitsbildes der Primären Myelofibrose

1.2.1 Epidemiologie

Die PMF ist eine Erkrankung des mittleren bis höheren Lebensalters mit einem Gipfel zwischen dem 6. und 7. Lebensjahrzehnt [174]. Jedoch etwa 20% der Patienten sind bei Diagnosestellung jünger als 55 Jahre [31] und es werden auch Fälle bei Kindern beschrieben [125]. Die Inzidenz der PMF liegt bei jährlich 0,5 bis 1,3 pro 100.000 Einwohner [134]. Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Erkrankten liegt bei 1:1 bis 1:2 [53]. Es finden sich ethnische Unterschiede. So gibt es eine Häufung bei den Aschkenasi Juden in nördlichen Israel [33] sowie bei Menschen kaukasischer Abstammung [244]. Farbige dagegen erkranken relativ selten [238]. Es wird eine familiäre Häufung beschrieben und ein autosomal-rezessives Modell der Vererbung entwickelt [21]. In Japan ergab sich eine Vermehrung der PMF-Fälle als Folge der radioaktiven Strahlenbelastung nach den Atombombenexplosionen [6, 244].

1.2.2 Klinische Befunde

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung sind bis zu 70% der PMF-Erkrankten beschwerdefrei [111, 174, 192, 217]. Daher wird die PMF häufig im Rahmen von Routineuntersuchungen entdeckt, in denen klinische und laborchemische Befunde wie eine Splenomegalie, eine Anämie oder ein leukoerythroblastisches Blutbild den Verdacht auf eine hämatologische Erkrankung lenken.

Häufig gehen der Diagnose aber unspezifische Krankheitssymptome wie Müdigkeit, abdominelle Beschwerden, Gewichtsverlust oder Nachtschweiß voraus. Im Durchschnitt dauert diese Phase 2,5 Monate an [111].

In 25% der von Ward und Block untersuchten Patienten verlief eine Splenomegalie von 16 cm unterhalb des Rippenbogen asymptomatische [238]. Bei Diagnosestellung einer PMF weisen bis zu 100% (68-100%) der Untersuchten eine Splenomegalie auf. Eine Vergrößerung der Leber ist in einem geringeren Ausmaß anzutreffen (39-77%) [111, 217].

Verständlicherweise führen diese Befunde zu Abdominalbeschwerden, insbesondere, da Vergrößerungen der Milz bis zu 5 kg erwähnt werden [53]. Auch die Ausdehnung bis in das kleine Becken ist möglich [72]. Schmerzen entstehen durch mechanische

Darmmotilitätsstörungen und durch rezidivierende Perisplenitiden infolge von Infarzierungen und Thrombosen in der Milz [7, 73, 175].

Als Ursache der Vergrößerungen wird die myeloische Metaplasie angenommen, die potentiell in fast allen Organen auftreten kann. Man hat hämatopoetische Zellen z.B. in Lymphknoten, in der Lunge, im Gastrointestinaltrakt (z.B. Ösophagus), im Retroperitonealraum, in der Haut und im ZNS nachweisen können [49, 171]. Dies ist eine mögliche Erklärung für die teilweise sehr gering ausgeprägte Splenomegalie. Aber die Milz bleibt bei der PMF der wichtigste Ort der myeloischen Metaplasie.

Die Annahme, dass die myeloische Metaplasie ein Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Blutbildung bei zunehmender Fibrosierung der Markräume im Knochenmark ist [245], konnte nicht bestätigt werden, denn die Knochenmarksfibrose korreliert nicht mit dem Grad der extramedullären Blutbildung. Sogar im frühen zellreichen Stadium der PMF gibt es Fälle mit Splenomegalie [199].

Die Annahme, dass sich bei der myeloischen Metaplasie die Stammzellen innerhalb der Milz ansiedeln [53] wurde ebenfalls nicht bestätigt. Es fanden sich nur die auch im peripheren Blut vorkommenden leukoerythroblastischen Zellen [243].

1987 entwickelten Wolf und Neiman die Filtrationstheorie. Normalerweise verläuft die Blutbildung extravaskulär. Bei Patienten mit PMF findet in den erweiterten Sinusoiden des Knochenmarks aber intravaskuläre Hämatopoese statt. Die hämatopoetische Vorläuferzellen gelangen in die Blutbahn und werden von der Milz herausgefiltert und gespeichert. Bei Überschreiten der Phagozytosekapazität resultiert eine autonome Hämatopoese in der Milz. Es entsteht die myeloische Metaplasie des Organs [48]. Die Filtrationstheorie wird auch durch die hohe Anzahl der Promegakaryoblasten der Milz bei der PMF unterstützt [193]. Sie deuten auf eine Verlagerung der medullären, zentralen Hämatopoese über den Blutweg in die periphere Milz hin.

Bis zu 8% der Patienten entwickeln Ösophagusvarizen, Aszites oder eine Kombination der beiden Symptome als Ausdruck einer portalen Hypertension [73, 175]. Verschiedene Ursachen kommen hierfür in Frage: die Splenomegalie führt zu einer vermehrten Volumenbelastung [73]; es entsteht eine präsinusoidale Pfortaderthrombose oder ein postsinusoidaler Block im Sinne eines Budd-Chiari-Syndroms [53, 114]. Eine weitere Möglichkeit ist die Entstehung einer Leberzirrhose als Folge einer Transfusionshepatitis [73]. Unabhängig von ihrer Genese führt die portale Hypertension zur Bildung von Aszites. Als weiterer Grund zur Aszitesentstehung wird eine intraperitoneale myeloische Metaplasie diskutiert [94].

Häufig sind auch kardiovaskuläre Probleme mit einer PMF vergesellschaftet [72]. Neben der Anämie und genereller Arteriosklerose sind das erhöhte Plasmavolumen und der gesteigerte Grundumsatz weitere mögliche Ursachen für ein "high output failure". Zusätzlich kann das Perikard durch eine myeloische Metaplasie verändert werden und es so zu einer Herzbeutelamponade mit Herzversagen kommen [70].

Ein weiteres Symptom, das die Patienten angeben sind Knochenschmerzen. Sie gelten aber eher als Spätsymptom im Zusammenhang mit einer blastischen Transformation [53].

1.2.3 Hämatologische Befunde

1.2.3.1 Erythropoese

Bei den meisten Patienten mit PMF besteht beim Zeitpunkt der Diagnose eine Anämie [72, 248]. Es handelt sich um eine normochrome normozytäre Anämie mit Hämoglobinspiegeln um 12 g/dl bei der Frühform und 10 g/dl bei den Spätformen der PMF. Sie ist häufig mit einer Anisozytose bzw. Poikilozytose und dem Auftreten der für die PMF typischen jedoch nicht obligaten tränentropfenförmigen Erythrozyten (Dakryozyten) vergesellschaftet. Deren Ursache wird in der abnormen extramedullären und gestörten medullären Hämatopoese angenommen [212, 248].

In der Regel zeigt sich außerdem ein leukoerythroblastisches Blutbild mit kernhaltigen Vorläuferzellen der roten Zellreihe (z.B. Normoblasten, Erythroblasten) sowie Myeloblasten und Myelozyten im peripheren Blutbild [151, 217, 218, 248].

Die Entstehung der Anämie bei der PMF ist sehr komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt. Als einflussnehmende Faktoren werden Hämodilution, Hämolyse und ineffektive Hämatopoese angesehen. Zur Hämodilution soll es durch die Hypervolämie als Folge der Splenomegalie kommen. Diese führt zu einer Ausdehnung des Plasmavolumens zu Ungunsten des Zellvolumens [144]. Eine verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten wurde in mehreren Studien gezeigt [35, 142, 172]. Die erhöhten Enzymaktivitäten der Laktatdehydrogenase (LDH) und der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PD) im Serum sprechen für einen vermehrten Erythrozytenabbau [199, 248]. Dabei scheint der Abbau in der vergrößerten Milz die wichtigste Ursache zu sein [53, 231]. Zusätzlich können auch Faktoren wie Zellabnormitäten zur gesteigerten Destruktion beitragen [179]. Bei einer kleinen Anzahl von Patienten wiesen ein positiver Coombs Test und erhöhte IgG- und IgM-Konzentrationen im Serum auf eine immunhämolytische Anämie hin [75].

Ferrokinetische Studien legen eine erythropoetische Hypoplasie als einen weiteren Grund für eine Anämie nahe [81]. Auch eine immunhistologische Untersuchung unterstützt diese Annahme und spricht außerdem für einen sekundären Folsäuremangel, der zu einer verlängerten S-Phase des Zellzyklus führt [216].

1.2.3.2 Thrombopoese

Die Anzahl der Thrombozyten im peripheren Blut ist äußerst variabel. Man findet unabhängig vom Krankheitsstadium sowohl exzessiv erhöhte als auch stark erniedrigte

Werte. Im Durchschnitt kann man aber sagen, dass eine Thrombozythämie eher in den frühen zellreichen Stadien ohne fortgeschrittene Myelofibrose anzutreffen ist [210, 212, 218, 248]. In diesen frühen Stadien werden Werte von $798 \pm 508 \times 10^9/l$ erreicht und scheinen dann mit einer besseren Prognose vergesellschaftet [111, 209]. Nach längerem Krankheitsverlauf liegen eher normale oder thrombozytopenische Werte vor. Plättchenwerte unter $50 \times 10^9/l$ treten bei Patienten mit akuter Myelofibrose oder denen mit enormer Splenomegalie auf [72]. Neben riesigen Plättchen und Fragmenten von Megakaryozyten zeigen sich auch Megakaryoblasten im peripheren Blut bei der PMF, die auf eine extramedulläre Bildung hinweisen und so helfen, sekundäre Thrombozythämien abzugrenzen [53].

Bei ultrastrukturellen Untersuchungen fanden sich Abnormitäten der Thrombozyten [194]. Ihre Funktion ist bei bis zu 50% der Patienten gestört. Dies führt zu Blutungen, aber auch zu thrombotischen Komplikationen [53]. So sind gastrointestinale, urogenitale oder gingivale Blutungen, Epistaxis und Petechien bei Patienten nicht selten anzutreffen. Zu Thrombosen kommt es seltener, als bei den erhöhten Thrombozytenzahlen zu erwarten wäre [96]. Silverstein konnte bei 29% seines Patientengutes mit PMF eine verlängerte Blutungszeit nachweisen, der Quick-Wert war bei 75% der Erkrankten verändert [172]. Man nimmt eine Verminderung der Gerinnungsfaktoren, besonders des Faktor V, als Folge der gestörten Leberfunktion als Grund diese Veränderungen an [53, 172]. Als Ursache der im Krankheitsverlauf stärker werdenden Thrombozytopenie vermutet man unter anderem die verstärkte Sequestration in einer vergrößerten Milz [53], eine verkürzte Lebensdauer der Plättchen [16] und eine ungenügende Neubildung im insuffizienten Knochenmark. Auch eine immunologische Ursache konnte durch die Entdeckung thrombozytenassoziiertes Immunglobulins der Klasse IgG und IgM gesichert werden [75].

1.2.3.3 Leukozytopenie

Eine erhebliche Variationsbreite lässt sich hinsichtlich der Leukozytenzahlen während der Entwicklung einer PMF beobachten [7, 72, 199, 248]. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung findet man häufig eine geringgradige Leukozytose, aber auch normale oder verminderte Leukozytenzahlen sind nicht ungewöhnlich [53, 248]. Im Krankheitsverlauf nimmt im Gegensatz zum Hämoglobinwert die Zahl der Granulozyten meist zu [53]. Es wurden aber auch Fälle mit persistierender Neutropenie beschrieben [172].

Die myeloische Zellreihe zeigt eine sich im Krankheitsverlauf stärker ausbildende Linksverschiebung und im späteren Stadium schließlich ein vermehrtes Auftreten von Blasten im peripheren Blutbild [53, 151, 204, 217, 248]. Ihr Anteil kann besonders bei Patienten mit hohen Leukozytenzahlen bis auf 10% zunehmen [53]. Eine Blastenkrise, die zu jedem Zeitpunkt und Stadium der Erkrankung auftreten kann, findet sich je nach Studie bei 10-40% der Patienten [72, 151, 213, 218, 248].

Während im Lichtmikroskop keine nennenswerten Veränderungen der Granulozytenmorphologie festzustellen sind, findet man bei der ultrastrukturellen Untersuchung dysplastische Merkmale, die vor allem Strukturen wie den Nukleolus betreffen [19]. Die zusätzlich beschriebenen Funktionsstörungen der Granulozyten und die gelegentlich auftretende Lymphopenie sind möglicherweise die Ursache der erhöhten Infektanfälligkeit nach längerem Krankheitsverlauf.

Es kann eine Basophilie sowohl des Knochenmarks als auch des peripheren Blutes auftreten, die dann mit einer Hyperhistaminämie bzw. einer Hyperhistaminurie vergesellschaftet ist. Diese erhöhten Histaminwerte gelten als Ursache des bei vielen Patienten vorhandenen Juckreizes [53, 60].

Als typisch für die PMF gelten gesteigerte Aktivität der alkalischen Leukozytenphosphatase (ALP) [72, 151, 213, 248], sowie der zum Diagnosezeitpunkt oft angestiegene LDH-Plasmaspiegel. Beide Werte korrelieren mit der Höhe der Leukozytenzahl, so dass Hasselbalch die LDH eher für einen Parameter der Myeloproliferation als für die Leberfunktion oder die Hämolyse ansieht [72]. Gestiegene Werte der alkalischen Phosphatase (AP) gelten als Indikator für die Leber- und Knochenbeteiligung. Weitere Untersuchungen zeigen den hepatischen Ursprung und dass erhöhte Werte eher mit der sinusoidalen Dilatation als mit der myeloischen Metaplasie assoziiert sind [72].

Serumkonzentrationen von Immunglobulinen zeigen keine Konstanz. Es wurden polyklonale Hyper- und Hypogammaglobulinämien, aber in einigen Fällen auch monoklonale Gammopathien beschrieben [72, 230].

Chromosomenanalysen können nicht eindeutig zur Diagnose der PMF herangezogen werden. Sie dienen aber sehr wohl als differentialdiagnostische Abgrenzung zur CML, da das Philadelphia-Chromosom bei den PMF-Patienten nicht vorkommt [53, 104, 174, 217, 229]. Es zeigen sich bei PMF Patienten zwar gehäuft Deletionen an den langen Armen von Chromosom 13 und 20 [163, 180], die gleichen Merkmale lassen sich aber

auch bei der CML und der ET nachweisen, so dass sie nicht zur Unterscheidung zwischen den verschiedenen MPN genutzt werden können.

1.2.4 Histopathologische Befunde

Die histologischen Befunde zeigen je nach Stadium der Erkrankung eine große Bandbreite von verschiedenen Läsionen. Am Anfang steht eine zellreiche Myeloproliferation ohne Vermehrung der retikulären oder kollagenen Fasern. Diese entsteht erst im Verlauf der Erkrankung und führt dann zu der charakteristischen und namensgebenden Fibro-Osteosklerose.

Die frühen Veränderungen werden als initiales präfibrotisches Stadium bezeichnet. Auffallend ist eine vermehrte Zelldichte des Knochenmarks mit Proliferation der Granulo- und Megakaryopoese, während das Fettgewebe im unterschiedlichen Maße von den hämatopoetischen Zellen verdrängt wird [54, 213, 248]. Wie bei den anderen myeloproliferativen Erkrankungen ist die Megakaryopoese vom Zentrum in den peritrabekulären Raum verschoben, in dem normalerweise die Granulopoese stattfindet. Außerdem zeigen die Zellen eine auffallende Haufenbildung und Atypien, auf denen beim präfibrotischen Stadium mit begleitender Thrombozytose die Abgrenzung insbesondere zur ET beruht [54, 204].

Diese Abweichungen der Megakaryozyten von der Norm beinhalten Veränderungen in der Größe, vielfältige Zellkernformen und unterschiedliche Kern-Plasmarelationen. Es kommt zu Riesenmegakaryozyten mit plump hypersegmentierten, hirschgeweihartigen Zellkernen, Mikromegakaryozyten und pyknotische Formen sowie zu nackten Zellen [192, 204]. Diese Merkmale der abnormen Megakaryopoese treten unabhängig von der Entwicklung osteosklerotischer Knochenmarksveränderungen auf [209]. Die in vermehrter Anzahl anzutreffenden unreifen Formen der Megakaryopoese werden als Zeichen der Entwicklungsstörung interpretiert. Es lässt sich auch eine erhöhte Mitoserate nachweisen [192].

Auch die Granulopoese ist im initialen Stadium gesteigert und zeigt eine Linksverschiebung. Die Erythropoese dagegen ist reduziert und weist eine verzögerte Ausreifung der Erythroblasten in die kleineren Normoblasten auf. Außerdem bilden sich Nester der früheren Zellformen [188, 209].

Die Hauptmerkmale des Stromas sind retikuläre und kollagene Fasern, Makrophagen und vaskuläre Strukturen. Fibrotisches Knochenmarksstroma ist durch eine gesteigerte Einlagerung von extrazellulären Matrix-Proteinen (ECM-Proteine) wie Kollagen I, III, V

und VI, Hyaluronsäure und die nichtkollagenen Glykoproteine Fibronectin, Vitronectin und Tenascin charakterisiert [54, 58, 160]. Die Akkumulation dieser Moleküle ist das Resultat der Wirkung von TGF- β , einem bei der PMF vermehrt vorkommendem Wachstumsfaktor [44].

Im frühen Stadium kommt es noch nicht zu einer Dilatation und Hyperplasie der Sinus [54] doch später konnte immunhistochemisch eine Vermehrung der Markraumgefäße und des Kollagen Typ IV gezeigt werden [211]. Die dilatierten Sinus sind im Querschnitt entrundet, im Lumen finden sich Inseln mit vornehmlich Megakaryozyten, die von kernhaltigen erythropoetischen Vorläuferzellen umringt sind. Megakaryozyten gelangen durch transmurale, endotheliale Passage in die Zirkulation. Die amöboide Wanderung durch die Sinus-Wände konnte durch 3-D-Rekonstruktion sichtbar gemacht werden [215]. Kollagen Typ IV findet sich vor allem subendothelial und führt zu einer Verdickung der Basalmembran. Diese Merkmale sind im präfibrotischen Stadium weniger ausgeprägt als im fibro-osteosklerotischen Stadium.

Die Anzahl von Makrophagen zeigt sich erhöht und wird im Zusammenhang mit dem vermehrten Zellumsatz und vorzeitigem Untergang dysplastischer Zellelemente gesehen [99]. Im fortgeschrittenen Stadium der PMF sieht man vermehrt deren degenerative Abbauelemente, die dann von den Makrophagen phagozytiert werden. Es werden aber auch Wachstumsfaktoren, die von den defekten Megakaryozyten freigesetzt werden, für die Aktivierung des Monozyten-Makrophagen-Systems verantwortlich gemacht [220]. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die CD34⁺ Zellen im Knochenmark der negativen Regulation durch TGF- β entgehen. TGF- β wirkt über zwei Rezeptoren, die einen Komplex bilden. Bei PMF scheinen im Vergleich zu normalen CD34⁺ Zellen die CD34⁺ Vorläuferzellen eine reduzierte Expression des TGF- β -II-Rezeptors aufzuweisen [115]. Außerdem lassen sich im Serum PMF-Erkrankter erhöhte Werte von M-CSF nachweisen [61].

Ist in den hyperzellulären Frühformen der PMF noch kein oder nur ein geringer Anstieg der Retikulinfasern zu verzeichnen [54, 55, 192], so ändert sich dieser Befund beim Übergang in die fibro- bzw. osteosklerotischen Spätformen. Ein dichtes Netzwerk aus groben kollagenen Faserbündeln bestimmt das Bild und verdrängt die atypische Hämatopoese. Als Zeichen des osteosklerotischen Knochenmarksumbaus gelten die im Verlauf zunehmende bizarre Einengung und Deformation der Markräume, die durch primitives Knochengeflechtwachstum mit der Bildung breiter Trabekel und gleichzeitigem Ersatz des blutbildenden Markes durch Fettzellen verursacht werden

[58]. In der Terminalphase kann man dann ein fast zellfreies Knochenmark antreffen, das nur noch Kollagenfasern und Fettzellen zwischen stark osteosklerotischen Knochenbälkchen beinhaltet [213].

