

Aus dem Institut für Pathologie  
(Direktor: Prof. Dr. C. Röcken)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DER KI-67-INDEX IST EIN HISTOPATHOLOGISCHER  
PROGNOSTISCHER MARKER BEI MANTELZELL-LYMPHOMEN IN  
PROSPEKTIVEN UND RANDOMISIERTEN THERAPIESTUDIEN**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**OLAF DETERMANN**

aus Buchholz in der Nordheide

Kiel 2009

1. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. Klapper

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Kneba

Tag der mündlichen Prüfung:

13. August 2009

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

13. August 2009

gez.: Prof. Dr. Kalthoff

(Stellvertr. Ausschussvorsitzender)

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Fragestellung .....	5
2	Patienten und Methoden .....	6
2.1	Patienten .....	6
2.1.1	Gewebeproben .....	6
2.2	Methoden .....	7
2.2.1	Histologische Präparate .....	7
2.2.1.1	Referenzpathologie .....	7
2.2.1.2	Diagnosesicherung durch das Pathologenpanel .....	8
2.2.1.3	Beurteilung der zytologischen Typen durch das Pathologenpanel .....	8
2.2.1.4	Beurteilung der Wachstumsmuster durch die Panelpathologen .....	9
2.2.1.5	Schätzung des Ki-67-Index durch die Panelpathologen .....	9
2.2.1.6	Untersuchung des Ki-67-Index durch Zählung von 1000 Lymphomzellen .....	9
2.2.1.7	Elektronische Auswertung des Ki-67-Index mit Bildbearbeitungssoftware .....	10
2.2.1.8	Zählung der Mitosen pro mm <sup>2</sup> .....	11
2.2.2	Statistische Auswertung .....	11
2.2.2.1	Korrelation der prognostischen Marker mit dem Therapieerfolg .....	11
2.2.2.2	Methodenvergleich zur Bewertung des Ki-67-Index .....	12
3	Ergebnisse .....	13
3.1	Initiale Therapie, TTF und OS .....	13
3.2	Prognostische Marker bei CHOP- und R-CHOP-behandelten Patienten .....	14
3.2.1	Prognostischer Wert des internationalen prognostischen Index (IPI) .....	14
3.2.2	Zytologische Typen .....	15
3.2.3	Wachstumsmuster .....	16
3.2.4	Proliferationsaktivität .....	16
3.2.5	Prognostischer Wert der Proliferationsaktivität .....	17
3.2.5.1	Prognostischer Wert des Ki-67-Index .....	17
3.2.5.2	Prognostischer Wert der Mitosenzahl .....	18
3.2.5.3	Etablierung von Risikogruppen des Ki-67-Index .....	18
3.3	Methodenvergleich zur Beurteilung der Proliferationsaktivität .....	19
3.3.1	Methodische Anmerkungen zur Zählung des Ki-67-Index .....	21
4	Diskussion .....	23
5	Zusammenfassung .....	30
6	Literaturverzeichnis .....	32
7	Verzeichnis der Abkürzungen .....	36
8	Danksagung .....	38
9	Lebenslauf .....	39

# 1 Einleitung

Das Mantelzell-Lymphom wurde bereits 1975 als zentrozytisches Lymphom im Rahmen der Kiel-Klassifikation der Non-Hodgkin-Lymphome beschrieben (Lennert, 1975). Dabei wurde das zentrozytische Lymphom auf Grund von zytologischen Kriterien den niedrigmalignen B-Zell-Lymphomen zugeordnet. In der amerikanischen Working Formulation (Robb-Smith, 1982) erscheinen Mantelzell-Lymphome vermischt mit anderen Non-Hodgkin-Lymphomen verschiedene Subentitäten. Als eigenständige Entität wurde das Mantelzell-Lymphom erst im Rahmen der REAL-Klassifikation auch in Amerika akzeptiert (Harris, 1994) und in die WHO-Klassifikation der malignen Lymphome aufgenommen (Harris et al., 2000).

Das Mantelzell-Lymphom ist eine seltene bösartige Erkrankung mit einer Inzidenz von 2 - 3/100.000 Menschen/Jahr. In Westeuropa macht es etwa 8 - 10 % aller malignen Lymphome aus, in den USA etwa 5 % (Argatoff et al., 1997; Meusers et al., 1997). Männer erkranken in einem Verhältnis von 3 - 4 : 1 signifikant häufiger als Frauen, der Altersmedian liegt zwischen 65 und 70 Jahren (Hiddemann et al., 1996; Velders et al., 1996; Hiddemann et al., 1998).

Zytomorphologisch ist das Mantelzell-Lymphom gekennzeichnet durch kleine bis mittelgroße Lymphozyten mit schmalen Zytoplasma und gekerbten Zellkernen, die an Zentrozyten erinnern (Lennert, 1975). Es wurden allerdings drei weitere zytologische Varianten beschrieben, die sich von der klassischen Variante stark unterscheiden: kleinzellig wie bei einer chronischen lymphatischen Leukämie der B-Zell-Reihe (B-CLL-like), pleomorph und blastoid (Bookman et al., 1990; Zoldan et al., 1996; Campo et al., 1999; Tiemann et al., 2005).

Histologisch erkennt man in klassischen Fällen das Mantelzonenwachstumsmuster, das der Erkrankung ihren Namen gegeben hat: Das Lymphom umwächst noch erhaltene reaktive Keimzentren und verdrängt die Mantelzonen der B-Follikel (Weisenburger et al., 1982; Campo et al., 1999). In anderen Fällen kann das Mantelzell-Lymphom ein diffuses oder noduläres Wachstumsmuster aufweisen (Zucca et al., 1994; Weisenburger and Armitage, 1996; Campo et al., 1999). In der immunhistochemischen Untersuchung zeigen die Zellen membranständige Reaktivität für die pan-B-Zellantigene CD19, CD20 und CD79a. Als weitere B-Zellmarker werden IgM und zumeist auch IgD exprimiert. Zusätzlich erkennt man

Reaktivität für das T-Zellantigen CD5. Anders als bei der chronischen lymphatischen Leukämie der B-Zellreihe wird CD23 auf den Tumorzellen nicht koexprimiert (Harris, 1994). CD23 findet sich lediglich auf häufig untermischt vorkommenden folliculären dendritischen Retikulumzellen.

Der diagnostische Goldstandard, wie er im *European Mantle Cell Lymphoma Network* verwendet wird, besteht im immunhistochemischen Nachweis einer Überexpression des Zyklin-D1-Proteins im Zellkern. Das Protein Zyklin D1 reguliert den Zellzyklus und steigert im Falle der Überexpression die Proliferationsaktivität. Die Überexpression des Zyklin-D1-Proteins wird durch die Translokation  $t(11;14)(q13;q32)$  ausgelöst, die für das MCL charakteristisch ist (Raffeld and Jaffe, 1991). Das *bcl-1*-Gen auf Chromosom 11, welches das Zyklin-D1-Protein kodiert, gerät unter den Einfluss des Promoters der schweren Immunglobulinrezeptorkette (IgH-Gen) auf Chromosom 14. Diese Translokation ist zytogenetisch in nahezu allen Fällen des Mantelzell-Lymphoms nachweisbar (Rimokh et al., 1994).

Das Mantelzell-Lymphom ist gekennzeichnet durch seinen aggressiven klinischen Verlauf, häufige und wiederholte Rezidive nach konventioneller Therapie und die kürzesten Überlebenszeiten aller malignen Lymphome. Die mittlere Überlebenszeit beträgt lediglich 3 Jahre (Lenz et al., 2004a). Abweichend von der Mehrzahl der Patienten mit kurzem Überleben lässt sich jedoch eine kleine Gruppe von Patienten mit einem indolenteren Verlauf und einer mittleren Überlebenszeit von 5 bis 10 Jahren abgrenzen (Campo et al., 1999).

Um den Patienten eine risikoangepasste Therapie ermöglichen zu können, sind in der Vergangenheit verschiedene biologische und klinische Parameter auf ihre prognostische Relevanz hin untersucht worden. Vom Pathologen zu untersuchende morphologische Kriterien des MCL umfassen Zytologie, Wachstumsmuster und Proliferationsaktivität. Während in kleineren Studien die blastoide Variante eine kürzere Überlebenszeit aufwies (Bernard et al., 2001), ließ die Zytologie in größeren retrospektiven Studien nur eingeschränkte prognostische Beurteilungen zu (Hiddemann et al., 1998; Tiemann et al., 2005). Das Wachstumsmuster lässt einen statistisch signifikanten, aber nur gering ausgeprägten Unterschied der mittleren Überlebenszeit erkennen. Die Fälle mit nodulärem Wachstumsmuster zeigen eine etwas günstigere Prognose (Tiemann et al., 2005).

Dem Pathologen stehen zur Beurteilung der mitotischen Aktivität von Gewebe zwei verbreitete, einfach durchzuführende Methoden zur Verfügung. Die konventionelle Art beinhaltet die morphologische Erkennung und Zählung in Mitose befindlicher Zellen bezogen auf eine definierte Fläche. Die sichtbare Mitose erfasst jedoch nur die sehr kurze eigentliche Kernteilung von der Prophase bis zur Anaphase. Daneben gibt es die immunhistochemische Methode. Hierbei lassen sich alle in der Zellteilung befindlichen Zellkerne vom Beginn der S-Phase bis zum Ende der Telophase mit dem Antikörper Ki-67 anfärben. Der so gemessene Ki-67-Index wird üblicherweise als Prozentsatz der gesamten Tumorzellen angegeben. Dieser Wert lässt sich vom erfahrenen Pathologen am Mikroskop schätzen oder besser auszählen. Darüber hinaus ist auch eine computergestützte Auswertung des Ki-67-Index mit Hilfe von Grafikprogrammen möglich. Der Ki-67-Index wurde in der Vergangenheit als wichtiger prognostischer Faktor in Mantelzell-Lymphomen erkannt (Bosch et al., 1998) und in einer multivariaten Analyse in seiner prognostischen Aussagekraft klinischen Parametern, zytologischen Befunden und dem histologischen Wachstumsmuster als deutlich überlegen befunden (Tiemann et al., 2005).