Der Fasergehalt ist ein Schlüsselparameter in der histologischen Beurteilung von Knochenmarksbiopsien [205]. Der Verlauf der Fibrose im Knochenmark wird hauptsächlich über Cytokine gesteuert [116] und kommt reaktiv in verschiedenen Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis [2] und Neoplasien, darunter das Myelodysplastische Syndrom [130], akute Leukämie [148, 207] und chronische myeloproliferative Erkrankungen [23, 54, 55] vor. Durch Bewertung der Faserdichte und –komponenten (Retikulin bzw. Kollagen), lassen sich Hinweise auf den Krankheitsverlauf, insbesondere unter Therapie, erkennen [23, 135, 181, 206]. Daher ist ein reproduzierbares und valides Bewertungssystem (Scoring-system) entwickelt und mehrfach verbessert worden [205].

1.3 Molekularpathologische Entwicklungen in der Diagnostik der myeloproliferativen Neoplasien: Jak 2

Besonders in jüngster Zeit zeichnet sich eine alternative, kausalerorientierte Einteilung ab: die Klassifikation entsprechend genetischer Faktoren und die molekulare Diagnose der MPNs - zurückgehend auf 1960, als die Entdeckung des Philadelphia-Chromosoms mit der Bcr-Abl-Fusion zur molekularpathologischen Erklärung der Proliferation der Leukozyten in der CML führte. Für die PMF ist insbesondere eine genetische Veränderung von Bedeutung: die Jak2-V617F Mutation.

Jak2 gehört zu den sog. Janus Kinasen (weitere Mitglieder sind Jak1, Jak3 und Tyk2), zytosolische Tyrosinkinasen mit einer Kinase- (JH1), einer Pseudokinase- (JH2) und mehreren Homologiedomänen zur Rezeptorbindung (JH3-7). Sie assoziieren mit Mitgliedern der Superfamilie der Zytokinrezeptoren. Typische Zielrezeptoren für Jak2 sind der Erythropoetin-, der Thrombopoetin- und der Interferonrezeptor [240]. Normalerweise unterliegt die Kinaseaktivität der JH1-Domäne, und damit auch die Signaltransduktion, einer genauen Regulation: erst durch Phosphorylierung der JH1-Domäne selbst wird diese aktiviert; die JH2-Domäne wirkt im nichtphosphorylierten Zustand inhibitorisch auf die Kinaseaktivität; die Rezeptorbindungsstelle im Bereich der JH3-7-Domänen (FERM-Domäne) wird ebenfalls durch (Auto-) Phosphorylierung in ihrer Funktionalität reguliert und führt im phosphorylierten Zustand zur Degradation des Jak-Proteins.

Veränderungen im Jak2-Gen können diese Regulationsmechanismen unterlaufen und zu einer konstitutiven Aktivierung führen. So wird zum Beispiel in manchen Formen hämatopoetischer Erkrankungen wie CML, AML, CEL und MDS die Kinasedomäne von Jak2 durch die Translokation t(9;12)(p24;p13), an Tel, ein Mitglied der Ets-Familie [112, 150], durch t(9;22)(p24;q11.2) [64] an bcr und durch t(8;9)(p22;p240) an PCM1 [22, 141, 164] fusioniert und damit aktiviert. Mutationen in Jak2 können einen gleichen Effekt haben: in verschiedenen Studien [120, 249] fand sich die Mutation V617F (Austausch der Aminosäure 617 Valin durch Phenylalanin) in der JH2-Domäne. Dabei war diese Mutation in 99% der PV-Patienten und in 50% der ET- und PMF-Patienten nachweisbar. Obwohl weitere Mutationen in diesem Signaltransduktionsweg und auch in Jak2 selbst beschrieben wurden [133, 152, 235], scheint die Mutation Jak2-V617F die, zumindest vorerst, wichtigste in der Pathogenese hämatopoetischer Erkrankungen zu sein. Im Falle der PMF war in einer Studie [27] der Nachweis dieser Mutation mit

einem geringeren Überleben, einer höheren Anzahl von Leukozyten und thrombotischen Ereignissen verbunden. Eine Korrelation zur Myelofibrose ergab sich bis dato nicht. Die zentrale diagnostische Bedeutung der JAK2-V617F-Mutation im Rahmen der PV, ET und PMF wurde auch in den neuen WHO-Richtlinien 2008 berücksichtigt.

1.4 WHO-Klassifikation 2008 für PMF

Die ersten formalen Kriterien für die Diagnosestellung der PMF fand in der Klassifizierung der MPNs im Rahmen der Arbeit der Polycythemia Vera Study Group (PVSG) 1967 statt [239]. Seither trugen die wachsenden Kenntnisse über die Morphologie, Immunhistochemie und letztendlich auch Molekulargenetik zu einem immer detaillierteren Verständnis dieser Krankheit bei. Dabei kommt der Histologie des Knochenmarks eine große Bedeutung zu, die bereits 2001 in die WHO-Klassifikation eingearbeitet wurde [228]. Diese Klassifikation teilte die PMF noch in zwei Typen ein: eine „präfibrotische“ und eine „fibrotische“ PMF. Inzwischen ist jedoch anerkannt, dass in der „präfibrotischen“ als auch in der „fibrotischen“ PMF die identischen histopathologischen Phänotypen nachzuweisen sind, nur mit unterschiedlichem Anteil an Retikulinfasern. Damit konnte in der WHO-Klassifikation 2008 [178] ein deutlich vereinfachtes Schema für die PMF-Kriterien entwickelt werden. Aber auch in der neuen Fassung wird die Knochenmarkshistologie als zentrales diagnostisches Kriterium behandelt, wie u. a. an der Proliferation und Atypie von Megakaryozyten als erstes Hauptkriterium zu sehen ist. Die Megakaryozyten in der PMF liegen in relativ großen lockeren bis dichten Nestern, sind größenvariabel von klein bis groß und zeigen ein erhöhtes Kern/Plasmaverhältnis mit hyperchromatischen, aufgetriebenen oder irregulär gefalteten Kernen. Zusätzlich kommen nackte Megakaryozytenkerne vor [208].

Auch in der Differenzierung der präfibrotischen PMF von der ET ist die Morphologie des Knochenmarks entscheidend: es kommt dabei auf die Zellularität des Knochenmarks, die Granulozytenpopulation und die Megakaryozytenmorphologie an [184]. Eine deutliche Hyperzellularität des Knochenmarks tritt in der zellulären Phase der PMF auf, prominente granulozytäre Proliferationen mit Linksverschiebung sind typisch für die PMF, fehlen jedoch in der ET [201].

Hauptkriterien

1. Vorhandensein von megakaryozytären Proliferationen und Atypien, meist einhergehend mit entweder Retikulin- und/oder Kollagenverfaserung, oder, bei Fehlen einer signifikanten Retikulinverfaserung, müssen die Veränderungen der Megakaryozyten begleitet werden von einer erhöhten Knochenmarkszellularität mit verminderter Erythropoese und erhöhter Granulopoese (im Sinne einer präfibrotischen zellularen Phase).
2. Befunde passen nicht zu den WHO-Kriterien der PV, CML, MDS oder anderen myeloischen Neoplasie.
3. Nachweis der Jak2-V617F-Mutation oder eines anderen klonalen Markers (z.B. MPL-W515L/K), oder bei Fehlen eines klonalen Markers, kein Nachweis einer Knochenmarksfibrose aufgrund eines zugrundeliegenden entzündlichen oder neoplastischen Geschehens.

Nebenkriterien Leukoerythroblastose

1. Erhöhte Laktatdehydrogenase-Aktivität
2. Anämie
3. Klinische (tastbare) Splenomegalie

Abbildung 6: Diagnosekriterien der PMF (Auszug aus der WHO-Klassifikation 2008 für MPN). Zur Diagnosestellung müssen drei der Hauptkriterien und zwei Nebenkriterien erfüllt werden. Dabei müssen die Nebenkriterien nicht ausgeprägt vorliegen.

1.5 Graduierung der Knochenmarksfibrose und des Zellgehaltes nach dem Europäischer Konsens 2005

Mit dem 2005 veröffentlichten Europäischen Konsens über die Graduierung der Knochenmarksfibrose und des Zellgehaltes [205] wurde ein neues semiquantitatives System etabliert. Zuvor unterlag oftmals die Beurteilung einer sehr individuellen Betrachtung und zudem der Nutzung verschiedener Einordnungssysteme. Nun wurden die Beurteilungskriterien differenziert und die bis dahin existierendem System deutlich vereinfacht und zusammengefasst. Als ein wesentlicher neuer Aspekt kann die altersabhängige Einordnung der Zelldichte gelten.

1. Einordnung der Zelldichte anhand von Altersgruppen:

Alter (Jahre):	Hämatopoetische Fläche (% der Gesamtfläche)
20-30:	60-70
30-60:	40-50
≥70:	30-40

2. Einordnung der Qualität (Kollagen vs. Retikulin) und der Quantität des Fasergehaltes. Anschließend Zuordnung in vier Grade wobei die Bewertung nur in Bereichen mit Hämatopoese erfolgt:

MF – 0	Einzelne retikuline Fasern ohne Überkreuzungen, entsprechend normalem Knochenmark
MF – 1	Lockerer Retikulin-Netzwerk mit vielen Überkreuzungen, besonders perivaskulär
MF – 2	Diffuse und dichte Retikulinfaservermehrung mit starker Vernetzung, nur selten mit fokalen Kollagenbündeln und/oder fokaler Osteosklerose
MF – 3	Diffuse und dichte Retikulinfaservermehrung mit starker Vernetzung, grobfaserige Kollagenbündel, oft assoziiert mit signifikanter Osteosklerose

1.6 Entwicklung der Knochenmarksfibrose

Die Entwicklung einer Organfibrose ist eine Antwort der extrazellulären Matrix auf Zytokine. Insbesondere ist hier TGF- β von Bedeutung [246]. TGF- β kommt in drei aktiven Isoformen (TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3) vor [63]. Vor allem die Isoform 1 (TGF- β 1) ist für die Fibrose verschiedener Organe verantwortlich [246]. Diese Isoform kommt hauptsächlich in zirkulierenden Monozyten und Gewebsmakrophagen vor. Durch Aktivierung ortsständiger Mesenchymzellen, die sich zu Kollagenproduzierenden Myofibroblasten differenzieren, wird die Synthese von Glykoproteine wie Kollagen Typ I, III, IV, Fibronectin und Tenascin [97, 127, 162] stimuliert. Zusätzlich wird der Matrixabbau durch die Hemmung der Expression von kollagenaseähnlichen Proteasen vermindert [44] und die Expression von Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, einem Protease-Inhibitor, gesteigert [113]. Beide Mechanismen führen zusammen zur Akkumulation der Matrixproteine im Knochenmark der Erkrankten.

Im Knochenmark bei der PMF sind die Hauptbestandteile der Fibrose Kollagen Typ I und III [121, 131]. Die bei der Spaltung des aus den Fibroblasten ausgeschütteten Prokollagens entstehenden N- und C-Peptide sind im Blut erhöht nachweisbar und korrelieren mit der Krankheitsaktivität [72]. Hier ist die Myelofibrose ebenfalls eine Antwort der extrazellulären Matrix im Knochenmark auf die klonal proliferierende Hämatopoese [65, 84]: Kahn und Kollegen waren die ersten, die über Analyse von Isoenzymen zwar die monoklonale Herkunft von Erythrozyten, Leukozyten und Plättchen belegten [90], jedoch zeigten nachfolgende Studien, daß die Fibroblasten polyklonal und somit nicht Teil des Prozesses sind, der von den neoplastischen Stammzellen ausgeht [84, 237]. Die monoklonale Blutbildung ist zu jedem Zeitpunkt der Erkrankung vom frühen zellreichen bis zum fortgeschrittenen myelofibrotischen Stadium nachweisbar [103]. Da die Fibroblasten nicht aus dieser monoklonalen Blutbildung stammen ist es schließlich allgemeiner Konsens, dass die Myelofibrose bei den MPN ein sekundäres oder begleitendes Phänomen darstellt.

Die Ursache für die vermehrte Faserbildung ist also eine erhöhte Zytokinfreisetzung (vordergründig von TGF- β) im Knochenmark. Als Quelle kommen zwei Zellsysteme in Betracht: das MTS und das MMS, die beide TGF- β ausschütten können. Auf diese Zellsysteme wird im Folgenden näher eingegangen.

Als weitere Wachstumsfaktoren, die in der Entstehung der Fibrose involviert sind, müssen noch Calmodulin (Kalzium bindendes Protein), bFGF (basic fibroblast growth

factor) und TIMPs (tissues inhibitors of metalloproteinases) genannt werden. Calmodulin ist im erhöhten Maße im Urin PMF-Erkrankter nachzuweisen und scheint als unabhängiger Faktor zur Fibrose beizutragen [36]. Bei bFGF handelt es sich um einen multifunktionalen Wachstumsfaktor, der sich in Megakaryozyten und Plättchen in gesteigerter Konzentration befindet und auch vermehrt im Urin ausgeschieden wird [36, 128]. Zusätzlich sind TIMPs in gesteigerten Konzentrationen nachweisbar. Einerseits wirken sie als Inhibitoren des Bindegewebeabbaus und andererseits hat die Kombination von TIMP-1 und TIMP-2 eine annähernd gleiche fibrinogene Wirkung wie TGF- β [140].

1.6.1 Beziehung der Megakaryozyten zur Fibrogenese

Bei der CML gibt es eine signifikante Korrelation zwischen unreifen Megakaryozyten und der Fibrose [197], so dass ähnliche pathogenetische Mechanismen auch bei den anderen MPNs angenommen werden. Zu den Faktoren, die das MTS in das Mikromilieu des Knochenmarkes abgibt, gehören neben TGF- β (transforming growth factor- β) auch PDGF (platelet derived growth factor), ECGF (endothelial cell growth factor) und EGF (epidermal growth factor).

PDGF kam als Ursache für Myelofibrose auch in Betracht, da eine vermehrte Ausschüttung von PDGF ins Knochenmark beobachtet wurde: in Plasma und Urin von PMF-Patienten wurde eine erhöhte Konzentrationen von PDGF gefunden [59], nicht jedoch in den peripheren Plättchen normaler Megakaryozyten [17, 42]. Die atypischen Megakaryozyten des Knochenmarks der MPN Patienten zeigen auch eine gesteigerte Expression der mRNA für beide PDGF-Ketten A und B [91].

Obwohl PDGF ein potentes Mitogen für Fibroblasten ist, hat es aber nur einen geringen Einfluß auf die Kollagenproduktion selbst [97, 185]. Daher ist PDGF nicht als alleinige Ursache für die Myelofibrose ausreichend.

Neben PDGF wird aber auch TGF- β von Megakaryozyten synthetisiert und in den deren α -Granula gespeichert. Patienten mit PMF haben gesteigerte TGF- β -mRNA-Expression in den atypischen Megakaryozyten und erhöhte TGF- β -Konzentrationen in den Plättchen [129]. Megakaryozyten sind allerdings nicht die alleinige Ursache für die erhöhten TGF- β -Spiegel. Der TGF- β -Spiegel korreliert zwar mit der Fibrosierung, jedoch nicht die Anzahl der Megakaryozyten [87].

IL-1 scheint auch eine Rolle in der Steigerung der sekretorischen Aktivität der Megakaryozyten zu spielen, wenn auch in einem geringeren Maße als IL-3 [241]. Studien zur Untersuchung der Megakaryozyten-Fibroblasten-Interaktion im normalen Knochenmark zeigen, dass nicht nur PDGF und TGF- β , sondern auch der enge räumliche Kontakt (spatial relationship) für einen Wachstumseffekt auf die Fibroblasten nötig ist [170]. Die atypischen Megakaryozyten sind typischerweise in der unmittelbaren Nähe von Retikulinfasern und Fibroblasten angesiedelt [197].

1.6.2 Einflussnahme des Monozyten-Makrophagen-Systems auf die Fibrogenese

Makrophagen sind ebenfalls Produzenten von TGF- β . Sie sind bei PMF nicht nur in vermehrter Anzahl anzutreffen [186, 219], sondern liegen auch in einem präaktivierten Zustand mit erhöhten TGF- β - und IL1-Werten im Zytoplasma vor [156]. Es wird angenommen, dass CD44 über Adhäsion die Produktion von fibrinogenen Zytokinen im Monozyten-Makrophagen-System stimuliert [156]. Wie schon erwähnt sind ECM-Proteine bei der PMF erhöht und gleichzeitig potentielle Liganden für Adhäsionsmoleküle [157]. Zum Beispiel Hyaluronsäure ist ein solches vermehrt vorkommendes ECM-Protein [76] und könnte mit CD44 interagieren und das Monozyten-Makrophagen-System stimulieren [156]. Rameshwar zeigte, dass die gesteigerte TGF- β -Produktion mit einem Adhäsionsprozess beginnt. Es kommt zur Aktivierung von NF- κ B, einem Transkriptionsfaktor, der in die Expression verschiedener Zytokine involviert ist [12]. In den Monozyten kommt es dann zur Produktion von IL-1. Die gesteigerte Konzentration von IL-1 stimuliert die Zelle TGF- β zu produzieren [158].

Das Monozyten-Makrophagen-System ist in dem komplexen Mechanismus der verschiedenen Wachstumsfaktoren auf mehrere Weisen eingebunden. Der Stammzelldefekt führt zu einer Störung der Megakaryozytenreifung und damit zu einem erhöhten Zelluntergang von Megakaryozyten und Thrombozyten. Die Zelltrümmer werden von den Makrophagen abgebaut und die verschiedenen Wachstumsfaktoren freigesetzt. Dadurch wird das Monozyten-Makrophagen-System selber aktiviert und produziert Faktoren wie TGF- β . Die Rolle des Monozyten-Makrophagen-Systems wurde in einer Studie mit immundefekten Mäusen näher untersucht [51]. Es stellte sich heraus, dass diejenigen ohne funktionstüchtige Monozyten und Makrophagen keine fibrotischen Veränderungen im Knochenmark ausbildeten. Diese Untersuchung führt zu

der Schlussfolgerung, dass ein normal funktionierendes Monozyten-Makrophagen-System die Voraussetzung für die Entwicklung einer sekundären Myelofibrose ist.

1.7 Fragestellung der Arbeit

Zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen war allgemein akzeptiert, dass die Fibroseentwicklung bei der PMF einen sekundären Prozess darstellt, der von verschiedenen Wachstumsfaktoren in Gang gesetzt wird [97, 137, 158, 159, 161, 197]. Es war auch bekannt, dass zu Beginn der Erkrankung die Verfaserung des Knochenmarkes noch nicht zwingend vorhanden ist, sie entwickelt sich erst im weiteren Krankheitsverlauf und wird dann zum eindeutigen histopathologischen Merkmal. Es herrschten aber noch verschiedene Ansichten über den Verlauf einer MF ausgehend vom initialen, präfibrotischen Stadium einer PMF.

Einer der potentesten Wachstumsfaktoren, der den sekundären Prozess der Fibrosebildung anregt, ist TGF- β . TGF- β wird von Megakaryozyten aber auch vom Monozyten-Makrophagen-System und von Endothelzellen synthetisiert [97, 127, 159]. Die Expansion und Aktivierung des Monozyten-Makrophagen-Systems stellt eine Haupteigenschaft der PMF dar und ist in der Zunahme der reifen Makrophagen im Knochenmark zu erkennen [186]. Doch dieses Merkmal wurde bis zu unserer Studie noch nicht im Zusammenhang mit dem komplexen Mechanismus der Fibrosierung betrachtet.

Wir bearbeiteten folgende Fragenstellungen:

1. Wie unterscheidet sich der Verlauf der Myelofibrose bei dem präfibrotischen initialen Stadium und dem manifesten Stadium der PMF?
2. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der gesamten bzw. aktivierten Makrophagenpopulation und der Progression der Myelofibrose?

2 Material und Methoden

2.1 Übersicht über das Patientengut

Die Studie schloss 79 Patienten mit PMF ein. Von allen Patienten waren Sequenzbiopsien im Abstand von mindestens 6 Monaten vorhanden. Zu Beginn wurden die initialen Knochenmarkspräparate gesichtet und die Patienten in zwei verschiedenen Krankheitsstadien zugeordnet.