Neben den vom Pathologen zu beurteilenden Kriterien wurden auch vielfach vom Kliniker erkennbare Prognosemarker untersucht. Ungünstige klinische Parameter waren Patientenalter, schlechter Allgemeinzustand, fortgeschrittenes Erkrankungsstadium (Ann Arbor 3-4) (International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993), erhöhte Serum-LDH-Werte, Splenomegalie und Anämie, die in univariater Analyse mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit assoziiert waren (Zucca et al., 1995; Bosch et al., 1998; Andersen et al., 2002). Jedoch konnten nur Alter, schlechter Allgemeinzustand, leukämische Ausschwemmung und Splenomegalie in einer multivariaten Analyse als unabhängige prognostische Faktoren bestätigt werden (Bosch et al., 1998; Lenz et al., 2004a).

Zur prognostischen Beurteilung des Diffusen Großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) wurde der *International Prognostic Index* (IPI) erstellt (Shipp, 1994). Durch die Untersuchung rein klinischer Parameter wie Lymphomausbreitung und Laborparameter sowie den körperlichen Allgemeinzustand des Patienten wird ein Score erstellt, der prognostische Aussagen bei Patienten mit DLBCL erlaubt. Biologische Kriterien des Tumors, wie sie vom Pathologen oder Zytogenetiker untersucht werden können, sind in dem Score nicht enthalten.

Die Anwendbarkeit des IPI auf das Mantelzell-Lymphom wird unterschiedlich beurteilt. In Studien wird ein signifikant kürzeres medianes Gesamtüberleben bei Patienten mit Hochrisiko-IPI (Weisenburger et al., 2000) und im Rezidiv ein vermindertes Ansprechen auf Chemotherapie beobachtet (Bosch et al., 1998). In den bisher größten retrospektiven Studien zeigte der IPI jedoch keinen Einfluss auf das Gesamtüberleben (Samaha et al., 1998; Andersen et al., 2002). Zur verbesserten Beurteilung der Prognose des MCL erarbeitet das *European Mantle Cell Lymphoma Network* ein kombiniertes klinisches und biologisches Risikoprofil zur verlässlichen Risikostratifizierung, das in seinen klinischen Aspekten bereits als *MCL international prognostic index* (MIPI) vorgeschlagen wurde (Hoster et al., 2008).

Das Mantelzell-Lymphom wird als primär systemische Erkrankung mit Polychemotherapie behandelt. In der Zeit, in der die oben zitierten Studien erhoben wurden, kamen mehrere Therapieprotokolle zur Anwendung. Zu nennen sind hier PnM (Prednimustin, Mitoxantron), COP (Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison) und CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison). Die Ansprechraten lagen bei 70 - 80 %, komplette Remissionen wurden in 20 - 40 % der Fälle erreicht. Jedoch rezidierte die Erkrankung regelmäßig, und die Überlebenskurven sanken innerhalb weniger Jahre, ohne ein Plateau zu bilden, nahezu auf Null ab. Neuere Therapieschemata beinhalten myeloablative Induktionstherapien mit autologer oder allogener Stammzelltransplantation. Ein weiterer neuartiger Ansatz ist die Therapie mit humanisierten Antikörpern gegen das B-Zellantigen CD20 (Rituximab) im Rahmen einer Immuno-Chemotherapie zur Induktion (z. B. R-CHOP) oder als Konsolidierungstherapie nach konventioneller Chemotherapie oder nach autologer oder allogener Stammzelltransplantation.

Diese neuartigen Therapien haben die Überlebenszeiten der Patienten mit Mantelzell-Lymphomen so erheblich verbessert, dass eine Neubeurteilung des bisherigen aussagekräftigsten biologischen Parameters, der Proliferationsaktivität, zur Erstellung eines prognostischen Index notwendig geworden war und vom *European MCL Network* erbeten wurde.

## **1.1 Fragestellung**

1. Kann der Ki-67-Index den klinischen Verlauf bei Mantelzell-Lymphomen in Patienten aus randomisierten, prospektiven Studien mit modernen Chemotherapien und Immuno-Chemotherapien vorhersagen?
2. Welche Methode zur Messung der Proliferationsaktivität ist im Hinblick auf Reproduzierbarkeit und Validität am geeignetsten zur Anwendung in der klinisch-pathologischen Praxis?

## 2 Patienten und Methoden

### 2.1 Patienten

Die diagnostischen Biopsien von Patienten mit der Erstdiagnose eines MCL, die im Rahmen einer Behandlungsstudie des *European MCL Network* oder der GLSG (deutsche Studiengruppe für niedrigmaligne Lymphome) behandelt werden sollen, werden in ein spezialisiertes Zentrum, eine sogenannte Referenzpathologie, versandt. In der Referenzpathologie wird eine zweite pathologische Beurteilung zur Absicherung der Diagnose vorgenommen. Darüber hinaus wird das Biopsiematerial der Studienpatienten in den Referenzpathologien für wissenschaftliche Analysen gelagert. Für diese wissenschaftlichen Untersuchungen liegt von jedem Patienten eine Einverständniserklärung in der Studienzentrale an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München vor.

Über die Datenbank des *European MCL Network* und der GLSG in der Studienzentrale wurden alle Patienten ermittelt, die mit einem MCL im fortgeschrittenen Stadium (Ann Arbor Stadium 3 oder 4) (International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993) mit der Therapie Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin und Prednisolon (CHOP) oder CHOP in Kombination mit einem monoklonalen Antikörper gegen das CD20 Antigen (R-CHOP) behandelt wurden. Es handelt sich dabei um Patienten aus den randomisierten Studien GLSG 1996, GLSG 2000 und European MCL Trial 1 (Lenz et al., 2004b; Lenz et al., 2005; Dreyling et al., 2005). Insgesamt wurden 491 Patienten ermittelt, die im Zeitraum zwischen 1996 und 2004 behandelt wurden.

#### 2.1.1 Gewebeproben

Untersucht wurden überwiegend Gewebeproben, die als Paraffinblockpräparate zur Referenzbeurteilung und Diagnosesicherung von den primär diagnostizierenden Pathologen an eines der Referenzzentren des *European MCL Network* weitergesandt wurden. Ein kleinerer Teil der Einsendungen erfolgte als formalinfixiertes Feuchtmaterial direkt von den behandelnden Kliniken. Besonderer Wert wurde auf die gute Qualität und ausreichende Größe der Proben gelegt. Es handelt sich um chirurgisch entnommene Lymphknotenresektate und

endoskopische Tumorbiopsate. Stanzbiopsien, Feinnadelbiopsien und zytologische Ausstrichpräparate wurden von der Studie ausgeschlossen.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Histologische Präparate**

Von den Paraffinblöcken wurden 10 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Zur Untersuchung lagen die folgenden konventionell-histologischen Färbungen vor: H. & E., Giemsa, PAS und Silberimprägnation (Gomori). Zusätzlich umfasste das Färbepanel die folgenden immunhistochemischen Färbungen: CD20, CD5, CD23, Zyklin-D1 und den Proliferationsmarker Ki-67. Die Färbung mit Ki-67 wurde zu etwa 50 % im Labor der Hämatopathologie Kiel angefertigt, die übrigen Fälle wurden in anderen europäischen Referenzlaboren des *European MCL Network* gefärbt. Verwendet wurden die Antikörper Ki-S5 (Hausgemacht, (Kreipe et al., 1993)) und MIB-1 (DAKO, Hamburg). Bei der Farbentwicklung kamen das rote APAAP-System (Cordell et al., 1984) und die braune DAB-Entwicklung (Diaminobenzidin, DAKO, Hamburg) (Elias et al., 1987) zur Anwendung. Ausgewertet wurden nur qualitativ gute Ki-67-Färbungen mit starker nukleärer Reaktion der positiven Zellen ohne Hintergrundreaktion und Färbeartefakte. Schwache Reaktionen oder Reaktionen, die nur die morphologisch erkennbaren Mitosen anfärbten, wurden wiederholt, bis ein ausreichendes Färbeergebnis erzielt wurde.

#### **2.2.1.1 Referenzpathologie**

Bei Registrierung eines Patienten mit der Diagnose MCL in einer Therapiestudie der GLSG oder des *European MCL Network* wird der primär diagnostizierende Pathologe aufgefordert, das diagnostische Blockmaterial an eines der spezialisierten Referenzzentren zur Diagnosebestätigung und Archivierung einzusenden. Hier werden die oben beschriebenen konventionellen und immunhistochemischen Untersuchungen durchgeführt. Die Diagnose MCL wird von spezialisierten Lymphopathologen bestätigt. An diesem Reviewprozess am Lymphknotenregister in Kiel teilzunehmen, ist Teil der täglichen Routinearbeit des Autors. Ist die Diagnose eines MCL referenzpathologisch bestätigt, wird das Ergebnis an die

Studienzentrale an der Ludwig-Maximilians-Universität München gemeldet und das Blockmaterial archiviert.