60 Patienten (26 Männer, 34 Frauen, Durchschnittsalter 61 Jahre) boten die allgemein anerkannten Diagnosekriterien wie Splenomegalie, Anämie, leukoerythroblastisches Blutbild mit Dakryozyten, Myelofibrose zumindest durch retikuläre Fasern, keine gleichzeitige oder vorausgegangene andere MPN und Abwesenheit eines Philadelphia-Chromosom. Die Behandlung der Patienten richtete sich nach Alter, Allgemeinzustand und dem Grad der Zytopenie.

Genauer aufgeschlüsselt wurden folgende Therapieregime durchgeführt: 11 Patienten bekamen keine Therapie, bei 23 wurde nur unterstützend mit Blutzelltransfusionen oder Kortison behandelt (19 erhielten auch Thrombozytenaggregations-Hemmer wie ASS und Dipyridamol), 20 machten eine orale Chemotherapie mit Busulfan oder Hydroxyharnstoff, 1 Patient unterzog sich einer Interferonbehandlung und bei 3 wurde eine Splenektomie oder Bestrahlung durchgeführt.

Die weiteren 19 Studienteilnehmern (9 Männer, 10 Frauen, Durchschnittsalter 58 Jahre) zeigten zunächst nicht die typischen Diagnosekriterien einer PMF. Die Untersuchungsbefunde beinhalteten: geringe Splenomegalie, grenzwertige oder leichte Anämie, selten erythrozytäre Vorläuferzellen oder Dakryozyten im peripheren Blutbild, regelmäßig einen erhöhten Thrombozytenwert über $500 \times 10^9/l$, keine relevante Myelofibrose, keine gleichzeitige oder vorausgegangene andere MPN und kein Philadelphia-Chromosom.

Die Patienten klagten außerdem über Müdigkeit, generelles Krankheitsgefühl und gelegentlich über Nachtschweiß, Gewichtsverlust, Neigung zu Hämatomen und abdominelle Beschwerden.

Die initiale Beckenkammbiopsie wurde meist unter dem klinischen Verdacht einer therapierefraktären Anämie, Splenomegalie, Thrombozytose unbekannter Ursache, unklassifizierten MPN oder einer ET durchgeführt. Bei diesen Stansen fanden sich keine oder nur eine sehr gering ausgeprägte Zunahme der retikulären Fasern im Knochenmark. Die Behandlung dieser zweiten Gruppe unterschied sich nicht wesentlich

von der ersten und beinhaltet auch alleinige Therapie mit Thrombozytenaggregations-Hemmern oder in Kombination mit anderen Medikamenten.

Nur noch von 65 Patienten (29 Männer, 36 Frauen, Durchschnittsalter 64 Jahre) aller 79 Studienteilnehmer war ausreichend Untersuchungsmaterial vorhanden, um die immun- und lektinhistochemischen Färbungen anzufertigen.

Die minimale Beobachtungszeit der Patienten betrug 6 Monate, das längste Intervall 10 Jahre. Die durchschnittliche Beobachtungszeit war 5,5 Jahre.

2.1.1 Klinische Daten zu verschiedenen Messzeitpunkten

Es wurden folgende Parameter während der Studie erhoben:

- Erythrozyten ($\times 10^{12}/l$)
- Leukozyten ($\times 10^9/l$)
- Erythroblasten im peripheren Blutbild (in %)
- Myeloblasten im peripheren Blutbild (in %)
- Thrombozyten ($\times 10^9/l$)
- LDH (U/l)
- Milzgröße (in cm unter dem Rippenbogen)
- Lebergröße (in cm unter dem Rippenbogen)

Die Erhebung der Daten erfolgte während des Studienverlaufes. Sie wurden besonders zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und der letzten Sequenzbiopsie genauer betrachtet und die beiden Gruppen miteinander verglichen.

2.1.2 Beckenkammbiopsien

Die routinemäßige Gewinnung von Knochenmarksmaterial wird überwiegend nach der Methode von Jamshidi und Swaim durchgeführt [85]. Es wird aus der Spina iliaca posterior des Os ileum eine zylinderförmige Stanze entnommen. Hierfür gibt es besondere Stanznadel, die Jamshidi-Nadeln. Die Größe der gewonnenen Probe sollte mindestens 2 mm x 17 mm betragen. Eine andere Methode mittels Drillbohrung der Spina iliaca anterior superior konnte sich nicht behaupten [26].

An die Entnahme sollte sich möglichst schnell eine Fixierung anschließen. Sie wurde hier durch eine gepufferten Aldehydlösung (2 ml 25% Glutardialdehyd, 3 ml 37%

Formaldehyd, 1,58 g wasserfreies Kalziumacetat und destilliertes Wasser auf 100 ml) über 12-48 Stunden erreicht.

Der Vorteil dieser Methode liegt in dem durch Glutaraldehyd verstärkten Kalziumeinbau in die Membranstrukturen des Gewebes. So kommt es zu einer besseren Erhaltung der Feinstrukturen in den Präparaten. Außerdem wird eine Schrumpfung, zu der es bei alleiniger Formalinfixierung kommt, verringert. Beide Effekte führen zu einer deutlich verbesserten Beurteilbarkeit der histologischen Schnitte.

Der nächste Schritt ist die Dekalzifizierung der knöchernen Anteile für 3-4 Tage in einer gepufferten EDTA-Lösung (Äthylendiamintetraessigsäure) bei pH 7,2. Diese schonende Entkalkung alteriert die Knochenmarkszellen nur gering und führt trotzdem zu einer besseren Schneidbarkeit der Präparate.

Den Biopsien durch in eine aufsteigende hydrophile Alkoholreihe über 3 Stunden und bei einer Temperatur von 39°C das Wasser entzogen. Es folgt ein Xylolbad von 50 min. Anschließend wird die Stanze bei 59°C paraffinisiert und schließlich in die Kassetten eingegossen.

Von den Biopsieblöcken können nun mit einem Grundschlittenmikrotom (Leitz GmbH, Wetzlar) 3-5 µm dicke Schnitte angefertigt werden. Diese werden auf Glasobjektträger aufgezogen.

2.1.2.1 Routinefärbungen

Die nach dem Schneiden routinemäßig durchgeführten Färbungen waren: Giemsa, PAS (Perjodsäure-Schiff-Reaktion), Naphthol-AS-D-Chloroacetatesterase, Pearls'-Reaktion für Eisen und die Silberimprägnation nach Gomori.

In der Silberimprägnation stellen sich die retikulären und kollagenen Fasern im Lichtmikroskop schwarz dar.

2.1.2.2 Immunhistochemische Darstellung der Makrophagenpopulation

PG-M₁-Färbung

Makrophagen wurden durch die immunhistochemische Färbemethode mit dem monoklonalen Antikörper PG-M₁ (CD 68) dargestellt. Vor dem eigentlichen Färbeprozess wurden die in Paraffin eingebetteten Beckenkammbiopsien zur Paraffinschmelze für 15 min bei 62°C in den Brutschrank gegeben und dann ein 20-minütiges Xylol-Bad durchgeführt. Es wurde eine absteigende Alkoholreihe von 100% bis 76% angeschlossen und mit A. dest. gespült. Die Andauung erfolgte mit Pronase E

(1 mg auf 1 ml A. dest.) bei 38°C über 10 min. Es folgten Spülungen mit Wasser und A. dest. und schließlich mit TBS-Puffer (tris-buffered-saline). Um störende Hintergrundfärbungen durch membranständige Fc-Rezeptoren zu verringern, wurden die Präparate mit 10%igem Kanichenserum vorbehandelt. Diese binden an die Fc-Rezeptoren und verbessern so die Qualität der Immunfärbungen [52]. Im folgenden Schritt wurde der Schnitt in einer 1:50 Verdünnung des monoklonalen Antikörpers PG-M₁ (Primärantikörper) inkubiert. Nach Spülung mit TBS-Waschpuffer erfolgte die Biotin-Streptavidin-Methode (LAB), die auf der Verwendung eines Brückenantikörpers beruht [69, 82]. Dieser Brückenantikörper ist ein monoklonaler biotinylierter Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper, der gegen den von Mäusen gewonnenen Primärantikörper gerichtet ist. Biotin wurde 45 min inkubiert und dann mit TBS-Puffer abgespült. Dann wurde ein Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Komplex zugefügt (Verdünnung 1:50, Einwirkzeit 45 min bei Raumtemperatur), der an den Brückenantikörper bindet. Zum Schluss wurde nochmals mit TBS abgewaschen und darauf die alkalische Phosphatase mit dem Farbstoff "Fast Red" (7 mg Naphthol-AS-MX-Phosphat, 0,7 ml Dimethylformamid, 35 ml Tris-Puffer (pH 8,2), 8,4 mg Levamisol und 35 mg Fast Red TR Salt) gegeben. Es folgte weiterhin eine Kerngegenfärbung: die Schnitte wurden mit Hämalaun über 15-20 sec lang angefärbt und dann mit Wasser gespült. Die Präparate wurden mit Kaisers Glyzeringelatine eingedeckt und für mindestens 1-2 Stunden bei 38°C im Brutschrank belassen.

BSA-I⁺ Subpopulation

Die Färbung der aktivierten Subpopulation der Makrophagen erfolgte mit BSA-I als Primärantikörper. Die Schritte des Färbeprotokolls entsprachen denen der beschriebenen PG-M₁-Färbung.

2.2 Morphometrische Methode

Das Verfahren der Morphometrie erlaubt die quantitative Auswertung von Strukturelementen (Gewebe- und Zellkompartimente) und Partikeln (Zellen) in histologischen Präparaten unter dem Mikroskop [146]. Zur morphometrischen Auswertung der Faserdichte benutzen wir ein Kontron-Bildanalysegerät (MOP-A-MO1-Kontron) der Firma MOP-Videoplan, München. Das Rechensystem ist mit einem Auslegermikroskop (von Carl Zeiss, Oberkochen), einem Videobildschirm, einem Digitalisiertablett mit Maus, einer Tastatur und einem Drucker ausgestattet.

Zur Sicherung exakter Ergebnisse wird zu Beginn der Messungen das Gerät jeweils neu skaliert, indem man über das Digitalisiertablett die Eckpunkte des in das Okular des Mikroskops eingezogenen Gitters markiert. So wird dem Rechenprogramm ein exaktes Längenmaß vorgegeben, das dem jeweiligen Vergrößerungsfaktor für das spezielle Messprogramm entspricht.

Das histologische Präparat wird durch das Mikroskop betrachtet. Man kann nun mittels einer Leuchtdiode im Gesichtsfeld und der Maus Strukturen manuell umfahren oder die Faserkreuzungspunkte eingeben. Damit ergeben verrechenbare Daten.

Das von der Firma Kontron entwickelte Programm "YX1" ermöglicht die Erfassung von verschiedenen Parametern wie die Fläche von umfahrenen Strukturen, die Summe von Einzelelementen und führt außerdem die Berechnung von Summe, Mittelwert und Standardabweichung der registrierten Daten durch.

Die Makrophagendichte wurde mit einem ähnlichen manuellen optischen Planimeter (VIDAS-Zeiss-Kontron) und entsprechenden Berechnungsprogrammen (Videoplan-software) ermittelt.

2.2.1 Fasermessung

Die untersuchten Beckenkammbiopsien beinhalteten im Durchschnitt $9,6 \pm 5,0 \text{ mm}^2$ artefaktfreie Knochenmarksfläche. Zur Ermittlung der Faserdichte wurde mit einer 500fachen Vergrößerung (Okular 12,5 x 40er Objektiv) gearbeitet. Wenn möglich, wurden bei jedem Präparat 25 Gesichtsfelder ausgewertet. Zunächst wurde das gesamte Präparat gemustert und die Gesichtsfelder so gewählt, dass sie verteilt und repräsentativ waren. Gebiete mit Quetschungen, Zerreißen, Einblutungen oder ausschließlich mit Knochen wurden nicht für die Messungen herangezogen.

Jedes Gesichtsfeld wurde nach einem bestimmten Muster betrachtet und verschiedene Messparameter erhoben:

1. Fläche des Knochens und der Artefakte in mm^2
2. Fläche der Fettzellen in mm^2
3. Anzahl der Faserkreuzungspunkte pro Gesichtsfeld

Die Flächen wurden durch jeweiliges Umfahren mit dem LED erfasst und berechnet. Die Kreuzungspunkte ergaben sich aus den Überschneidungen zwischen den Fasern und dem eingezätzten Gitter auf einer Seite des Binokulars.

Aus diesen Werten ließen sich die in der Studie benötigten Parameter errechnen:

1. Fettanteil in %
2. Kreuzungspunkte (i) pro mm^2 Markfläche
3. Kreuzungspunkte (i) pro mm^2 Hämatopoese­fläche

Die Markfläche bezeichnet die Biopsiefläche abzüglich der Fläche von Knochen und Artefakten, die Hämatopoese­fläche entspricht der Markfläche nach Abzug des Fettanteils.

2.2.2 Myelofibrose Progressions Index (MPI)

Aufgrund der erheblichen Variabilität der Intervalle zwischen den Sequenzbiopsien ist es notwendig eine zeitunabhängige Messgröße zu verwenden. Dazu wurde die Progression der Myelofibrose pro Monat errechnet.

Der dazu herangezogene MPI (myelofibrosis progressions index) [209]. setzt die Faserdichtedifferenz ($\Delta i \times 10^2/\text{mm}^2$) in Relation zur Zeit (Monate zwischen erster und letzter Biopsie).

2.2.3 Quantifizierung der Makrophagen

Zur morphometrischen Untersuchung der Makrophagenanzahl standen im Durchschnitt $14,1 \pm 4,8 \text{ mm}^2$ Knochenmarksbiopsiefläche zur Verfügung. Zunächst wurde das gesamte Präparat gemustert. Im Unterschied zur Fasermessung wurden 35 Gesichtsfelder ausgezählt. Die Schritte pro Gesichtsfeld verliefen aber in der gleichen Reihenfolge:

1. Erfassung der Fläche von Knochen und Artefakten
2. Erfassung der Fläche der Fettzellen
3. Erfassung der Anzahl der Makrophagen

Und auch hier wurde wieder der Anteil der Fettfläche berechnet und die Anzahl der Makrophagen pro mm^2 Hämatopoesefläche angegeben.

Von jeder Biopsie wurden zwei Makrophagen-Färbungen angefertigt, um die aktivierte Subpopulation unterscheiden zu können. Die Durchführung der morphometrischen Analyse der beiden Präparate wurde identisch durchgeführt. Die Untersuchungsergebnisse wurden miteinander verglichen und der Anteil der aktivierten Makrophagen ermittelt.

2.3 Zur Problematik sogenannter aktivierter Makrophagen

Makrophagen können aktiviert werden. Damit gehen morphologische Veränderungen und eine Erweiterung des Funktionsspektrums einher. Knochenmarks-Makrophagen zeigen im normalen Knochenmark einen hohen Anteil von 85% an HLA-DR-positiven und damit Antigen-präsentierenden Makrophagen [11, 100, 117, 118]. Die Antigenpräsentation hat eine herausragende Bedeutung in der Entwicklung der spezifischen Immunität und stellt eine Eigenschaft reifer, differenzierter Makrophagen dar. Die Expression von MHC-Molekülen der Klasse II auf der Oberfläche von Makrophagen setzt einen Aktivierungsprozess voraus, der durch exogene Faktoren gesteuert wird. Solch ein Faktor ist z.B. γ -IFN (Immun-Interferon), das Hauptprodukt spezifisch sensibilisierter T-Lymphozyten. Die ausgeprägte Fähigkeit zur Antigenpräsentation kann also als Ausdruck des Aktivitätszustandes interpretiert werden. Der Aktivitäts- und Differenzierungszustand der Makrophagen ist eng mit der Expression bestimmter membranständiger Kohlenhydrat-Antigene verbunden. Diese Antigene werden von Lektinen erkannt und gebunden. Daher bieten sich Lektine hervorragend an, um verschiedene Subpopulationen der Makrophagen zu unterscheiden. Um ruhende von aktivierten Makrophagen auseinanderzuhalten eignet sich BSA-I-B₄ [124]. Dieses Lektin stammt von *Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia* (BSA) und bindet an Membranbestandteile mit α -D-Galctosylresten, die infolge eines Aktivierungsprozesses exprimiert werden. Im Knochenmark findet sich ein Anteil von 60-70% BSA-I-B₄⁺ Makrophagen [11]. Dieser Wert liegt etwas höher, als der bei früheren immunmorphometrischen in-situ Untersuchungen berechnete [10]. Man geht davon aus, dass die BSA-I-B₄-Reaktivität einer Subpopulation der PG-M₁⁺ Makrophagen einer vorausgegangenen Aktivierung entspricht.

PG-M₁ ist ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch für das Monozyten-Makrophagen-System ist [47]. Das von PG-M₁ identifizierte Antigen stellt ein Epitop eines intrazytoplasmatischen Moleküls dar, welches wahrscheinlich mit lysosomalen Strukturen in Verbindung steht. Im Gegensatz zu früheren Färbungen reagiert PG-M₁ nicht wie die KP₁-Färbung mit anderen Zellpopulationen wie z.B. leukämischen Haarzellen, Megakaryozyten oder Granulozyten und ihren Vorläuferzellen [154].

2.4 Methoden zur Quantifizierung der Faserdichte im Knochenmark

Es gibt verschiedene Methoden die Faserdichte zu bestimmen. Die Einordnung des Ausmaßes in eine mehrstufige Rangskala ist eine häufig angewandte Möglichkeit. Sie soll dem Untersucher ermöglichen, die Faserentwicklung im Krankheitsverlauf rasch zu beurteilen [77, 212, 238]. Neben der Schwierigkeit, subjektive Einschätzungen miteinander zu vergleichen, fließen in die Bewertung oftmals auch quantitative Aspekte ein. Solche beeinflussenden Aspekte sind z.B. Kollagenfaserbündel [77]. Zudem findet häufig der Gehalt an Fettgewebe keine Berücksichtigung, so dass die Zunahme dieser Komponente im Knochenmark eine vermeintliche Faserverminderung vortäuschen kann [190]. Solch eine vorgetäuschte Abnahme der Faserdichte kann auch durch ein interstitielles Ödem im Markraum entstehen. Diese Ungenauigkeit der semiquantitativen Methode galt insbesondere zum Zeitpunkt unserer Studie, da noch keine standardisierten Beurteilungskriterien vereinbart waren, die z.B. die Einordnung der Zelldicht anhand von Altersgruppen berücksichtigen. Eine genauere und objektivere Messung ist mit Hilfe der Morphometrie möglich.

Es werden zwei Arten der Morphometrie angewandt. Bei der Fotomorphometrie werden nach der Silberimprägnation die histologischen Präparate fotografiert. Das Muster des Gitterfasergerüsts wird auf ein dünnes Blatt Papier gepaust. Der Fasergehalt wird daraufhin von einem computergesteuerten Bildanalysegerät erfasst, indem die entstandenen Bildpunkte in die absolute Faserlänge in mm pro mm^2 umgerechnet werden [147].

Eine andere Möglichkeit ist die direkte Mikromorphometrie [187, 192]. Der Untersucher nutzt ein Okular mit einem eingezätzten Gitter bekannter Größe und bekanntem Linienabstand. Bei diesem Verfahren werden die Schnittpunkte der in der Silberimprägnation gefärbten Fasern mit den Linien des Gitters gezählt.

Zusätzlich wird die Fläche der Fettzellen ermittelt. Da diese rechnerisch subtrahiert wird, ergibt das Ergebnis der Messungen die Faserkreuzungspunkte pro mm^2 der Mark- oder Hämatopoesefläche. Die Markfläche bezeichnet die Biopsiefläche abzüglich der Fläche von Knochen und Artefakten, die auch ermittelt werden. Die Hämatopoesefläche ergibt sich, wenn man die Fettfläche von der Markfläche abzieht.

Pro Präparat werden mehrere (ca. 25) Gesichtsfelder gezählt. Alle Messungen der verschiedenen Präparate werden von einem Untersucher durchgeführt, um eine möglichst gute Vergleichbarkeit zu erreichen. Die bei Probemessungen gefundenen

intra- und interindividuellen Messwertunterschiede werden mit ca. 3-5% angegeben [211].