### **2.2.1.2 Diagnosesicherung durch das Pathologenpanel**

Um die Diagnose MCL noch einmal zusätzlich abzusichern, und um die Diagnosekriterien für das MCL europaweit zu vereinheitlichen, treffen sich die Lymphompathologen des *European MCL Network* jedes Jahr im Lymphknotenregister in Kiel. Jeder Pathologe bringt die wie oben angegeben gefärbten Schnittpräparate der in seinem Zentrum diagnostizierten Patienten mit. Ohne Kenntnis der Diagnosen der Kollegen begutachten mindestens 6 Pathologen an Einzelmikroskopen alle registrierten MCL noch einmal. Hierbei werden neben der Diagnose auch die zytologischen Typen und die Architekturtypen angegeben. Die Ergebnisse der Pathologen werden dokumentiert und auf Konsens hin überprüft. Eine Konsensusdiagnose wird bei mindestens 5 von 6 übereinstimmenden Pathologen festgestellt. Sofern für einen Fall kein Konsens der Diagnose erzielt wird, werden die Präparate anschließend gemeinsam am Diskussionsmikroskop begutachtet. Hier werden die Kriterien gemeinsam erörtert und eine Konsensusdiagnose herbeigeführt. Sowohl an der Durchführung der Einzelmikroskopsitzungen wie der Diskussionsmikroskoprunden war der Autor beteiligt. Nur Patienten mit der Konsensusdiagnose MCL durch das Referenzpathologen-Panel wurden im Folgenden ausgewertet.

### **2.2.1.3 Beurteilung der zytologischen Typen durch das Pathologenpanel**

Die MCL wurden entsprechend ihrer Zellmorphologie in vier Typen eingeteilt.

Bei der klassischen Zytologie findet man Lymphozyten mit schwach basophilem Zytoplasma und gekerbten, unregelmäßig begrenzten Zellkernen, die an die Zentrozyten der Keimzentren erinnern. Der kleinzellige Typ besitzt kleine Lymphozyten mit schmalem Zytoplasma und rundem, kondensierten Zellkern, wie man sie auch bei der Chronischen Lymphatischen B-Zell-Leukämie findet. Der pleomorphe Typ zeichnet sich durch unterschiedlich große lymphatische Zellen mit stark unterschiedlich geformten Zellkernen und teils prominenten Nukleoli aus. Bei dem blastären MCL liegen überwiegend lymphatische Blasten mit schwach basophilem Zytoplasma und lockerem Kernchromatin vor. Bei 177 Fällen liegt eine Konsensusdiagnose des Pathologen-Panels für die Zytologie vor.

### **2.2.1.4 Beurteilung der Wachstumsmuster durch die Panelpathologen**

Ihrer Architektur nach wurden die MCL in drei Wachstumsmuster eingeordnet.

Bei dem Mantelzonenmuster breitet sich das Lymphom in der Mantelzone der Lymphfollikel aus. Inmitten der Lymphominfiltrate erkennt man noch reaktive Keimzentren, die vollständig umwachsen werden. Bei dem nodulären Wachstumsmuster hingegen erkennt man lediglich knotig angeordnete Lymphominfiltrate; reaktive Keimzentren sind hier nicht enthalten oder vollständig aufgesiedelt. Bei diffusem Wachstumsmuster wird die Lymphknotenstruktur vollständig überwachsen, eine gezielte Anordnung der Lymphominfiltrate ist nicht erkennbar. Bei 139 Fällen liegt eine Konsensusdiagnose des Pathologen-Panels für das Wachstumsmuster vor.

### **2.2.1.5 Schätzung des Ki-67-Index durch die Panelpathologen**

Bei dem Paneltreffen am 26.8.2005 wurden die 11 teilnehmenden Pathologen aufgefordert, den Ki-67-Index der 78 an diesem Tage untersuchten MCL anzugeben. Hierzu betrachtete jeder Pathologe dieselben Ki-67-Präparate an selbstgewählter repräsentativer Stelle in hoher Vergrößerung einzeln und ohne Kenntnis der Ergebnisse der Kollegen. Angegeben wurde ein Schätzwert der Prozentzahl Ki-67-positiver Zellen an der gesamten Tumorzellpopulation. Die Schätzwerte wurden in Schritten von je 10 Prozentpunkten angegeben. Eine Konsensfindung der Ki-67-Indizes am Diskussionsmikroskop erfolgte nicht.

### **2.2.1.6 Untersuchung des Ki-67-Index durch Zählung von 1000 Lymphomzellen**

Bei 249 Fällen wurde der Ki-67-Index erhoben. Diese Fälle hatten zuvor den oben beschriebenen Reviewprozess zur Diagnosesicherung des MCL durchlaufen. Die Präparate stammen entweder aus dem Archiv des Kieler Lymphknotenregisters oder wurden mir freundlicherweise von den Pathologien der Universitäten in Berlin, Lübeck und Würzburg zur Verfügung gestellt.