Für die vorliegende Studie wurde das letztgenannte Verfahren angewandt, weil es die Möglichkeit beinhaltet, die Fläche der Fettzellen sowie die des Knochens und der Artefakte zu ermitteln und aus der Bestimmung der Faserdichte herauszurechnen.

2.5 Statistische Auswertung

In der statistischen Auswertung wurden die beobachteten Unterschiede zwischen der ersten und letzten Biopsie bzw. zwischen den Gruppe) auf ihre statistische Signifikanz zu überprüfen. Dafür wurde als Signifikanztest für kleine Fallzahlen der t-Test (Student-Test) verwendet.

Weiterhin wurde der Zusammenhang zweier Alternativmerkmale (Makrophagenzahlen und Verfaserung des Knochenmarkes) untersucht. Hierzu berechneten wir den Korrelations-Koeffizienten nach Pearson.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Daten

Die klinischen und laborchemischen Befunde der 60 Patienten mit einer manifesten PMF zeigten schon zum Zeitpunkt der ersten Biopsie typische Merkmale. Sie wiesen Anämie, leichte Leukozytose, regelmäßig ein leukoerythroblastisches Blutbild mit Tränentropfenerythrozyten und in den meisten Fällen eine Splenomegalie auf.

Die gemessenen Hämoglobinwerte lagen mit einem Mittelwert von 11,5 g/dl deutlich unter der Norm. Die Streubreite reichte von 4,2 bis 14,0 g/dl. Entsprechend lagen auch die Erythrozytenwerte mit einem Mittel von $4,0 \times 10^{12}/l$ auf einem gegenüber den Normalwerten eher niedrigen Niveau. Die Leukozytenzahlen ließen sich bei einer großen Streubreite von $1,0$ bis $62,2 \times 10^9/l$ auf einen Mittelwert von $14,0 \times 10^9/l$ ermitteln. Die Patienten zeigten also teilweise eine Leukozytose und teilweise eine Leukopenie. Auch bei der Thrombozytenzahl gab es eine große Variabilität (Streubreite $190-2496 \times 10^9/l$). Doch auch hier war der Mittelwert mit $520 \times 10^9/l$ erhöht. Thrombozytenwerte über $1000 \times 10^9/l$ fanden sich bei 4 der 60 Patienten (7%). Der Prozentsatz der im peripheren Blut nachweisbaren Vorstufen betrug im Falle der Erythroblasten im Mittel 2,3 % (Streubreite 0,5-30,0 %) und bei den Myeloblasten 1,2% (Streubreite 0,7-17,0%). Die LDH war im Durchschnitt erhöht (Mittelwert 506 U/l, Streubreite 129-1700 U/l). Dem Befund einer PMF entsprechend waren auch die Ergebnisse der klinischen Untersuchungen von Milz und Leber. Im Durchschnitt waren beide Organe bei den Patienten vergrößert und im unterschiedlichen Maße unter dem Rippenbogen tastbar (Milz 3,6 cm, Leber 1,5 cm).

Die 19 Patienten mit einem initialen, präfibrotischen Stadium der Erkrankung, zeigten zu Beginn nicht so ausgeprägte klinische Befunde.

Der Hämoglobinwert lag im Mittel mit 13,1 g/dl deutlich höher und entsprach damit nur einer leichten Anämie. Auch die Zahl der Erythrozyten war mit $4,5 \times 10^{12}/l$ annähernd im normalen Bereich. Die Leukozytenanzahl war nicht signifikant unterschiedlich zu dem der Gruppe I, wies aber eine geringere Streubreite auf ($5,6-32,7 \times 10^9/l$). Die Thrombozyten wiederum waren vermehrt nachweisbar (MW $962 \times 10^9/l$) und es gab auch häufiger Fälle mit Werten über $1000 \times 10^9/l$. 8 der 19 Patienten (37%) zeigten eine solche Thrombozytose. Die Organvergrößerungen von Milz und Leber waren nur gering ausgeprägt und zeigten selten auffällige Tastbefunde.

Im Vergleich der klinisch manifesten PMF mit dem initialen, präfibrotischen Stadium ergaben sich zum Zeitpunkt der ersten Biopsie in 6 der 9 Merkmale signifikante Unterschiede (Tabelle 1, A). Dies galt für den Grad der Anämie, den Thrombozyten- und LDH-Werten, dem Auftreten der Leukoerythro- und Myeloblasten im peripheren Blut und die Splenomegalie.

Für diese Merkmale ergaben sich auch innerhalb der jeweiligen Patientengruppe und damit eines Krankheitsstadiums signifikante Unterschiede im Vergleich der ersten und letzten Biopsie (Tabelle 1, B und C).

Zum Zeitpunkt der letzten Biopsie (im Durchschnitt nach 16 Monaten) waren die Unterschiede in den hämatologischen Befunden der beiden Patientengruppen nicht mehr signifikant. Nach längerem Krankheitsverlauf befanden sich die Patienten also im gleichen Krankheitsstadium und waren klinisch nicht mehr zu unterscheiden.

Zeitpunkt der Biopsie	Manifeste PMF		Präfibrotisches Stadium	
	Diagnosestellung	Sequenzbiopsie	Diagnosestellung	Sequenzbiopsie
Intervall (in Monaten)	35 ± 30 (6-122)		30 ± 24 (6-100)	
Hb (g/dl)	11,5 ± 2,7 ^A (4,2-14,0)	10,9 ± 2,4 ^B	13,1 ± 3,5 (7,0-15,5)	10,8 ± 3,6 ^C
Erythrozyten (x 10 ¹² /l)	4,0 ± 0,9 (1,2-5,3)	3,8 ± 1,2	4,5 ± 1,6 (2,2-5,8)	4,7 ± 0,4
Leukozyten (x 10 ⁹ /l)	14,0 ± 12,4 (1,0-62,2)	11,5 ± 6,5	14,2 ± 7,2 (5,6-32,7)	13,4 ± 5,0
Erythroblasten im peripheren Blut (in %)	2,3 ± 2,8 ^A (0,5-30,0)	7,4 ± 8,5 ^B	0,5 ± 0,6 (0-2,0)	8,5 ± 12,0 ^C
Myeloblasten im peripheren Blut (in %)	1,2 ± 2,1 ^A (0,7-17,0)	7,3 ± 6,6 ^B	0,5 ± 0,3 (0-1,0)	5,5 ± 2,1 ^C
Thrombozyten (x 10 ⁹ /l)	520 ± 418 ^A (190-2496)	403 ± 417 ^B	962 ± 809 (104-3215)	421 ± 444 ^C
LDH (U/l)	506 ± 302 ^A (129-1700)	760 ± 219 ^B	417 ± 242 (209-986)	619 ± 179 ^C
Milzgröße (in cm unter dem Rippenbogen)	3,6 ± 2,4 ^A (0,5-15,0)	4,6 ± 3,2 ^B	2,4 ± 1,2 (0-4,0)	5,5 ± 3,3 ^C
Lebergröße (in cm unter dem Rippenbogen)	1,5 ± 1,8 (0,4-8,0)	2,0 ± 1,9	0,9 ± 1,2 (0-0,3)	1,8 ± 1,2

Tabelle 1: Klinische Befunde und Labordaten (Mittelwert ± Standartabweichung, in Klammern die Streubreite). Signifikanzniveau ($P \leq 0,05$): A: manifeste PMF gegen präfibrotisches Stadium; B: manifeste PMF, Biospie bei Diagnosestellung gegen Sequenzbiopsie; C: präfibrotisches Stadium Biospie bei Diagnosestellung gegen Sequenzbiopsie.

3.2 Übersicht über das Knochenmark bei der Primären Myelofibrose

Die ersten Knochenmarksbiopsien der Patienten mit einem initialen, präfibrotischen Stadiums der PMF zeigen einen auffallenden Zellreichtum mit Proliferation der Granulo- und Megakaryopoese und eine vergleichsweise geringe Involution durch Fettgewebe (Abbildung 1a).

Die Megakaryopoese ist nicht nur durch die deutlichen Anstieg an Megakaryozytenzahl, sondern auch durch deren bizarres, dysplastisches Aussehen charakterisiert. Diese Abnormitäten beinhalten Störungen der Kern- und Zytoplasmareifung sowie Änderungen in Größe und Form (Abbildung 1c).

Die atypischen Megakaryozyten weisen im fibrotischen Stadium regelmäßig einen engen Kontakt zu den irregulären Fasern auf (Abbildung 2b).

Die Erythropoese ist reduziert und zeigt eine Reifungshemmung. Es kommt zum relativen Überwiegen der Proerythroblasten und früher Erythroblasten. Diese Frühformen haben keine Tendenz zur weiteren Differenzierung in spätere Vorläuferzellen und verbleiben in ihren Stadien. Die Erythroblasten sind in kleinen Nestern angesammelt (Abbildung 1d, e).

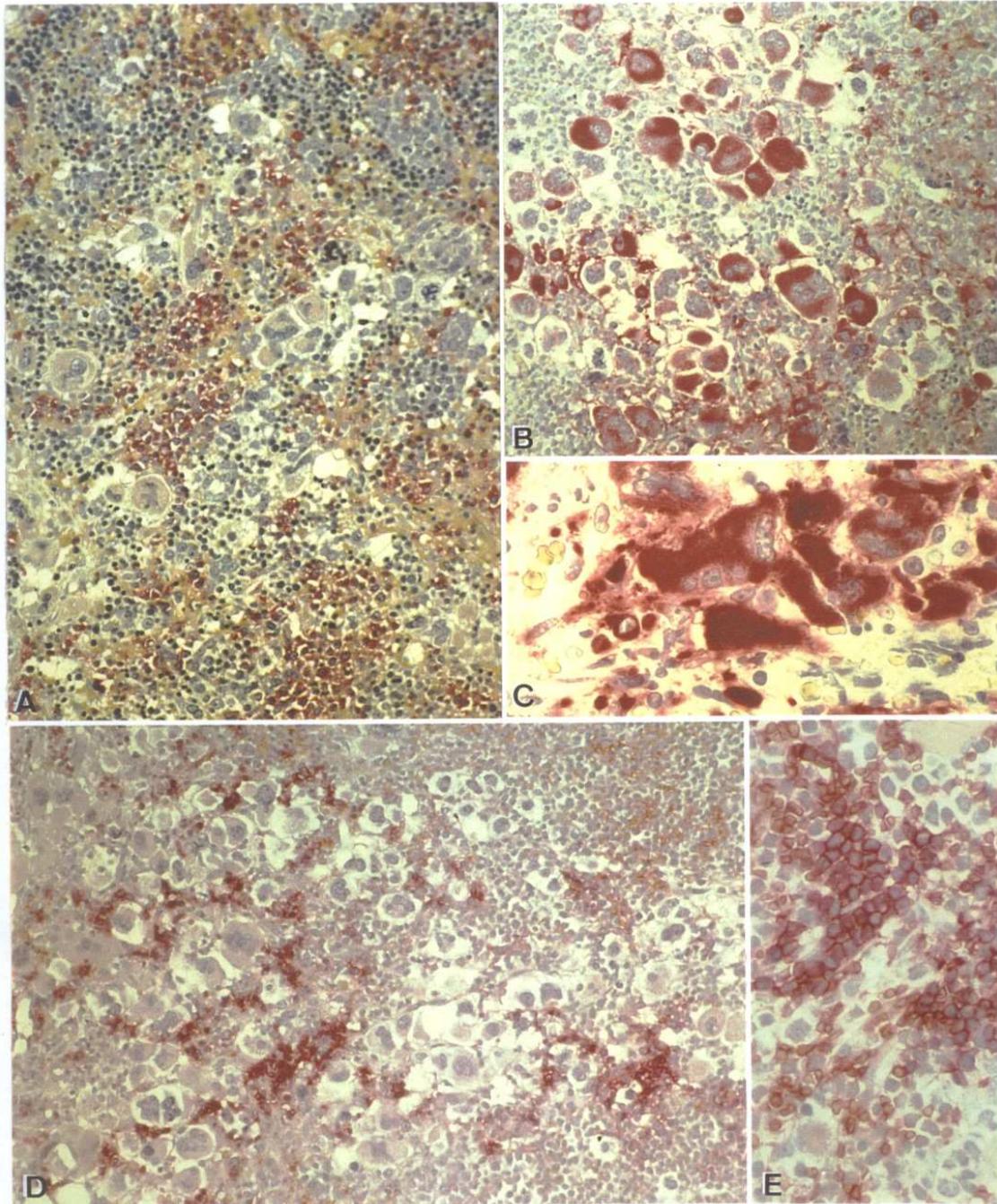


Abbildung 1: Initiales präfibrotisches Stadium der PMF: (a) Übersicht mit Hyperzellularität und spezifische Färbung der neutrophilen Granulopoese (AS-D-Chloroazetat-Esterase). (b) Gruppen von Megakaryozyten, die verschiedene Größen und bizarre Formen aufweisen (CD61-Immunfärbung). (c) Die Abnormitäten der Megakaryopoese sind an der gestörten Kern- und Zytoplasmareifung und damit an dem dysplastischen Erscheinen der Zellen zu erkennen (CD61-Immunfärbung). (d) Die spezifische Färbung der Erythropoese zeigt die erythropoetischen Inseln verschiedenen Ausmaßes zwischen den Nestern der atypischen Megakaryopoese (Ret40f-Immunfärbung). (e) Die erythropoetischen Inseln bestehen vor allem aus frühen Erythroblasten, die anscheinend in diesem Stadium verbleiben. a, b, c x 370, e x 57.

3.3 Faserentwicklung bei Sequenzbiopsien

Bei Patienten mit einer initialen PMF ist zunächst im hyperzellulären Stadium kein Anstieg der retikulären Fasern bemerkbar (Bild 2a). Doch im Verlauf der Sequenzbiopsien entwickelt sich auch bei diesen Patienten eine Myelofibrose. Diese tritt nach unterschiedlichen Intervallen auf und zeigt auch verschiedene Ausprägungen.

Zunächst kommt es zur Bildung eines lockeren Netzwerkes von Fasern. Diese liegen zwischen und benachbart zu den atypischen Megakaryozyten (Bild 2b).

Im fortgeschrittenen fibro- bzw. osteosklerotischen Stadium kommt es zur weiteren Zunahme der Verfaserung mit Auftreten von groben Bündeln kollagener Fasern (Bild 2c) und Bildung von Endophyten und spongiösen Knochenbälkchen (Bild 2c, d). Die Neubildung des Knochens führt zu einer Einengung des Markraumes und damit zur Hypoplasie der Myelopopulationen. Zusätzlich zeigt sich eine punktuelle Involution durch Fettgewebe.

Im sogenannten ausgebrannten Terminalstadium findet sich im Extremfall ein durch Fettgewebe und Osteosklerose verödeter Markraum ohne Hämatopoese.

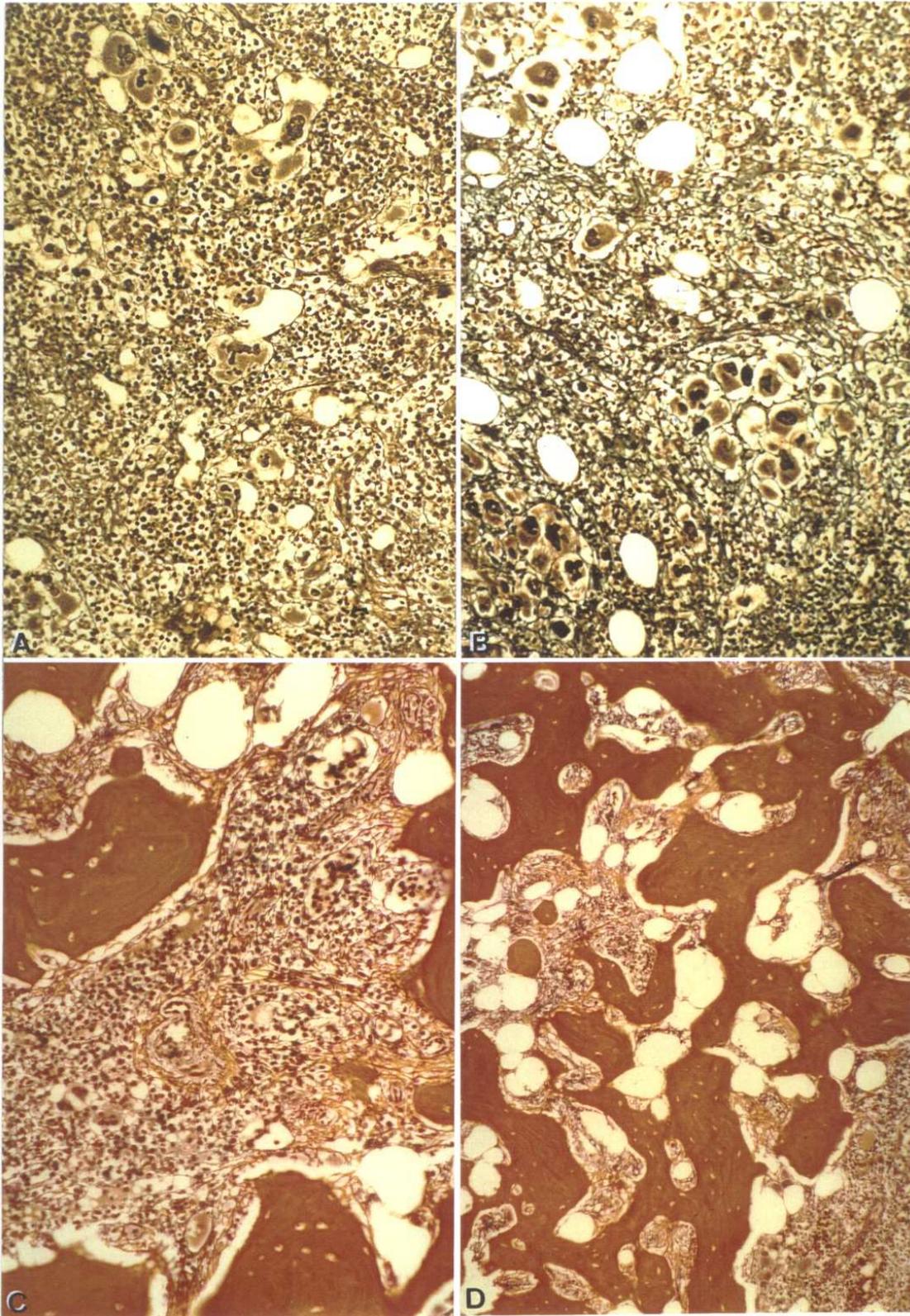


Abbildung 2: Myelofibrose bei der PMF. (a) Initiales Stadium ohne Zunahme der Fasern (Dichte: $23 \text{ i} \times 10^2/\text{mm}^2$). (b) Die spätere Biopsie desselben Patienten (Intervall: 16 Monate, Faserdichte: $76 \text{ i} \times 10^2/\text{mm}^2$) zeigt ein lockeres Netzwerk von Fasern zwischen und benachbart zu den atypischen Megakaryozyten. (c) Beginnende Osteosklerose (Intervall: 38 Monate). (d) Endstadium mit Entwicklung spongiöser Knochenbälkchen und punktueller Involution von Fettgewebe in das Knochenmark. a, b x 370; c x 280; d x 170.

3.3.1 Dynamik der Fibrogenese

Um die Dynamik des Prozesses der Fibrosierung des Knochenmarks unabhängig von den sehr unterschiedlich langen Untersuchungsintervallen zu beschreiben, benutzten wir den Myelofibrose Progressions Index (MPI). Dieser setzte die Faserdichtedifferenz (Δ i $\times 10^2/\text{mm}^2$) in Relation zur Zeit (Monate zwischen erster und letzter Biopsie).

Der MPI zeigte, dass der relative Anstieg der Faserdichte pro Jahr bei den Patienten mit einer initialen, präfibrotischen PMF wesentlich höher war.

Er betrug bei diesen $1,52 \pm 2,61$ i $\times 10^2/\text{mm}^2$ pro Jahr und bei denen mit manifester PMF nur $0,81 \pm 3,36$ i $\times 10^2/\text{mm}^2$ pro Jahr. Auch die Streubreite unterschied sich und war bei den Patienten mit einer initialen PMF wesentlich geringer (0,21-8,18) als bei denen mit einer manifesten PMF (0,18-16,57).

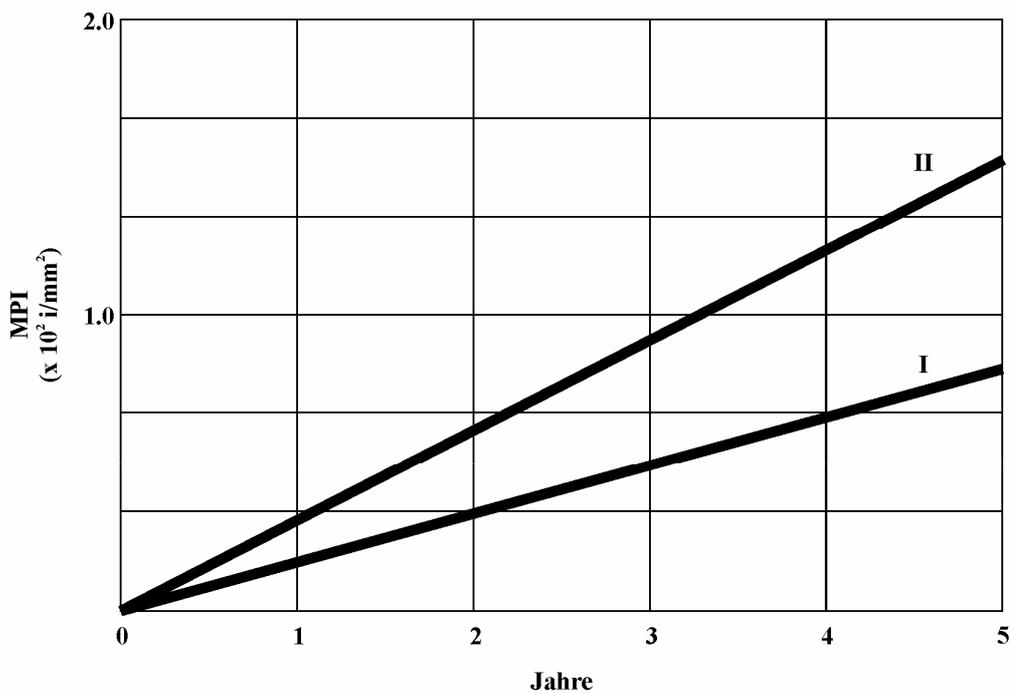


Abbildung 4: Relativer Anstieg der Faserdichte im ersten Jahr der Beobachtung, ausgedrückt durch den MPI für Patienten mit initialer, präfibrotische PMF und Patienten mit manifester PMF. Dieser Index deckt einen signifikanten Unterschied in der Verfaserungsgeschwindigkeit beider Abbildung Patientengruppen auf (I: manifeste PMF: $0,81 \pm 3,36$; Streubreite 0,18-16,57; II: präfibrotisches Stadium: $1,52 \pm 2,61$; Streubreite 0,21-8,18;).

3.3.2 Agyrophilie (retikulär-kollagene Fasern)

Zeitpunkt der Biopsie	Manifeste PMF		präfibrotisches Stadium	
	Diagnosestellung	Sequenzbiopsie	Diagnosestellung	Sequenzbiopsie
Faserdichte [$i \times 10^2/\text{mm}^2$] pro Hämatopoese­fläche (pro Knochen­marks­fläche)	109 ± 40^A (89 ± 40)	137 ± 41^B (115 ± 43)	35 ± 8 (29 ± 7)	75 ± 34 (66 ± 37)
Differenz beider Faserdichten Δi	28 ± 31		40 ± 37	
MPI in $i \times 10^2/\text{mm}^2$	69^C		126	

Tabelle 2: Grad der Agyrophilie (retikulär-kollagene Fasern) zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und der Sequenzbiopsie (mittleres Intervall 16 Monate) Signifikanzniveau ($P \leq 0,05$): A: manifeste PMF gegen präfibrotisches Stadium, Biopsie bei Diagnostestellung; B: manifeste PMF gegen präfibrotisches Stadium, Sequenzbiopsie; C: manifeste PMF gegen präfibrotisches Stadium. Die Dichte der Fasern ist sowohl pro Hämatopoese­fläche als auch pro gesamte Knochen­marks­fläche (in Klammern) angegeben.

Zu Beginn zeigte sich nur bei den Patienten mit manifester PMF eine ausgeprägte Zunahme der Faserdichte auf im Mittel 109 Kreuzungspunkte (i) $\times 10^2/\text{mm}^2$ Hämatopoese­fläche. Patienten mit präfibrotischen Stadium wiesen nur Werte von 35 $i \times 10^2/\text{mm}^2$ auf. Damit bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen (Tabelle 2, A).

Die morphometrische Untersuchung ergab einen signifikanten Anstieg der Faserdichte im Zeitverlauf in beiden Patientengruppen (Tabelle 2, B und C). Bei einer manifester PMF steigerte sie sich auf 137 $i \times 10^2/\text{mm}^2$ und im Rahmen einer initialen PMF auf 75 $i \times 10^2/\text{mm}^2$. Die Berechnung der Differenz der ersten und letzten Faserdichte zeigt, dass Patienten mit initialer PMF eine wesentlich größere Faserdichtezunahme erfuhren.

Es ergaben sich aber auch für 24 Patienten mit manifester PMF und 6 mit initialer PMF nur ein grenzwertiger bis geringer Anstieg der Fasern und kein Patient zeigte eine Verminderung der Faserdichte unter Therapie mit Busulfan oder Hydroxyharnstoff.

3.4 Frequenz der Makrophagen im Knochenmark

In der immunhistochemischen Färbung mit Antikörpern gegen PG-M₁ (CD68⁺) zeigen sich bei der Betrachtung der histologischen Präparate viele zwischen anderen hämatopoetischen Zellen verstreute Makrophagen. Sie zeichnen sich durch ein irreguläres sternförmiges Aussehen aus, das durch die vielen schmalen Zytoplasmaausläufer bedingt ist (Abbildung 3a).

Die aktivierte Subpopulation wird durch die Färbung mit BSA-I dargestellt (Abbildung 3b).

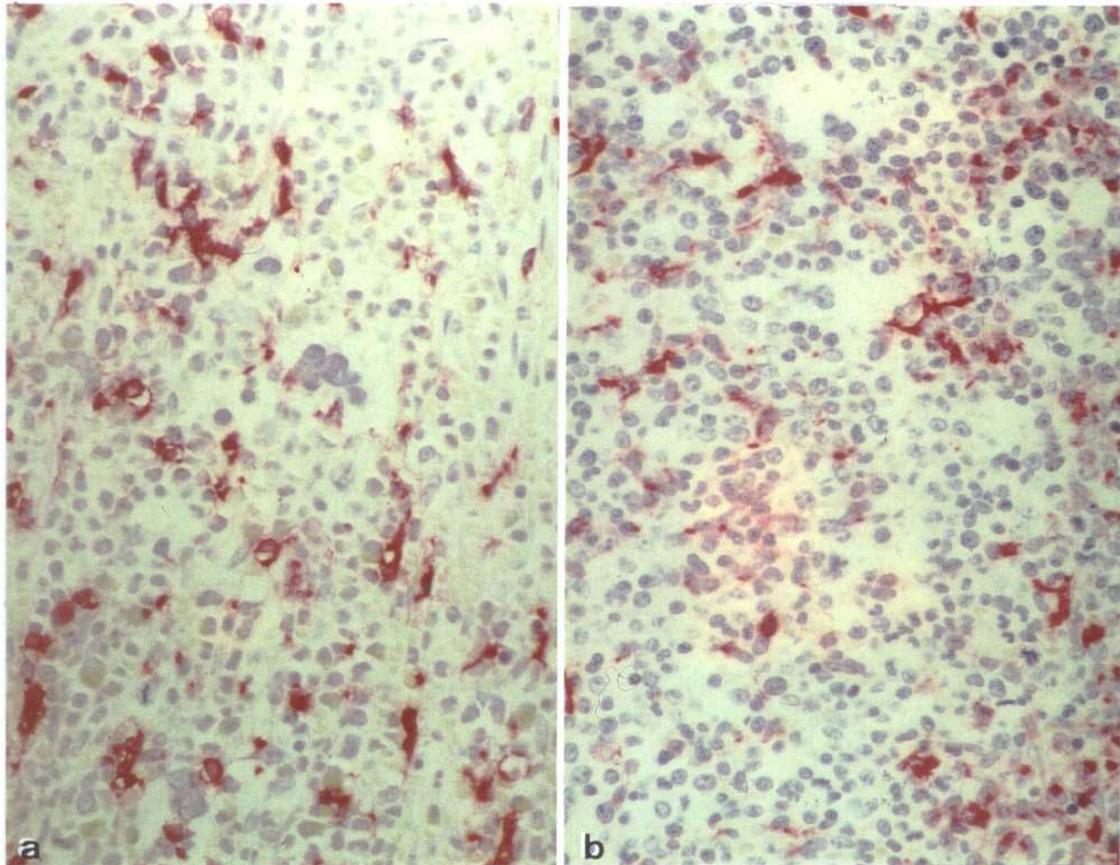


Abbildung 3: Verstreute Makrophagen in den Knochenmarksbiopsien von Patienten mit einem frühen PMF-Stadium. (a) CD68⁺ - gesamte Population (PG-M₁-Immunfärbung). (b) Aktivierte Subpopulation (BSA-I-Immunfärbung). a und b x 170.

Bei 65 der insgesamt 79 Patienten wurde eine Untersuchung der Makrophagen durchgeführt, da von ihnen noch genügend Biopsiematerial vorhanden war, um die immunhistochemischen Färbungen anzufertigen.

Die morphometrische Analyse der Knochenmarkspräparate ergab eine beträchtliche Zunahme der Makrophagenanzahl bei PMF in Vergleich zur Kontrollgruppe (Tabelle 3). Diese Zunahme betraf nicht nur die Gesamtpopulation (PG-M₁), sondern auch die aktivierte Subpopulation (BSA-I).

Für die gesunde Kontrollgruppe ließen sich die Mittelwerte von $370/\text{mm}^2$ für PG-M_1^+ Makrophagen und $200/\text{mm}^2$ für BSA-I^+ Makrophagen ermitteln. Für PMF-Patienten lagen diese Werte zum Zeitpunkt der ersten Biopsie bei $515/\text{mm}^2$ bzw. $332/\text{mm}^2$ und später zur letzten Biopsie bei $531/\text{mm}^2$ bzw. $340/\text{mm}^2$.

PMF

	Biopsie bei Diagnosestellung	Sequenzbiopsie
PG-M ₁ ⁺ Makrophagen ($i \times 10^2/\text{mm}^2$)	515 ± 150	531 ± 148
aktivierte (BSA-I ⁺) Makrophagen ($i \times 10^2/\text{mm}^2$) (% von ges.)	332 ± 106 (65,2 %)	340 ± 123 (64,1 %)
Faserdichte ($i \times 10^2/\text{mm}^2$)	91 ± 47	121 ± 48

Kontrollgruppe (normales Knochenmark)

PG-M ₁ ⁺ Makrophagen ($i \times 10^2/\text{mm}^2$)	370 ± 90
aktivierte (BSA-I ⁺) Makrophagen ($i \times 10^2/\text{mm}^2$) (% von ges.)	200 ± 70 (54,1 %)

Tabelle 3: Morphometrische Analyse der Knochenmarkspräparate von 65 Patienten mit PMF (Mittelwert \pm Standardabweichung) mit Betracht auf Makrophagen und Faserdichte.

3.5 Bezug der Makrophagenpopulation zur Faserentwicklung

Die morphometrischen Untersuchungen zeigten bei einer PMF im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PMF eine Erhöhung der Anzahl von Makrophagen inklusive ihrer aktivierten Subpopulation (Tabelle 3). Ebenfalls trat im Verlauf der PMF eine Zunahme der Verfaserung auf. Es wurde die Korrelation der Parameter Makrophagenanzahl und Faserdichte von allen Patienten einerseits unabhängig vom Krankheitsstadium und andererseits innerhalb der verschiedenen Stadien untersucht. In beiden Fällen ergab sich keine signifikante Korrelation beider Faktoren. Damit ist die Größe der Makrophagenpopulation unabhängig von der Zunahme der Faserdichte.

4 Diskussion

4.1 Diagnose der Frühstadien der Primären Myelofibrose

Die Differenzierung der PMF von den verschiedenen anderen Entitäten der Knochenmarksfibrose wie z.B. bei PV, ET oder CML ist für die Prognose als auch für die Therapie von entscheidender Bedeutung. Insbesondere die ET geht durchaus mit einer Knochenmarksfibrose einher, die im Frühstadium der einer PMF sehr ähnelt und daher die Unterscheidung erschwert [55, 153, 209, 223]. Hinzukommt, dass eine erstaunliche Anzahl von Patienten mit präfibrotischer PMF eine signifikante Thrombozytose aufweisen und daher häufig klinisch zunächst als ET angesehen werden. Dieses Phänomen zeigte sich auch in unserer Studie (Tabelle 1). Diese Thrombozytose ist bei der PMF aber nicht dauerhaft und geht im Krankheitsverlauf zurück. Meist ist dieses Phänomen mit dem Fortschreiten der Anämie, der Splenomegalie und auch dem erythroblastischen Blutbild mit Auftreten von Dakryozyten vergesellschaftet.

Im Gegensatz zu PMF mit einer mittleren Überlebenszeit von 9,3 Jahren (fibrotisches Stadium) bzw. 11,9 Jahren (präfibrotisches Stadium) ist die Prognose der ET mit einer mittleren Überlebenszeit von 16,1 Jahren signifikant besser [110]. Das entspricht einer normalen Lebenserwartung einer geschlechts- und altersabgeglichenen Population [168, 204].

Insgesamt ist das klinische Erscheinungsbild der PMF sehr heterogen. Es gibt beinahe asymptomatische Verläufe, die in unserer Studie von einigen Patienten mit initialer PMF repräsentiert wurden, aber auch solche mit eindrucksvollen klinischen Symptomen [41, 53]. Solche Patienten mit den klassischen Befunden einer manifesten PMF zeigten häufig eine schwere Anämie oder eine ausgeprägte Splenomegalie. Besonders bei den Fällen mit gering ausgeprägten klinischen Symptomen (initiales, präfibrotisches Stadium) ist es schwierig die Diagnose einer PMF zu stellen, da die Patienten eben nicht die typischen klinischen Merkmale zeigen.

Eine Differenzierung einer frühen PMF und einer ET ist dann besser möglich, wenn man sowohl klinische als auch histopathologische Merkmale gemeinsam in die Betrachtung einfließen lässt und weniger auf ein ausgeprägtes Krankheitsbild wertlegt [32]. Bestimmte Knochenmarksmerkmale, insbesondere die Megakaryopoese, sind hilfreich, um die beiden Krankheitsbilder zu unterscheiden.

Es finden sich in 20% der PMF-Fälle Veränderungen der Megakaryozyten und Granulopoese des Knochenmarkes, die als CMGM (chronic megakaryocytic-

granulocytic myelosis) beschrieben werden [24, 55, 58, 192, 212]. Im Vergleich zu PMF-Patienten mit oder ohne begleitende Thrombozytose zeigen Studien von ET-Patienten mit keiner oder minimaler Behandlung nur geringe Veränderungen dieser Zellreihen im Knochenmark. Es kommt zwar auch zu einer megakaryozytären Proliferation, diese zeigte aber keine zytologische Atypien [58, 204].

Im initialen Stadium der PMF besteht eine leichte neutrophile Granulozytose zusammen mit einer geringen oder moderaten Leukozytose. Dazu kommt bei vielen Patienten eine offensichtlich gehemmte Erythropoese, die mit einer milden therapierefraktären Anämie korrespondiert. Diese Kriterien sind weder bei der ET noch bei der PV [140] ausgeprägt und mögen daher als weitere Unterscheidungspunkte in der Diagnose dienen.

Beginnende retikuläre Fibrosierung führt zu einer Verdickung der Sinuswände (Sinuswandsklerose) und deckt einen engen Kontakt der Nester von dysplastischen Megakaryozyten zu den retikulären Fasern auf [24, 55, 58, 192, 212]. Daher reflektieren die morphologischen Phänomene die komplexe Einflussnahme der Megakaryozyten in die Entwicklung der größten Teile des myelofibrotischen Stromas (Kollagen Typ I, III und IV)[8, 127, 159, 183].

Die neue Wertigkeit der Histopathologie spiegelt sich in der neuen WHO-Klassifikation von 2008 wieder. Kriterien wie die megakaryozytäre Proliferation und Atypien dieser Zellreihe wurden als Hauptkriterien einbezogen. Diese Merkmale sind auch schon im frühen Stadium unabhängig von der Fibrosierung des Knochenmarks vorhanden und dienen deshalb auch der schwierige Abgrenzung dieser zellreichen Stadien von einer ET [204].

Auch die JAK2-Mutation wurde in der neuen Klassifikation berücksichtigt. Sie kann ebenfalls als ein vom Stadium der Erkrankung unabhängiges Diagnosekriterium angesehen werden.

Zusammenfassend haben in den letzten Jahren klinisch-pathologische Studien unser Verständnis des komplexen Krankheitsbildes der PMF wesentlich gesteigert. Die fehlende Betrachtung der frühen Fälle wurde vielleicht durch die stark variierenden Intervalle und unvorhersehbare Natur der stadienähnlichen Entwicklung und durch eine gewisse Vernachlässigung der Knochenmarks-Histopathologie beeinflusst. Mit der neuen Klassifikation ist nun eine korrekte Wahrnehmung und Zuordnung auch des präfibrotischen Krankheitsstadiums möglich.

4.2 Faserentwicklung und Krankheitsverlauf bei der Primären Myelofibrose

Die bei den myeloproliferativen Neoplasien auftretende Myelofibrose zeigt einen signifikanten Zusammenhang mit Morbidität und Mortalität [202]. Eine valide Bestimmung der Faserqualität (Kollagen bzw. Retikulin) und Faserquantität ist daher bei Diagnosestellung und im weiteren Krankheitsverlauf wünschenswert.

Betrachtet man jedoch in verschiedenen veröffentlichten Studien die Bestimmung des Myelofibrose-Grades und dessen Verlauf, zeigt sich eine große Variabilität, die von keinerlei Änderungen, einer Regression bis hin zum Anstieg der Fasern reicht [24, 34, 55, 58, 77, 122, 123, 126, 187, 243]. Schwierigkeiten ergaben sich dabei den genauen Wert der Fasern im Knochenmark zu messen [24, 55, 192, 196]. Die Anwendung unterschiedlicher Methoden wie semiquantitatives Einstufen im Rahmen verschiedener Skalierungssysteme versus Morphometrie, verschiedene Zeitintervalle zwischen den ersten und letzten Untersuchungen oder der Einschluss von Patienten mit postpolyzythämischer myeloischer Myelofibrose und solche mit akuter (maligner) Myelofibrose [74, 77], können unter anderem die Ursache dieser Ungenauigkeiten erklären. Schließlich muss bedacht werden, dass ein Rückgang der Fibrose auch durch eine Zunahme des Fettgewebes simuliert werden kann, dies gilt besonders in den fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung. Eine Verminderung der Fasern könnte aber auch die Folge einer zytoreduktiven Therapie oder Stammzelltransplantation darstellen. Um Studien vergleichbar zu machen und eine hohe Qualität der Evaluation zu erreichen, ist es notwendig bewährte standardisierte Bewertungsrichtlinien einzuhalten [203]. Dieses Vorgehen ermöglicht die Dokumentation von feinsten Veränderungen und deren Ermittlung relativ zur Zeit.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden durch eine standardisierte Versuchsplanung, Erfassung und Auswertung gewonnen. Ein wesentlicher Gesichtspunkt in der Auswertung ist die Veränderung der Faserdichte im Zeitverlauf als Korrelat zur Progression der MF. Entscheidend ist hierbei die Veränderungen unabhängig von den verschiedenen langen Untersuchungsintervallen und dem Gehalt an Fettgewebe ausdrücken zu können (siehe 2.2.1). Der hierzu verwendete Myelofibrose Progressions Index (MPI), zeigt, dass die Geschwindigkeit der Myelofibroseentwicklung im frühen präfibrotischen Stadium der PMF im Gegensatz zu den späteren Formen signifikant gesteigert ist.