Viel Sorgfalt wurde auf die Auswahl von jeweils zwei repräsentativen Arealen in morphologisch gut erhaltenen Tumorknoten verwandt. Diese Tumorknoten sollten in ihrer Proliferationsaktivität repräsentativ für das gesamte Lymphom sein. Zu vermeiden waren kleine Tumorareale mit für das Gesamtlymphom nicht repräsentativer erhöhter Proliferationsrate, die sogenannten „Hot Spots“. Auch Areale mit Beimengungen nicht zu dem MCL gehörender Lymphozyten mussten erkannt und ausgeschlossen werden. Zu nennen sind hier insbesondere die internodulär gelegenen T-Zell-Areale. Häufig waren auch durch das MCL aufgesiedelte Lymphfollikel mit morphologisch kaum noch abgrenzbaren, aber immer noch stark proliferationsaktiven Keimzentren. Die Beimischung proliferationsaktiver T-Lymphozyten und Keimzentrumzellen hätte die Messung verfälscht, weil der Ki-67-Index als Prozentsatz der Ki-67-positiven Tumorzellen definiert ist.

Pro Fall wurden in zwei Arealen je 500 Tumorzellkerne in 400-facher Vergrößerung am Mikroskop (Axioskop, Carl Zeiss, Oberkochen) auf Positivität für Ki-67 beurteilt. Das Raster des Zähllokulars (W-PI 10x, Carl Zeiss, Oberkochen) erleichterte die Orientierung, die Werte wurden mit dem Zählgerät (Counter AC-12, Karl Hecht, Sondheim) aufgenommen. Auch schwach positive Zellkerne wurden als positiv gewertet. Nicht gezählt wurden vorkommende Endothelzellen und Stromazellen. Eine hohe Beimengung von T-Lymphozyten und Keimzentrumzellen wurde bereits durch die Auswahl des untersuchten Areals verhindert. Die beiden Ergebnisse Ki-67-positiver Tumorzellkerne pro 500 Tumorzellkerne wurden zu einem Wert positiver Tumorzellkerne pro 1000 addiert und auf einen Prozentsatz positiver Zellkerne, den Ki-67-Index, gekürzt.

### **2.2.1.7 Elektronische Auswertung des Ki-67-Index mit Bildbearbeitungssoftware**

32 Fälle wurden mit dem KS4000 System (Carl Zeiss, Oberkochen) elektronisch auf ihren Ki-67-Index untersucht. Es wurden repräsentative Areale ausgewählt, fotografiert und ein automatischer Weißabgleich durchgeführt. Es wurden rot-, blau- und gelb-Schwellenwerte (RBG-Schwellenwerte) positiver und negativer Zellkerne festgelegt und für alle Fälle unverändert angewendet. Untersucht wurde die Prozentzahl Ki-67-positiver Zellkerne an den gesamten Zellkernen sowie der Prozentanteil Ki-67-positiver Fläche an der gesamten Fläche. Die Bildanalyse erfolgte freundlicherweise in Zusammenarbeit mit Jeroen van der Laak in Nijmegen.

### **2.2.1.8 Zählung der Mitosen pro mm<sup>2</sup>**

Bei 170 Fällen wurde die mitotische Aktivität morphologisch beurteilt. In der H. & E. - Färbung wurden bei 400-facher Vergrößerung 10 repräsentative Lymphomareale ausgewählt. Mit dem Raster des Zählokulars ließen sich Areale von 0,1 mm<sup>2</sup> Fläche abgrenzen. Hier wurden die morphologisch erkennbaren Mitosefiguren mit dem Zählgerät gezählt. Addiert aus den Werten der einzelnen Areale ergab sich die Anzahl der Mitosefiguren pro mm<sup>2</sup>.

## **2.2.2 Statistische Auswertung**

In der Studienzentrale des *European MCL Network* an der Ludwig-Maximilians-Universität München werden die klinischen und pathologischen Verlaufsdaten der Patienten gespeichert. Die Auswertung der statistischen Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit Eva Hoster in München unter Verwendung von SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Für die Auswertung wurde ein Follow-up bis zum 11. November 2006 verwendet.

### **2.2.2.1 Korrelation der prognostischen Marker mit dem Therapieerfolg**

Es wurden die TTF (Zeit bis zum Therapieversagen) und das OS (Gesamtüberlebenszeit) der MCL-Patienten unter CHOP- und R-CHOP-Therapie berechnet. Zusätzlich wurden diese Werte mit bereits gespeicherten klinischen Parametern und im Rahmen der Paneluntersuchung oder bei dieser Arbeit erhobenen Daten korreliert. Die prognostische Relevanz des gezählten Ki-67-Index für 1000 Zellkerne und die Mitosenzahl pro mm<sup>2</sup> für die TTF und das OS der Patienten mit MCL unter CHOP- und R-CHOP-Therapie wurden berechnet. Grenzwerte für die Einteilung von Risikogruppen zur Verwendung im Rahmen eines MIPI (*MCL international prognostic index*) wurden vorgeschlagen. Ferner wurden die prognostischen Aussagewerte des Zytologietyps, des Wachstumsmusters und des IPI (*international prognostic index*), unterteilt nach Therapie mit CHOP und R-CHOP, zum Vergleich mit vorgestellt.