Bei keinem Patienten ließ sich ein wesentlicher Rückgang der Myelofibrose ermitteln; auch nicht unter Therapie mit Busulfan oder Hydroxyharnstoff. Dies würde die

Annahme unterstützen, dass es sich bei der Myelofibrose um einen mehr oder weniger irreversiblen Prozess handelt. Bis jetzt scheint nur die Stammzelltransplantation die einzige Therapie zu sein, die das Potential zur Regression der Verfaserung bietet. Der Rückgang der Myelofibrose entwickelt sich bei solchen Patienten zwischen sechs und 12 Monaten nach Transplantation [39].

Insgesamt unterstützen unserer Ergebnisse die Annahme einer schrittweisen Entwicklung und Verlaufes des Krankheitsbildes der PMF. Die Stadien unterschieden sich nicht nur in der Quantität und Qualität der histopathologischen Veränderungen, sondern wie wir zeigen konnten auch in der Dynamik der Verfaserung.

Unsere morphometrische Methode der Faserbestimmung ist im Vergleich zu einer semiquantitativen Einordnung sehr aufwendig und schwer im klinischen Alltag einsetzbar. Dennoch ist eine standardisierte Messung aufgrund ihrer klinischen Relevanz gerade im klinischen Alltag wünschenswert. 2005 wurde ein europäischer Konsens zur Graduierung des Faser- und des Zellgehaltes im Knochenmark erarbeitet. Nun gibt es ein einheitliches semiquantitatives System, welches eine einfache und schnelle Graduierung möglich macht.

4.3 Makrophagenanzahl bei der Primären Myelofibrose

Unsere Ergebnisse zeigen sich kongruent mit denen vorheriger Studien [186], wonach eine erhöhte Anzahl an Makrophagen im Knochenmark bei der PMF zu finden ist. In unserer Studie ergab sich eine Zunahme sowohl der Gesamtpopulation als auch der aktivierten (BSA-I+) Subpopulation der Makrophagen.

Über einen Zusammenhang mit der Frequenz ebenfalls aus dem MMS entstammenden Osteoklasten [107, 250] im Knochenmark wurde spekuliert [186]. Jedoch ist eine Vermehrung der Osteoklasten, im Gegensatz zu den Makrophagen, nicht in allen Studien beschrieben.[169].

Ursächlich für die PMF ist ein Stammzelldefekt, der zu einer abnormalen Reifung der Megakaryozyten mit deutlich verkürzter Lebensdauer und erhöhtem Zelluntergang führt. Die gealterten Megakaryozyten müssen in erhöhtem Maße durch aktivierte Makrophagen abgebaut werden. [155]

Im peripheren Blut erkrankter Patienten konnten innerhalb megakaryotyten Zellen verschiedener Reifungsstufen erhöhte Werte von TGF- β nachgewiesen werden [127]. TGF- β scheint das Zytokin mit der Schlüsselrolle bei der PMF zu sein.

Zu den messbar erhöhten Wachstumsfaktoren im Rahmen einer PMF gehören der M-CSF, IL-6 oder PDGF [59, 61, 236]. M-CSF und PDGF führen beide zu einer Aktivierung der Makrophagen mit Transformation in phagozytische Makrophagen [61, 220]. Diese phagozytieren schließlich die vermehrt anfallenden defekten Megakaryozyten. Bei dem Abbauvorgang werden aus den phagozytierten Megakaryozyten wiederum Wachstumsfaktoren wie TGF- β freigesetzt [9, 98]. Aktivierte Zellen des MMS exprimieren ebenso wie die Megakaryozyten TGF- β und IL-1 [157, 158]. Damit liegt die auch Frage nahe, ob ein Zusammenhang zwischen der Makrophagenanzahl und der Verfaserung besteht.

In unserer Studie ergab sich keine Korrelation der Makrophagenanzahl zum Fasergehalt im Knochenmark. In zwei anderen Untersuchungen wurde kein Zusammenhang zwischen dem Anstieg von Wachstumsfaktoren und dem Grad der Myelofibrose oder der myeloischen Metaplasie [61, 127, 220] festgestellt. Es muss jedoch festgehalten werden, dass eine fehlende Korrelation in den Untersuchungen eine mögliche Einflussnahme dieser Zelllinie und der Wachstumsfaktoren auf die Genese der Myelofibrose nicht ausschließt. Es gibt eine Studie, die zeigte, dass es ohne funktionstüchtige Monozyten und Makrophagen zu keinen fibrotischen Veränderungen im Knochenmark kommt[51]. Neuere Untersuchungen wiesen aber nach, dass es zur

Entwicklung einer Myelofibrose keiner komplett funktionierender Monozyten/Makrophagen bedarf und unterstützen damit eher die Schlüsselrolle der Megakaryozytenlinie im Rahmen der Faserentstehung [234].

TGF- β ist nicht nur ein Faktor mit fibrinogener Potenz, sondern nimmt auch auf zahlreiche Zellen des Knochenmarks meist suppressiven Einfluss. Nun können durch eine verminderte TGF- β -Rezeptorbildung CD34⁺-Vorläuferzellen dieser negativen Regulation entgehen. Dies bietet eine Erklärung für die Expansion der Makrophagenpopulation [116].

Desweiteren ist TGF- β in die Aktivierung von ECM-Molekülen involviert. Dadurch ergibt sich ein weiterer Mechanismus, der zu einer Aktivierung und damit auch zu einer Einflussnahme des MMS im Rahmen einer PMF führen könnte. Es wird angenommen, dass z. B. Hyaluronsäure als ECM-Protein mit CD34 interagiert und dadurch das Monozyten-Makrophagen-System stimuliert [156].

Die biologische Rolle und pathologische Bedeutung der Makrophagenhyperplasie bei der PMF, insbesondere in Hinblick auf die zytokinvermittelte Wirkung extrazellulärer Matrixmoleküle, noch nicht endgültig geklärt und bietet weiterhin interessante Ansätze in der Klärung der Entstehung einer Myelofibrose .

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit basiert auf der histomorphometrischen Untersuchung von Beckenkammbiopsien bei 79 Fällen mit gesicherter Primärer Myelofibrose (PMF). 60 Patienten zeigten eine manifeste PMF, während 19 Studienteilnehmer sich noch im initialen, präfibrotischen Stadium befanden. Wir erfassten jeweils den Fasergehalt, die Anzahl der Makrophagen und deren aktivierte Subpopulation im Verlauf mehrerer Biopsien.

Die Fasern wurden mittels Silberimprägnation nach Gomori gefärbt und anschließend ihr Gehalt im Knochenmark computergestützt morphometrisch gemessen. Mit dem Myelofibrose-Progressions-Index (MPI) ermittelten wir die Zunahme der Myelofibrose pro Monat und damit die Dynamik der Faserentwicklung.

Die Makrophagen und ihre aktivierte Subpopulation wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen CD68 (gesamte Makrophagenpopulation) bzw. BSA-I (aktivierte Subpopulation) dargestellt. Dann erfolgte jeweils eine morphometrische Messung der Makrophagenanzahl pro Haematopoesefläche.

Wir fanden bei Patienten mit initialer, präfibrotischer PMF einen signifikant höheren MPI und damit eine schnellere Progression der Myelofibroseentwicklung.

Die morphometrischen Untersuchungen zeigten bei der PMF mehr Makrophagen als in der Kontrollgruppe. Dies galt sowohl für die Gesamtpopulation als auch für die aktivierte Subpopulation der Makrophagen und war unabhängig vom Krankheitsstadium der PMF. Eine Korrelation zur Faserdichte war nicht nachweisbar.

Zusammenfassend festigen unserer Ergebnisse die Annahme eines schrittweisen Verlaufes des Krankheitsbildes der PMF. Die Stadien unterscheiden sich nicht nur in der Quantität und Qualität der histopathologischen Veränderungen, sondern auch in der Dynamik der Verfaserung. Dabei liegt eine schnellere Progression der Verfaserung im frühen präfibrotischen Stadium vor.

Die Vermehrung der Makrophagen inklusive ihrer aktivierten Subpopulation, zeigt keine Assoziation zu den verschiedenen Krankheitsstadien oder dem Grad der Myelofibrose. Wir konnten damit keine Einflussnahme dieser Zellen im Rahmen der Fibrogenese aufdecken.

6 Literaturverzeichnis

1. Adams JA, Barrett AJ, Beard J, McCarthy DM (1988). Primary polycythaemia, essential thrombocythaemia and myelofibrosis--three facets of a single disease process? *Acta Haematol.* 79(1): 33-7
2. Aharon A, Levy Y, Bar-Dayyan Y, Afek A, Zandman-Goddard G, Skurnik Y, Fabrizzi F, Shoenfeld Y (1997). Successful treatment of early secondary myelofibrosis in SLE with IVIG. *Lupus.* 6(4): 408-11
3. Albrecht M (1966). ["Gaucher cells" in chronic myeloic leukemia]. *Blut.* 13(3): 169-79
4. Albrecht M (1969). Zur Problematik der "Gaucher-Zellen" bei der chronisch myeloischen Leukämie. *Klin Wschr.* 47: 778
5. Anderson J, Deeg H, Tefferi A (1999). Effective treatment of myelofibrosis (MF) by autologous peripheral blood stem cells (PBSC) transplantation (PBSCT). *Blood.* 94: Suppl 1
6. Anderson RE, Hoshino T, Yamamoto T (1964). Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia in Survivors of the Atomic Bomb in Hiroshima. *Ann Intern Med.* 60: 1-18
7. Anger B, R, H, U, P, C, H, H (1990). Idiopathic myelofibrosis: a retrospective study of 103 patients. *Haematologica (Budap).* 75: 228
8. Apaja-Sarkkinen M, Autio-Harminen H, Alavaikko M, Risteli J, Risteli L (1986). Immunohistochemical study of basement membrane proteins and type III procollagen in myelofibrosis. *Br J Haematol.* 63(3): 571-80
9. Assoian RK, Grotendorst GR, Miller DM, Sporn MB (1984). Cellular transformation by coordinated action of three peptide growth factors from human platelets. *Nature.* 309(5971): 804-6
10. Baldus S, Thiele J, Park Y, Charles A, Mross C, Hanisch F, Zirbes T, Wickenhauser C, Fischer R (1995). Carbohydrate and peptide antigens in macrophage populations derived from human bone marrow and milk: an immunomorphological and immunochemical analysis. *Histochem J.* 27: 630
11. Baldus SE, Wickenhauser C, Stefanovic A, Schmitz B, Thiele J, Fischer R (1998). Enrichment of human bone marrow mononuclear phagocytes and characterization of macrophage subpopulations by immunoenzymatic double staining. *Histochem J.* 30(4): 285-91
12. Baldwin A (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins. New discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 14: 649
13. Barosi G (1993). New trends in the treatment of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Forum.* 3.1: 59
14. Barosi G, Ambrosetti A, Buratti A, Finelli C, Liberato NL, Quaglini S, Ricetti MM, Visani G, Tura S, Ascari E (1993). Splenectomy for patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia: pretreatment variables and outcome prediction. *Leukemia.* 7(2): 200-6
15. Barosi G, Grossi A, Comotti B, Musto P, Gamba G, Marchetti M (2001). Safety and efficacy of thalidomide in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol.* 114(1): 78-83
16. Bautista A, Buckler P, Towler H, Dawson A, Bennett B (1984). Measurement of platelets life span in normal subjects and patients with myeloproliferative disease with indium oxine labelled platelets. *Br J Haematol.* 59: 679
17. Bernabei P, Arcangeli A, Casini M (1986). Platelet-derived growth factor(s) mitogenic activity in patients with myeloproliferative disease. *Br J Haematol.* 63: 353

18. Besa E, Nowell P, Geller N, Gardner F (1982). Analysis of the androgen response of 23 patients with agnogenic myeloid metaplasia: the value of chromosomal studies in predicting response and survival. *Cancer*. 49: 308
19. Bessis M (1972). Leucemias myeloides (hemosarcomes leucemique myelocytaires chroniques). In: *Cellules de Sang*. (Ed.) Bessis M, Paris, Masson. p
20. Bessis M, Breton-Gorius J (1962). Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy: A critical review. *Blood*. 19: 634
21. Bonduell M, Sciuccati G, Torres A (1998). Familial idiopathic myelofibrosis and multiple hemangiomas. *Am J Hematol*. 59: 175
22. Bousquet M, Quelen C, De Mas V, Duchayne E, Roquefeuil B, Delsol G, Laurent G, Dastugue N, Brousset P (2005). The t(8;9)(p22;p24) translocation in atypical chronic myeloid leukaemia yields a new PCM1-JAK2 fusion gene. *Oncogene*. 24(48): 7248-52
23. Buhr T, Busche G, Choritz H, Langer F, Kreipe H (2003). Evolution of myelofibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis as evidenced in sequential bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol*. 119(1): 152-8
24. Buhr T, Georgii A, Choritz H (1993). Myelofibrosis in chronic myeloproliferative disorders. Incidence among subtypes according to the Hannover Classification. *Pathol Res Pract*. 189(2): 121-32
25. Burchett S, Weaver W, Westall J, Larsen A, Kronheim S, Wilson C (1988). Regulation of tumor necrosis/cachectin and IL-2 secretion in human mononuclear phagocytes. *J Immunol*. 140: 3473
26. Burkhardt R (1966). Technische Verbesserungen im Anwendungsbereich der Histo-Biopsie von Knochenmark und Knochen. *Klin Wochenschr*. 44: 326
27. Campbell PJ, Griesshammer M, Dohner K, Dohner H, Kusec R, Hasselbalch HC, Larsen TS, Pallisgaard N, Giraudier S, Le Bousse-Kerdiles MC, Desterke C, Guerton B, Dupriez B, Bordessoule D, Fenaux P, Kiladjian JJ, Viallard JF, Briere J, Harrison CN, Green AR, Reilly JT (2006). V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 107(5): 2098-100
28. Carlo-Stella C, Cazzola M, Ganser A (1987). Effects of recombinant alpha and gamma interferons on the in vitro growth of circulating hematopoietic progenitor cells (CFU-MK, BFU-E and CFU-GM) from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Blood*. 70: 1014
29. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Domingo A, Arellano-Rodrigo E, Montserrat E (2005). Efficacy and tolerability of danazol as a treatment for the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: long-term results in 30 patients. *Br J Haematol*. 129(6): 771-5
30. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Hernandez-Boluda JC, Sureda A, Torrebadell M, Montserrat E (2004). Erythropoietin treatment of the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: results in 20 patients and review of the literature. *Br J Haematol*. 127(4): 399-403
31. Cervantes F, Barosi G, Demory J, Reilly J, Guarnone R, Dupriez B, Pereira A, Montserrat E (1998). Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. *Br J Haematol*. 102: 684
32. Cervantes F, Pereira A, Esteve J, Cobo F, Rozman C, Montserrat E (1998). The changing profile of idiopathic myelofibrosis: a comparison of the presenting features of patients diagnosed in two different decades. *Eur J Haematol*. 60: 101

33. Chaiter Y, Brenner B, Aghai E, Tatarsky I (1992). High incidence of myeloproliferative disorders in Ashkenazi Jews in northern Israel. *Leukemia and Lymphoma*. 7: 251
34. Charbord P, Neel H, Caillou B, Kahn E, Paremntier C (1984). Effect of alkylating agents on hematopoiesis in myelofibrosis. *Nouv Rev Fr d'Hematol*. 26: 361
35. Christensen B (1973). Erythrocyte pooling and sequestration in enlarged spleens. Estimations of splenic erythrocyte and plasma volume in splenomegalic patients. *Scand J Haematol*. 10: 106
36. Dalley A, Smith J, Reilly J, MacNeil S (1996). Investigation of calmodulin and basic fibroblast growth factor (bFGF) in idiopathic myelofibrosis: evidence of a role of extracellular calmodulin in fibroblast proliferation. *Br J Haematol*. 93: 856
37. Dameshek W (1951). Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 6: 372
38. Daniel C, Parreira A, Goldman J, McCarthy D (1987). The effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the relationship between growth and differentiation in HL-60 cells. *Leuk Res*. 11: 191
39. Deeg HJ, Gooley TA, Flowers ME, Sale GE, Slattery JT, Anasetti C, Chauncey TR, Doney K, Georges GE, Kiem HP, Martin PJ, Petersdorf EW, Radich J, Sanders JE, Sandmaier BM, Warren EH, Witherspoon RP, Storb R, Appelbaum FR (2003). Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood*. 102(12): 3912-8
40. Deesypris E, Krantz S (1990). Erythropoietin: regulation of erythropoiesis and clinical use. *Adv Pharmacol*. 21: 127
41. Dickstein J, Vardiman J (1995). Hematopathologic findings in the myeloproliferative disorders. *Semin Oncol*. 22: 355
42. Dolan G, Forrest P, Eastham J, Reilly J (1991). Reduced platelet PDGF levels in idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*. 78: 586
43. Dupriez B, Morel P, Demory J, Lai J, Simon M, Plantier I, Bauters F (1996). Prognostic factors of agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood*. 88: 1013
44. Edwards D, Murphy G, Reynolds J, Whitham S, Docherty A, Angel P, Heath J (1987). Transforming growth factor-beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J*. 6: 1899
45. Elliott M, Chen M, Silverstein M, Tefferi A (1997). Splenic irradiation for symptomatic splenomegaly associated with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 90 (supplement 1): 346a
46. Ellis J, Peterson P (1979). The bone marrow in polycythemia vera. *Pathol Ann*. 14: 383
47. Falini B, Pileri S, Gambacor M, Bigerna B, Durkop H, Eitelbach F, Thiele J, Pacini R, Cavaliere A, Martelli M, Cardarelli N, Sabattini E, Poggi S, Stein H (1993). PG-M1: A new monoclonal antibody directed against a fixative-resistant epitope on the macrophage-restricted form of the CD68 molecule. *Am J Pathol*. 142: 1359
48. Falk S, Mix D, Stutte H (1990). The spleen in myelofibrosis. A morphological and immunohistological study of 30 cases. *Virchows Archiv A Pathol Anat*. 416: 437
49. Fedeli G, Certo M, Cannizzaro O, Forti G, Perniola R, Manna R, Gambassi G (1990). Extramedullary hematopoiesis involving the esophagus in myelofibrosis. *Am J Gastroenterol*. 85: 1512

50. Fleit H, Rabinovitch M (1981). Production of interferon by in vitro derived bone marrow macrophages. *Cell Immunol.* 57: 495
51. Frey B, Rafii S, Teterson M (1998). Adenovector-mediated expression of human thrombopoietin cDNA in immune-compromised mice: Insights into the pathophysiology of osteomyelofibrosis. *J Immunol.* 160: 691
52. Gadd S, Ashman L (1983). Binding of mouse monoclonal antibodies to human leukemic cells via the Fc-receptor: a possible source of "false positive" reaction in specificity screening. *Clin Exp Immunol.* 54: 811
53. Geary C, Clinical and hematological aspects of chronic myelofibrosis., in *Myelofibrosis: Pathophysiology and clinical management.*, S.M. Lewis, Editor. 1985, Marcel Dekker: New York. p. 15-49.
54. Georgii A, Buesche G, Kreft A (1998). The histopathology of chronic myeloproliferative diseases. *Baillieres Clin Haematol.* 11(4): 721-49
55. Georgii A, Buhr T, Buesche G, Kreft A, Choritz H (1996). Classification and staging of Ph-negative myeloproliferative disorders by histopathology from bone marrow biopsies. *Leuk Lymphoma.* 22 Suppl 1: 15-29
56. Georgii A, Vykoupil K, Buhr T, Choritz H, Dohler U, Kaloutsi V, Werner M (1990). Chronic myeloproliferative disorders in bone marrow biopsies. *Pathol Res Pract.* 186: 3
57. Georgii A, Vykoupil K, Thiele J (1984). Classification of chronic myeloproliferative diseases by bone marrow biopsies. Hematological and cytogenetic findings and clinical course. *Bibl Haematol.* 50: 41
58. Georgii A, Vykoupil KF, Buhr T, Choritz H, Dohler U, Kaloutsi V, Werner M (1990). Chronic myeloproliferative disorders in bone marrow biopsies. *Pathol Res Pract.* 186(1): 3-27
59. Gersuk G, Carmel R, Pattengale P (1989). Platelet-derived growth factor concentrations in plasma and urine from patients with myeloproliferative disorders. *Blood.* 14: 2330
60. Gilbert H (1973). The spectrum of myeloproliferative disorders. *Med Clin North Am.* 57: 355
61. Gilbert H, Praloran V, Stanley R (1989). Increased circulating CSF-1 (M-CSF) in myeloproliferative disease: Association with myeloid metaplasia and peripheral bone marrow extension. *Blood.* 74: 1231
62. Golde D, Hocking W, Quan S, Sparkes R, Gale R (1980). Origin of human bone marrow fibroblasts. *Br J Haematol.* 44: 183
63. Gorelik L, Flavell RA (2002). Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol.* 2(1): 46-53
64. Griesinger F, Hennig H, Hillmer F, Podleschny M, Steffens R, Pies A, Wormann B, Haase D, Bohlander SK (2005). A BCR-JAK2 fusion gene as the result of a t(9;22)(p24;q11.2) translocation in a patient with a clinically typical chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 44(3): 329-33
65. Groopman J (1980). The pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferative disorders. *Ann Intern Med.* 92: 857
66. Groopman J, Golde D (1981). The histiocytic disorders: a pathophysiological analysis. *Ann Intern Med.* 94: 95
67. Guardiola P, Anderson J, Bandini B (1998). Allogenic bone marrow transplantation for agnogenic myeloid metaplasia. An EBMT/F. Hutchinsonson CRC/SFGM collaborative study. 24th Annual Meeting European Group for Blood and Marrow Transplantation, Courmayeur, Italy, March 22-26. .
68. Guardiola P, Anderson JE, Gluckman E (2000). Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med.* 343(9): 659; author reply 659-60

69. Guesdon J, Ternynck T, Avrameas S (1979). The use of avidinbiotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem.* 27: 1131
70. Haedersdal C, Hasselbalch H, Devantier A, Saunamäki K (1985). Pericardial haematopoiesis with tamponade in myelofibrosis. *Scand J Haematol.* 34: 270
71. Hanspal M, Hanspal J (1994). The association of erythroblasts with macrophages promotes erythroid proliferation and maturation; A 30-kD heparin-binding protein is involved in this contact. *Blood.* 84: 3494
72. Hasselbalch H (1990). Idiopathic myelofibrosis. A clinical study of 80 patients. *Am J Hematol.* 34: 291
73. Hasselbalch H (1990). Idiopathic myelofibrosis: a review. *Eur J Haematol.* 45: 65
74. Hasselbalch H (1993). Idiopathic myelofibrosis - an update with particular reference to clinical aspects and prognosis. *Int J Clin Lab Res.* 23: 124
75. Hasselbalch H, Berild D, Paaske-Hansen O (1984). Red-cell sensitisation in myelofibrosis. *Scand J Haematol.* 32: 179
76. Hasselbalch H, Junker P, Lisse I, Lindqvist U, Laurent A (1991). Circulating hyaluronan in the myelofibrosis/osteomyelosclerosis syndrom and other myeloproliferative disorders. *Am J Hematol.* 36: 1
77. Hasselbalch H, Lisse I (1991). A sequential histological study of bone marrow fibrosis in idiopathic myelofibrosis. *Eur J Haematol.* 46: 285
78. Hayhoe F, Flemans R, Cowling D (1979). Acquired lipidosis of marrow macrophages. Birefringent blue crystals and Gaucher-like cells, sea-blue histiocytes, and grey-green crystals. *J of Clin Pathol.* 32: 420
79. Heis-Vahidi-Fard N, Forberg E, Eichinger S, Chott A, Lechner K, Gisslinger H (2001). Ineffectiveness of interferon-gamma in the treatment of idiopathic myelofibrosis: a pilot study. *Ann Hematol.* 80(2): 79-82
80. Heuck G (1879). Zwei Fälle von Leukämie mit eigentümlichen Blut - respektive Knochenmarksbefund. *Virchows Arch.* 78: 475
81. Howarth J, Waters H, Hyde K, Geary C (1989). Detection of erythroid hypoplasia in myelofibrosis using erythrokinetic studies. *J Clin Pathol.* 42: 1250
82. Hsu S, Raine L (1982). Versatility of biotin-labeled lectins and avidin-biotin-peroxidase complex for localization of carbohydrate in tissue sections. *J Histochem Cytochem.* 30: 157
83. Inaba K, Kitaura M, Kato T, Watanabe Y, Kawada Y, Muramatsu S (1986). Contrasting effect of alpha/beta and gamma-interferons on expression of macrophage Ia antigens. *J Exp Med.* 163: 1030
84. Jacobsen R, Salo A, Fialkow P (1978). Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary fibrosis. *Blood.* 51: 189
85. Jamshidi K, Swaim W (1971). Bone marrow biopsy with unaltered architecture: a new biopsy device. *J Lab Clin Med.* 77: 335
86. Jelkmann W (1998). Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res.* 18: 555
87. Johnston J, Dalal B, Israels S (1995). Deposition of transforming growth factor-beta in the marrow in myelofibrosis and the intracellular localization and secretion of TGF-beta by leukemic cells. *Am J Clin Pathol.* 103: 574
88. Johnston R (1988). Current concepts: immunology, monocytes and macrophages. *N Engl J Med.* 318: 747
89. Johnston R (1988). Monocytes and macrophages. *New Engl J Med.* 318: 747
90. Kahn A, Bernard J, Cottreau D (1975). A deficient G-6-PG variant with hemizygous expression in blood cells of a woman with primary myelofibrosis. *Humangenetik.* 30: 41

91. Katoh O, Kimura A, Kutamoto A (1990). Platelet-derived growth factor messenger RNA is increased in bone marrow megacaryocytes in patients with myeloproliferative disorders. *Am J Hematol.* 35: 145
92. Keller R (1987). *Immunologie und Immunpathologie.* 3. Auflage. , Thieme Verlag, Stuttgart. .
93. Keller R, Joller P, Keist R, Binz H, van d, Meide, P (1988). Modulation of major histocompatibility complex (MHC) expression by interferons and microbial agents. *Scand J Immunol.* 28: 113
94. Kelsey P, Geary C (1987). Management of idiopathic myelofibrosis. *Clin Lab Haematol.* 9: 1
95. Kelsey P, Geary C (1988). Sea-blue histiocytes and gaucher-cells in the bone marrow of patients with chronic myeloid leukaemia. *J Clin Path.* 41: 960
96. Kessler C, Klein H, Harlik R (1982). Uncontrolled thrombocytosis in chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol.* 50: 157
97. Kimura A, Katoh O, Hyodo H, Kuramoto A (1989). Transforming growth factor-beta regulates growth as well as collagen and fibronectin sythesis of human marrow fibroblasts. *Br J Haematol.* 72: 486
98. Kimura A, Katoh O, Kuramoto A (1988). Effects of platelet derived growth factor, epidermal growth factor and transforming growth factor-beta on the growth of human marrow fibroblasts. *Br J Haematol.* 69(1): 9-12
99. Kitagawa M, Kamiyama R, Kasuga T (1993). Increase in number of bone marrow macrophages in patients with myelodysplastic syndromes. *Eur J Haematol.* 51: 56
100. Köller M, Willheim M, Krugluger W (1996). Immunophenotyping of human bone marrow-derived macrophages. *Scand J Immunol.* 43: 626
101. Koury M, Bondurant M (1990). Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed death in erythroid progenitor cells. *Science.* 248: 378
102. Koury M, Kelley L, Bondurant M (1994). The fate of erythroid progenitor cells. *Ann NY Acad Sci.* 718: 259
103. Kreipe H, Jaquet K, Felgner J (1991). Clonal granulocytes and marrow cells in the cellular phase of agnogenic myeloid metaplasia. *Blood.* 78: 1814
104. Kreipe H, Jaquet K, Felgner J, Heidorn K, Radzu H, Parwaresch R (1992). DNA analysis to aid in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders. *Am J Clin Pathol.* 98: 46
105. Kroger N, Mesa RA (2008). Choosing between stem cell therapy and drugs in myelofibrosis. *Leukemia.* 22(3): 474-86
106. Kroger N, Zabelina T, Schieder H, Panse J, Ayuk F, Stute N, Fehse N, Waschke O, Fehse B, Kvasnicka HM, Thiele J, Zander A (2005). Pilot study of reduced-intensity conditioning followed by allogeneic stem cell transplantation from related and unrelated donors in patients with myelofibrosis. *Br J Haematol.* 128(5): 690-7
107. Kurihara N (1990). The origin of osteoclasts. *Bull Kanagawa Dent Coll.* 18(2): 161-4
108. Kvasnicka H, Thiele J, Schmitt-Graeff A, Schaefer H (2000). Prognostic factors and survival in chronic myeloproliferative disorders. *Pathologe.* 21: 63
109. Kvasnicka H, Thiele J, Werden C, Zankovich R, Diehl V, Fischer R (1997). Prognostic factors in idiopathic (primary) osteomyelofibrosis. *Cancer.* 80: 708
110. Kvasnicka HM, Thiele J (2006). The impact of clinicopathological studies on staging and survival in essential thrombocythemia, chronic idiopathic myelofibrosis, and polycythemia rubra vera. *Semin Thromb Hemost.* 32(4 Pt 2): 362-71

111. Kvasnicka HM, Thiele J, Werden C, Zankovich R, Diehl V, Fischer R (1997). Prognostic factors in idiopathic (primary) osteomyelofibrosis. *Cancer*. 80(4): 708-19
112. Lacronique V, Boureux A, Valle VD, Poirel H, Quang CT, Mauchauffe M, Berthou C, Lessard M, Berger R, Ghysdael J, Bernard OA (1997). A TEL-JAK2 fusion protein with constitutive kinase activity in human leukemia. *Science*. 278(5341): 1309-12
113. Laiho M, Saksela O, Keski-Oja J (1987). Transforming growth factor-beta induction of type-1 plasminogen activator inhibitor. *J Biol Chem*. 262: 17467
114. Laszlo J (1975). Myeloproliferative disorders (MPD): Myelofibrosis, myelosclerosis, extramedullary hematopoiesis, undifferentiated MPD and hemorrhagic thrombocythaemia. *Semin Hematol*. 12: 75
115. Le Bousse-Kerdiles M, Chevillard S, Charpentier A (1996). Differential expression of transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor and their receptors in CD34 positive haematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Blood*. 88: 4534
116. Le Bousse-Kerdiles MC, Martyre MC (1999). Dual implication of fibrogenic cytokines in the pathogenesis of fibrosis and myeloproliferation in myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Ann Hematol*. 78(10): 437-44
117. Lee S (1991). Phenotypic analysis of human bone marrow macrophages. *Blood cells*. 17: 45
118. Lee S, Crocker P, Westaby S, Key N, Mason D, Gordon S, Weatherall D (1988). Isolation and immunocytochemical characterization of human bone marrow stromal macrophages in hemopoietic clusters. *J Exp Med*. 168: 1193
119. Leinweber C, Order S, Calkins A (1991). Whole-abdominal irradiation for the management of gastrointestinal and abdominal manifestations of agnogenic myeloid metaplasia. *Cancer*. 68: 1251
120. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG (2005). Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 7(4): 387-97
121. Lewis S (1985). Myelofibrosis: Pathophysiology and clinical management. *Hematol*. 4: 1
122. Lofvenberg E, Wahlin A, Roos G, Ost A (1990). Reversal of myelofibrosis by hydroxyurea. *European J Haematol*. 44: 33
123. Lohmann T, Beckmann E (1983). Progressive myelofibrosis in agnogenic myeloid metaplasia. *Arch Pathol Lab*. 107: 593
124. Maddox D, Shibata S, Goldstein I (1982). Stimulated macrophages express a new glycoprotein receptor reactive with Griffonia simplicifolia I-B4 isolectin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 79: 166
125. Mallowh A, Rahman S (1992). Agnogenic myeloid metaplasia in children. *Am J Dis Child*. 146: 965
126. Manoharan A, Pitney W (1984). Chemotherapy resolves symptoms and reverses fibrosis in myelofibrosis. *Scand J Haematol*. 33: 453
127. Martyre M (1995). TGF-beta and megacaryocytes in the pathogenesis of myelofibrosis in myeloproliferative disorders. *Leuk Lymph*. 20: 39

128. Martyre M, Le B-K, M, Romquin N (1997). Elevated levels of basic fibroblast growth factor in megakaryocytes and platelets from patients with idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol.* 97: 441
129. Martyre M, Magdelenat H, Bryckaert M (1991). Increased intraplatelet levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta in patients with myeloid metaplasia. *Br J Haematol.* 77: 80
130. Maschek H, Georgii A, Kaloutsi V, Werner M, Bandekar K, Kressel MG, Choritz H, Freund M, Hufnagl D (1992). Myelofibrosis in primary myelodysplastic syndromes: a retrospective study of 352 patients. *Eur J Haematol.* 48(4): 208-14
131. McCarthy D (1985). Fibrosis of the bone marrow: Content and clinical causes. *Br J Haematol.* 59: 1
132. McKercher S, Torbett B, Anderson K, Henkel G, Vestal D, Baribault H (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBRO J.* 15: 5647
133. Mercher T, Wernig G, Moore SA, Levine RL, Gu TL, Frohling S, Cullen D, Polakiewicz RD, Bernard OA, Boggon TJ, Lee BH, Gilliland DG (2006). JAK2T875N is a novel activating mutation that results in myeloproliferative disease with features of megakaryoblastic leukemia in a murine bone marrow transplantation model. *Blood.* 108(8): 2770-9
134. Mesa R, Tefferi A, Jacobsen S (1997). The incidence and epidemiology of essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia. An Olsted County study. *Blood.* 90 (supplement 1): 347a
135. Mesa RA, Elliott MA, Schroeder G, Tefferi A (2004). Durable responses to thalidomide-based drug therapy for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Mayo Clin Proc.* 79(7): 883-9
136. Mesa RA, Tefferi A, Elliott MA, Hoagland HC, Call TG, Schroeder GS, Yoon SY, Li CY, Gray LA, Margolin S, Hook CC (2001). A phase II trial of pirfenidone (5-methyl-1-phenyl-2-[1H]-pyridone), a novel anti-fibrosing agent, in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol.* 114(1): 111-3
137. Michiels J, Kutti J, Stark P, Bazzan M, Gugliotta L, Marchiolo R, Griesshammer M, Biere J, Kaladjian J, Berlin N, Hasselbalch H, Kvasnicka H, Thiele J, Cervantes F, et. al. (1999). Diagnosis, pathogenesis and treatment of the myeloproliferative disorders essential thrombocythemia, polycythemia vera and essential megakaryocytic granulocytic metaplasia and myelofibrosis. *Neth J Med.* 54: 46
138. Michiels JJ, Kutti J, Stark P, Bazzan M, Gugliotta L, Marchioli R, Griesshammer M, van Genderen PJ, Briere J, Kiladjian JJ, Barbui T, Finazzi G, Berlin NI, Pearson TC, Green AC, Fruchtman SM, Silver RT, Hansmann E, Wehmeier A, Lengfelder E, Landolfi R, Kvasnicka HM, Hasselbalch H, Cervantes F, Thiele J, et al. (1999). Diagnosis, pathogenesis and treatment of the myeloproliferative disorders essential thrombocythemia, polycythemia vera and essential megakaryocytic granulocytic metaplasia and myelofibrosis. *Neth J Med.* 54(2): 46-62
139. Moriola Y, Naito M, Sato T, Takahashi K (1994). Immunophenotypic and ultrastructural heterogeneity of macrophage differentiation in bone marrow and fetal hematopoiesis of mouse in vitro and in vivo. *J Leukocyte Biol.* 55: 642
140. Murate T, Yamashita K, Isogai C (1997). The production of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in megakaryopoiesis: possible role of platelet- and megakaryocyte-derived TIMPs in bone marrow fibrosis. *Br J Haematol.* 99: 181

141. Murati A, Gelsi-Boyer V, Adelaide J, Perot C, Talmant P, Giraudier S, Lode L, Letessier A, Delaval B, Brunel V, Imbert M, Garand R, Xerri L, Birnbaum D, Mozziconacci MJ, Chaffanet M (2005). PCM1-JAK2 fusion in myeloproliferative disorders and acute erythroid leukemia with t(8;9) translocation. *Leukemia*. 19(9): 1692-6
142. Najean Y, Cacchione R, Castro-Malaspina H, Dresch C (1978). Erythrokinetic studies in myelofibrosis: their significance for prognosis. *Br J Haematol*. 40: 205
143. Nathan C, Murray H, Cohn Z (1980). The macrophage as an effector cell. *New Engl J Med*. 303: 622
144. Njoku O, Lewis S, Catovsky D, Gordon-Smith E (1983). Anemia in myelofibrosis: its value in prognosis. *Br J Haematol*. 54: 79
145. North R (1978). The concept of the activated macrophage. *J Immunol*. 121: 806
146. Oberholzer M (1983). *Morphometrie in der Kinischen Pathologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. .
147. Ohsaka A, Miura Y, Takahashi A, Yokoyama T (1991). Morphometric analysis of myelofibrosis in agnogenic myeloid metaplasia and chronic myelogenous leukemia. *Virchows Arch*. 60: 399
148. Orazi A, O'Malley DP, Jiang J, Vance GH, Thomas J, Czader M, Fang W, An C, Banks PM (2005). Acute panmyelosis with myelofibrosis: an entity distinct from acute megakaryoblastic leukemia. *Mod Pathol*. 18(5): 603-14
149. Papayannopoulou T, Abkowitz J, Biology of erythropoiesis, erythroid differentiation and maturation., in *Hematology: basic principles and practice.*, R. Hoffan, et al., Editors. 1991, Churchill Livingston: New York. p. 252.
150. Peeters P, Raynaud SD, Cools J, Wlodarska I, Grosgeorge J, Philip P, Monpoux F, Van Rompaey L, Baens M, Van den Berghe H, Marynen P (1997). Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia. *Blood*. 90(7): 2535-40
151. Pereira A, Cervantes F, Bruges R, Rozman C (1990). Bone marrow histopathology in primary myelofibrosis: clinical and haematologic correlations and prognostic evaluation. *Eur J Haematol*. 44: 95
152. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL (2006). MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 3(7): e270
153. Poulsen LW, Melsen F, Bendix K (1998). A histomorphometric study of haematological disorders with respect to marrow fibrosis and osteosclerosis. *Apmis*. 106(4): 495-9
154. Pulford K, Rigney E, Micklem K, Jones M, Stross W, Gatter K, Mason D (1989). KP1: a new antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections. *J Clin Pathol*. 42: 414
155. Radley J, Haller C (1983). Fate of senescent megacaryocytes in the bone marrow. *BR J Haematol*. 53: 277
156. Rameshwar P, Chang V, Gascon P (1996). Implications of CD44 in adhesion-mediated overproduction of TGF-beta and IL-1 in monocytes from patients with bone marrow fibrosis. *Br J Haematol*. 93: 22
157. Rameshwar P, Denny T, Stein D, Gascon P (1994). Monocyte adhesion in patients with bone marrow fibrosis is required for the production of fibrogenic cytokines. Potential role for interleukin-1 and TGF-beta. *J Immunol*. 153: 2819

158. Rameshwar P, Ramaswamy N, Qian J, Denny T, Colon C, Gascon P (2000). NF-kappa B as a Central Mediator in the Induction of TGF-beta in Monocytes from Patients with Idiopathic Myelofibrosis: An Inflammatory Response Beyond the Realm of Homeostasis. *J Immunol.* 165: 2271
159. Reilly J (1992). Pathogenesis of idiopathic myelofibrosis: Role of growth factors. *J Clin Pathol.* 45: 461
160. Reilly J (1994). Pathogenesis of idiopathic myelofibrosis: present status and future directions. *Br J Haematol.* 88: 1
161. Reilly J (1998). Pathogenesis and management of idiopathic myelofibrosis. *Baillieres Clin Haematol.* 11: 751
162. Reilly J, Brindley L, Kay M (1995). Bone marrow and serum connective tissue polypeptides in idiopathic myelofibrosis. *Clin Lab Haematol.* 17: 35
163. Reilly J, Snowden J, Spearing R (1997). Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: a study of 106 cases. *Br J Haematol.* 98: 96
164. Reiter A, Walz C, Watmore A, Schoch C, Blau I, Schlegelberger B, Berger U, Telford N, Aruliah S, Yin JA, Vanstraelen D, Barker HF, Taylor PC, O'Driscoll A, Benedetti F, Rudolph C, Kolb HJ, Hochhaus A, Hehlmann R, Chase A, Cross NC (2005). The t(8;9)(p22;p24) is a recurrent abnormality in chronic and acute leukemia that fuses PCM1 to JAK2. *Cancer Res.* 65(7): 2662-7
165. Riccardi-Castagnoli P, Paglia P (1992). New tools for investigating macrophage differentiation. *Res Immunol.* 143: 101
166. Robinson B, Quesenberry P (1990). Hematopoietic growth factors: overview and clinical applications. Parts I, II, III. *Am J Med Sci.* 300: 163-170, 237-244, 311-321
167. Rondelli D, Barosi G, Bacigalupo A, Prchal JT, Popat U, Alessandrino EP, Spivak JL, Smith BD, Klingemann HG, Fruchtman S, Hoffman R (2005). Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning in intermediate- or high-risk patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood.* 105(10): 4115-9
168. Rozman C, Giralt M, Feliu R, Rubio D, Cortes M (1991). Life expectancy of patients with chronic nonleukemic myeloproliferative disorders. *Cancer.* 67: 2658
169. Schmidt A, Blanchet O, Dib M, Basle MF, Ifrah N, Chappard D (2007). Bone changes in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a histomorphometric and microcomputed tomographic study. *Eur J Haematol.* 78(6): 500-9
170. Schmitz B, Thiele J, Kaufmann R, Witte O, Wickenhauser C, Kuhn-Regnier F, Fischer R (1995). Megacaryocytes and fibroblasts-interaction as determined in normal human bone marrow. *Leukemia Res.* 19: 629
171. Schofield J, Shun J, Cerio R, Grice K (1990). Cutaneous extramedullary hematopoiesis with preponderance of atypical megakaryocytes in myelofibrosis. *J Am Acad Dermatol.* 22: 334
172. Silverstein M, Agnogenic myeloid metaplasia, A.M.E.P.S.G. Inc., Editor. 1975: Boston. p. 1.
173. Silverstein M (1976). The evolution into and the treatment of late stage polycythemia vera., *Semin Haematol.* 13: 79
174. Silverstein M, Agnogenic myeloid metaplasia., in Hematology, E. Beutler and A.J. Erslev, Editors. 1983, McGraw-Hill: New York. p. 214.
175. Silverstein M, Treatment of myelofibrosis., in Myelofibrosis: pathophysiology and clinical management., S.M. Lewis, Editor. 1985, Marcel Decker: New York. p. 195.