### **2.2.2.2 Methodenvergleich zur Bewertung des Ki-67-Index**

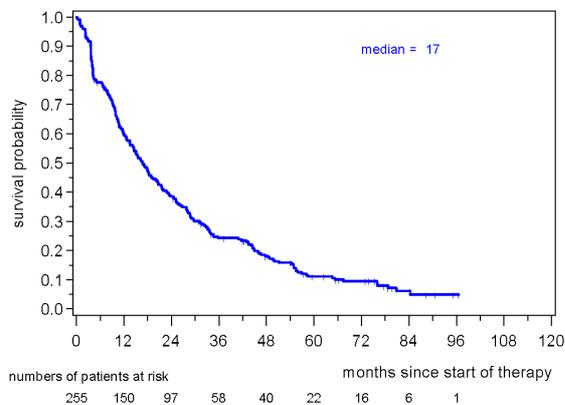
Bei 32 Fällen lagen Untersuchungsergebnisse durch alle drei Methoden zur Beurteilung des Ki-67-Index vor. Es lagen Zählungen des Ki-67-Index für 1000 Lymphomzellen vor. Die 11 Panelpathologen hatten Schätzwerte des Ki-67-Index abgegeben. Mit Bilderkennungssoftware lagen Ki-67-Indizes bezogen auf positive Zellkerne und positive Flächenanteile vor. Die Zählung von 1000 Tumorzellen wurde hier als der „Goldstandard“ definiert, weil sich dieser Wert als sehr gut mit dem klinischen Verlauf korrelierend herausgestellt hatte (siehe Ergebnisteil). Es wurde untersucht, inwieweit die Schätzwerte der Panelpathologen und die elektronisch beurteilten Ki-67-Indizes mit diesem „Goldstandard“ korrelierten und ob sie als methodisch einfachere Untersuchungen die aufwendige Zählung von 1000 Tumorzellen ersetzen können.

Es wurde untersucht, ob auch kleinere Zellzahlen zur Erstellung eines verwertbaren Ki-67-Index geeignet sind.

## 3 Ergebnisse

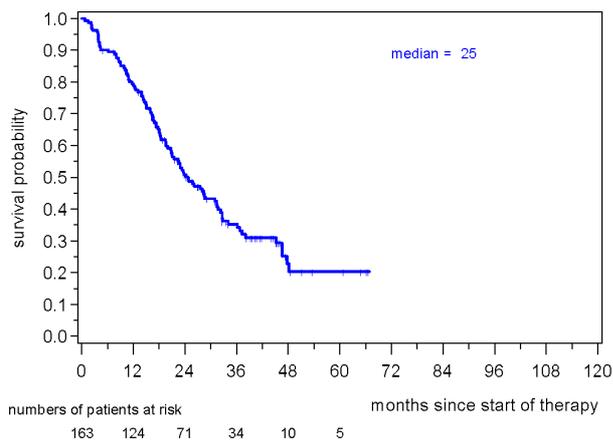
### 3.1 Initiale Therapie, TTF und OS

255 Patienten wurden initial mit CHOP therapiert und in der Datenbank der Studienzentrale in München erfasst. Untersucht wurde die TTF, die Zeit bis zu einem Versagen der Therapie. Wie aus Abbildung 1 zu erkennen, lag die mediane TTF bei 17 Monaten. Bei 28 Patienten trat kein Ereignis - also weder ein Rezidiv noch ein Therapieversagen - ein. Die mediane Nachbeobachtungszeit dieser Patienten ohne Ereignis betrug 61 Monate.



**Abbildung 1: TTF bei CHOP-Therapie**

Bei 163 Patienten war die initiale Lymphomtherapie R-CHOP, also CHOP mit dem therapeutischen Antikörper gegen das B-Zell-Antigen CD20 (siehe Abbildung 2). Ihre mediane TTF war wesentlich besser als in der CHOP-therapierten Gruppe und lag bei 25 Monaten. Auch die Gruppe der Patienten ohne Ereignis ist hier mit 59 der Patienten wesentlich größer. Allerdings ist dieser Wert nicht unmittelbar mit der CHOP-Gruppe vergleichbar, da die Therapie erst relativ kürzlich eingeführt wurde und lange Nachbeobachtungszeiten bei laufenden Studien noch nicht vorliegen. Die mediane Nachbeobachtungszeit der R-CHOP-therapierten Patienten ohne (Rezidiv-) Ereignis lag nur bei 33 Monaten.