176. Smith B (1990). Regulation of hematopoiesis. *Yale J Biol Med.* 63: 371
177. Steensma DP, Mesa RA, Li CY, Gray L, Tefferi A (2002). Etanercept, a soluble tumor necrosis factor receptor, palliates constitutional symptoms in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia: results of a pilot study. *Blood.* 99(6): 2252-4
178. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Fourth Edition. Fourth Edition ed.
179. Szur L, Smith M (1961). Red cell destruction and destruction in myelosclerosis. *Br J Haematol.* 7: 147
180. Tefferi A (2000). Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med.* 27: 1255
181. Tefferi A (2003). Treatment approaches in myelofibrosis with myeloid metaplasia: the old and the new. *Semin Hematol.* 40(1 Suppl 1): 18-21
182. Tefferi A, Elliot MA, Yoon SY, Li CY, Mesa RA, Call TG, Dispenzieri A (2001). Clinical and bone marrow effects of interferon alfa therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood.* 97(6): 1896
183. Tefferi A, Siverstein M, No I (1995). Agnogenic myeloid metaplasia. *Sem Oncol.* 22: 327
184. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, Barosi G, Verstovsek S, Birgegard G, Mesa R, Reilly JT, Gisslinger H, Vannucchi AM, Cervantes F, Finazzi G, Hoffman R, Gilliland DG, Bloomfield CD, Vardiman JW (2007). Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood.* 110(4): 1092-7
185. Terui T, Nitsu Y, Mahara K (1990). The production of transforming growth factor-beta in acute megacaryoblastic leukemia and its possible implication in myelofibrosis. *Blood.* 75: 1540
186. Thiele J, Braeckel C, Wagner S, Falili B, Dienemann D, Stein H, Fischer R (1992). Macrophages in normal human bone marrow and in chronic myeloproliferative disorders: an immunohistochemical and morphometric study by a new monoclonal antibody (PG-M1) on trephine biopsies. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 421: 33
187. Thiele J, Chen YS, Kvasnicka HM, Diehl V, Fischer R (1994). Evolution of fibro-osteosclerotic bone marrow lesions in primary (idiopathic) osteomyelofibrosis--a histomorphometric study on sequential trephine biopsies. *Leuk Lymphoma.* 14(1-2): 163-9
188. Thiele J, Fischer R (1989). Histomorphologic findings of the bone marrow in chronic myeloproliferative diseases. *Z Hautkr.* 64: 903
189. Thiele J, Fohlmeister I, Vonneguth B, Zankovich R, Fischer R (1986). The prognostic implication of clinical and histological features in Ph-positive-chronic-myelocytic leukaemia (CML). *Anti Cancer Res.* 6: 1401
190. Thiele J, Grashof K, Fischer R (1991). Follow-up study on bone marrow reticulin fibrosis in AML. *Anal Cell Pathol.* 3: 225
191. Thiele J, Hoepfner B, Wienhold S, Schneider G, Fischer R, Zankovich R (1989). Osteoclasts and bone remodeling in chronic myeloproliferative disorders. A histochemical and morphometric study on trephine biopsies in 165 patients. *Pathol Res Pract.* 184: 591
192. Thiele J, Hoepfner B, Zankovich R, Fischer R (1989). Histomorphometry of bone marrow biopsies in primary osteomyelofibrosis/-sclerosis (agnogenic

- myeloid metaplasia) - correlations between clinical and morphological features. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 415: 191
193. Thiele J, Klein H, Falk S, Bertsch H, Fischer R, Stutte H (1992). Splenic megakaryocytopoiesis in primary (idiopathic) osteomyelofibrosis. An immunohistological and morphometric study with comparison of corresponding bone marrow features. *Acta Haematol.* 87: 176
 194. Thiele J, Kuemmel T, Sander C, Fischer R (1991). Ultrastructure of bone marrow tissue in so-called primary (idiopathic) myelofibrosis-osteomyelosclerosis (agnogenic myeloid metaplasia). I. Abnormalities of megakaryopoiesis and thrombocytes. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 23: 93
 195. Thiele J, Kvasnicka H, Beelen D, Wenzel P, Koepke M, Leder L, Schaefer U (2000). Macrophages and their subpopulations following allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia. *Virchows Arch.* 437: 160
 196. Thiele J, Kvasnicka H, Diehl V, Fischer R, Michiels J (1999). Clinicopathological diagnosis and differential criteria of thrombocythemias in various myeloproliferative disorders by histopathology, histochemistry and immunostaining from bone marrow biopsies. *Leuk Lymphoma.* 33: 207
 197. Thiele J, Kvasnicka H, Fischer R, Diehl V (1997). Clinicopathological impact of the interaction between megakaryocytes and myeloid stroma in chronic myeloproliferative disorders: a concise update. *Leuk Lymphoma.* 24: 463
 198. Thiele J, Kvasnicka H, Schmitt-Graeff A, Zirbes T, Birnbaum F, Kressmann C, Melguizo-Grahmann M, Frackenpohl H, Springmann C, Leder L, Diehl V, Fischer R (2000). Bone marrow features and clinical findings in chronic myeloid leukemia--a comparative, multicenter, immunohistological and morphometric study on 614 patients. *Leuk Lymphoma.* 36: 295
 199. Thiele J, Kvasnicka H, Steinberg T, Zankovich R, Fischer R, Diehl V (1992). Survival in primary (idiopathic) osteomyelofibrosis, so-called agnogenic myeloid metaplasia. *Leuk Lymph.* 6: 389
 200. Thiele J, Kvasnicka H, Titius B, Parpert U, Nebel R, Zankovich R, Dienemann D, Stein H, Diehl V, Fischer R (1993). Histological features of prognostic significance in CML - an immunohistochemical and morphometric study (multivariate regression analysis) on the trephine biopsies of the bone marrow. *Ann Hematol.* 66: 291
 201. Thiele J, Kvasnicka HM (2006). A critical reappraisal of the WHO classification of the chronic myeloproliferative disorders. *Leuk Lymphoma.* 47(3): 381-96
 202. Thiele J, Kvasnicka HM (2006). Myelofibrosis in chronic myeloproliferative disorders--dynamics and clinical impact. *Histol Histopathol.* 21(12): 1367-78
 203. Thiele J, Kvasnicka HM, Diehl V (2005). Standardization of bone marrow features--does it work in hematopathology for histological discrimination of different disease patterns? *Histol Histopathol.* 20(2): 633-44
 204. Thiele J, Kvasnicka HM, Diehl V, Fischer R, Michiels J (1999). Clinicopathological diagnosis and differential criteria of thrombocythemias in various myeloproliferative disorders by histopathology, histochemistry and immunostaining from bone marrow biopsies. *Leuk Lymphoma.* 33(3-4): 207-18
 205. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A (2005). European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica.* 90(8): 1128-32
 206. Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, Diehl V (2003). Dynamics of fibrosis in chronic idiopathic (primary) myelofibrosis during therapy: a follow-up study on 309 patients. *Leuk Lymphoma.* 44(6): 949-53

207. Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, Zankovich R, Diehl V (2002). Follow-up examinations including sequential bone marrow biopsies in essential thrombocythemia (ET): a retrospective clinicopathological study of 120 patients. *Am J Hematol.* 70(4): 283-91
208. Thiele J, Kvasnicka HM, Vardiman J (2006). Bone marrow histopathology in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders: a forgotten pearl. *Best Pract Res Clin Haematol.* 19(3): 413-37
209. Thiele J, Kvasnicka HM, Werden C, Zankovich R, Diehl V, Fischer R (1996). Idiopathic primary osteo-myelofibrosis: a clinico-pathological study on 208 patients with special emphasis on evolution of disease features, differentiation from essential thrombocythemia and variables of prognostic impact. *Leuk Lymphoma.* 22(3-4): 303-17
210. Thiele J, Kvasnicka HM, Zirbes TK, Baldus SE, Djuren O, Lienhard H, Lorenzen J, Leder LD, Niederle N, Fischer R (1996). Effects of interferon treatment on the macrophage population in the bone marrow of patients with Ph1+-CML. *Hematopathol Mol Hematol.* 10(4): 201-12
211. Thiele J, Rompcik V, Wagner S, Fischer R (1992). Vascular architecture and collagen type IV in primary myelofibrosis and polycythaemia vera: an immunomorphometric study on trephine biopsies of the bone marrow. *Br J Haematol.* 80: 227
212. Thiele J, Simon K, Fischer R, Zankovich R (1988). Follow-up studies with sequential bone marrow biopsies in chronic myeloid leukaemia and so-called primary (idiopathic) osteo-myelofibrosis. Evolution of histopathological lesions and clinical course in 40 patients. *Pathol Res Pract.* 183: 434
213. Thiele J, Steinberg T, Zankovich R, Fischer R (1989). Primary myelofibrosis-osteomyelosclerosis (agnogenic myeloid metaplasia): correlation of clinical findings with bone marrow histopathology and prognosis. *Anticancer Res.* 9: 429
214. Thiele J, Thienel C, Zankovich R, Fischer R (1988). Prognostic features at diagnosis of chronic myeloid leukaemia with special emphasis on histological parameters. *Med Oncol Tumor Pharmacother.* 5: 49
215. Thiele J, Titius BR, Kvasnicka HM, Rechmeier W, Fischer R (1994). Megakaryopoiesis in chronic myeloproliferative disorders: immunohistochemical evaluation of endoreduplicative activity by PCNA-staining reaction. *Anal Cell Pathol.* 7(1): 63-75
216. Thiele J, Windecker R, Kvasnicka HM, Titius BR, Zankovich R, Fischer R (1994). Erythropoiesis in primary (idiopathic) osteomyelofibrosis: quantification, PCNA-reactivity, and prognostic impact. *Am J Hematol.* 46(1): 36-42
217. Thiele J, Zankovich R, Steinberg T, Fischer R, Diehl V (1989). Agnogenic myeloid metaplasia (AMM) - correlation of bone marrow lesions with laboratory data: a longitudinal clinicopathological study on 114 patients. *Hematol Oncol.* 7: 327
218. Thiele J, Zankovich R, Steinberg T, Kremer B, Fischer R, Diehl V (1989). Primary (essential) thrombocythemia versus initial (hyperplastic) stages of agnogenic myeloid metaplasia with thrombocytosis - a critical evaluation of clinical and histomorphological data. *Acta Haematol.* 81: 192
219. Titius B, Thiele J, Schaefer H, Kreipe H, Fischer R (1994). Ki-S1 and proliferating cell nuclear antigen expression of bone marrow macrophages. Immunohistochemical and morphometric study including reactive

- (inflammatory) myelitis, secondary aplastic anemia, AIDS, myelodysplastic syndromes and primary (idiopathic) osteomyelofibrosis. *Acta Haematol.* 91: 144
220. Tzeng D, Deuel T, Huang J, Baehner R (1985). Platelet-derived growth factor promotes human peripheral monocyte activation. *Blood.* 66: 179
 221. Umeda S, Takahashi K, Naito M (1996). Neonatal changes of osteoclasts in osteopetrosis (op/op) mice defective in production of functional macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) protein and effects of M-CSF on osteoclast development and differentiation. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 28: 13
 222. Unanne E (1984). Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu Rev Immunol.* 2: 395
 223. Vallespi T, Imbert M, Mecucci C, Preudhomme C, Fenaux P (1998). Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 83(3): 258-75
 224. van Furth R, Cells of the mononuclear phagocyte system. Nomenclature in term of sites and conditions., in *Mononuclear phagocytes; Functional aspects. Part I.* 1980, Martinus Nejhoff Publishers: The Hagen. p. 1.
 225. van Furth R (1982). Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiol.* 161: 178
 226. van Furth R, New perspectives on the kinetics of the mononuclear phagocytes., in *Mononuclear Phagocytes. Characteristics, Physiology and Function.*, R. van Furth, Editor. 1998, Martius Nejhoff Publishers: Dordrecht. p. 201.
 227. van Furth R, Cohn Z, Hirsch J, Humphrey J, Spector W, Langevoort H (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. *Bull WHO.* 46: 845
 228. Vardiman JW BR, Harris NL, WHO histological classification of chronic myeloproliferative diseases., in *World Health Organization Classification of Tumors: Tumors of the Haematopoetic and Lymphoid Tissues.*, H.N. Jaffe ES, Stein H, Vardiman JW, Editor. 2001, International Agency for Reseach on Cancer (IARC) Press Lyon, France. p. 17-44.
 229. Varki A, Lottenborg R, Griffith R, Reinhard E (1983). The syndrome of idiopathic myelofibrosis. A clinicopathologic review with emphasis on the prognostic variables predicting survival. *Medicine (Baltimore).* 62: 353
 230. Vellenga E, Mulder N, Nieweg H (1982). A study of the cellular and humoral immune response in patients with myelofibrosis. *Clin Lab Haematol.* 4: 239
 231. Videbaek A, Christensen B, Jonsson V (1982). *The spleen in health and disease.* Chicago, London: Year Book Medical Publishers. .
 232. Visani G, Finelli C, Castelli U, Petti M, Vianelli N, Gianni L, Pileri S, Morra E (1990). Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. *Br J Haematol.* 75: 4
 233. Vogt C, Pentz S, Rich I (1989). A role for the macrophage in normal hemopoiesis. III. In vivo and in vitro erythropoietin gene expression in macrophages detected by in situ hybridization. *Exp Haematol.* 17: 391
 234. Wagner-Ballon O, Chagraoui H, Prina E, Tulliez M, Milon G, Raslova H, Villeval JL, Vainchenker W, Giraudier S (2006). Monocyte/macrophage dysfunctions do not impair the promotion of myelofibrosis by high levels of thrombopoietin. *J Immunol.* 176(11): 6425-33
 235. Walters DK, Mercher T, Gu TL, O'Hare T, Tyner JW, Loriaux M, Goss VL, Lee KA, Eide CA, Wong MJ, Stoffregen EP, McGreevey L, Nardone J, Moore SA, Crispino J, Boggon TJ, Heinrich MC, Deininger MW, Polakiewicz RD, Gilliland DG, Druker BJ (2006). Activating alleles of JAK3 in acute megakaryoblastic leukemia. *Cancer Cell.* 10(1): 65-75

236. Wang I, Chen C, Lou L, Mora M (1997). Blood thrombopoietin, Il-6 and Il-11 levels in patients with agnogenic myeloid metaplasia. *Leukemia*. 11: 1827
237. Wang J, Lang H, Lichter S, Weinstein M, Benn P (1992). Cytogenetic studies of bone marrow fibroblasts cultures from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 80: 184
238. Ward H, Block M (1971). The natural history of agnogenic myeloid metaplasia (AMM) and a critical evaluation of its relationship with the myeloproliferative syndrom. *Medicine*. 50: 357
239. Wasserman LR (1968). The treatment of polycythemia. A panel discussion. *Blood*. 32(3): 483-7
240. Weinberg RA (2007). *The Biology of Cancer*. New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.
241. Wickenhauser C, Hillienhof A, Jungheim K, Lorenzen J, Ruskowski H, Hansmann M, Thiele J, Fischer R (1995). Detection and quantification of transforming growth factor beta (TGF-beta) and platelet derived growth factor (PDGF) release by normal human megacaryocytes. *Leukemia*. 9: 310
242. Witsell A, Schook L (1991). Macrophage heterogeneity occur through a developmental mechanism. *Proc Natl Acad USA*. 88: 1963
243. Wolf B, Neiman R (1985). Myelofibrosis with myeloid metaplasia: pathophysiologic implications of the correlation between bone marrow changes and progression of splenomegaly. *Blood*. 65: 803
244. Woodliffe H, Douigan L (1974). Myelofibrosis: Incidence and prevalence in Western Australia (1960-1969). An epidemiological study in 64 cases. In: Dahlem Workshop on Myelofibrosis-Osteosklerosis Syndrom, Oxford, Pergamon Press. p
245. Wyatt J, Sommers S (1950). Chronic marrow failure, myelosclerosis and extramedullary hematopoiesis. *Blood*. 5: 329
246. Wynn TA (2008). Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 214(2): 199-210
247. Yamashiro S, Takeya M, Nishi T (1994). Tumor-derived monocyte chemoattractant protein-1 induced intratumoral infiltration of monocyte-derived macrophages subpopulation in transplanted rat tumor. *Ann J Pathol*. 145: 856
248. Zankovich R, Thiele J, Modder B, Steinberg T, Simon K, Fischer R, Diehl V (1988). So-called primary (idiopathic) osteomyelofibrosis/-sclerosis (OMF) within the scope of chronic myeloproliferative diseases. I. Initial clinical and histologic findings in 102 patients with special reference to early hyperplastic and advanced fibrosclerotic stages. *Med Klin*. 83: 617
249. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ (2005). Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*. 280(24): 22788-92
250. Zheng MH, Nicholson GC, Warton A, Papadimitriou JM (1991). What's new in osteoclast ontogeny? *Pathol Res Pract*. 187(1): 117-25

7 Erklärung zur Vorabveröffentlichung von Ergebnissen

Mit freundlicher Genehmigung des Dekans der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln sind einige Teilaspekte dieser Dissertation bereits veröffentlicht worden:

Thiele J, Kvasnicka HM, Boeltken B (1999): Resident bone marrow macrophages in idiopathic (primary) myelofibrosis (PMF): a histochemical and morphometric study on sequential trephine biopsies. *Leukemia Research* 23: 983-985

Thiele J, Kvasnicka HM, Boeltken B, Zankovich R, Diehl V, Fischer R (1999): Initial (prefibrotic) stages of idiopathic (primary) myelofibrosis (PMF) - a clinicopathological study. *Leukemia* 13: 1741-1748.

8 Lebenslauf

Hinweis: Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.