**Abbildung 2: TTF bei R-CHOP-Therapie**

Betrachtet man die Gesamtüberlebenszeit (OS), so ergibt sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Therapien. Bei CHOP-Therapie betrug die mediane Überlebenszeit 60 Monate, bei R-CHOP war der Median zum Beobachtungszeitpunkt am 11. November 2006 noch nicht erreicht.

### **3.2 Prognostische Marker bei CHOP- und R-CHOP-behandelten Patienten**

Da die Therapieprotokolle CHOP und R-CHOP sehr unterschiedliche Krankheitsverläufe mit sich bringen, werden hier die prognostischen Marker getrennt in ihrer Auswirkung auf die TTF besprochen.

#### **3.2.1 Prognostischer Wert des internationalen prognostischen Index (IPI)**

Der *International Prognostic Index* (IPI), der zur klinischen Risikoabschätzung beim Diffusen Großzelligen B-Zell-Lymphom entwickelt wurde, teilt die Patienten in vier Risikogruppen ein. Die beste Prognose hat die *Low Risk* (LR) Gruppe. Es folgen die *Low Intermediate Risk* (LIR) und die *High Intermediate Risk* (HIR) Gruppen. Das höchste Risiko hat die *High Risk* (HR) Gruppe.

Der IPI erlaubt eine signifikante prognostische Aussage zur TTF bei Therapie mit CHOP ( $p = 0,029$ ) und R-CHOP ( $p = 0,0004$ ). Ein hohes Risiko nach IPI spiegelt sich in einer kurzen TTF wieder.

### 3.2.2 Zytologische Typen

Bei 177 Patienten wurde ein zytologischer Subtyp durch das Pathologenpanel angegeben. Bei 91 % ( $n = 161$ ) dieser Patienten lag eine klassische Zytologie vor. Bei 3 % ( $n = 6$ ) fand sich sowohl klassische als auch pleomorphe Zytologie, bei 1 % ( $n = 1$ ) sowohl klassische als auch blastäre Zytologie. In 3 % ( $n = 5$ ) der Patienten wurde kleinzellige Zytologie dokumentiert, in 2 % ( $n = 3$ ) fand sich pleomorphe und 1 % ( $n = 1$ ) blastäre Zytologie.

Demzufolge zeigen 94 % ( $n = 166$ ) eine rein klassische oder kleinzellige Zytologie, während 6 % ( $n = 11$ ) zumindest eine pleomorphe oder blastäre Komponente besitzen. Für die Analyse der Prognose wurden die Fälle mit pleomorphen und blastären Komponenten gemeinsam beurteilt, da in der WHO-Klassifikation diese beiden Formen als „blastoide Variante“ zusammengefasst sind. Aus Abbildung 3 geht hervor, dass die prognostischen Unterschiede bei der Zytologie sowohl bei CHOP- ( $p = 0,25$ ) als auch bei R-CHOP-Therapie ( $p = 0,3$ ) nicht signifikant sind.

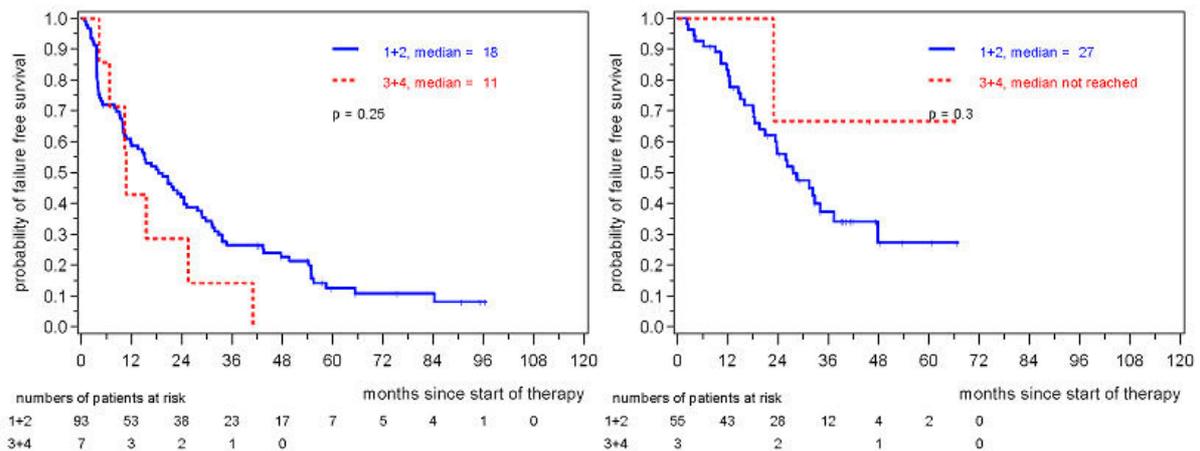


Abbildung 3: TTF und Zytologie bei CHOP (links) und R-CHOP-Therapie (rechts); 1 = klassische Zytologie; 2 = kleinzellige Zytologie; 3 = pleomorphe Zytologie; 4 = blastäre Zytologie

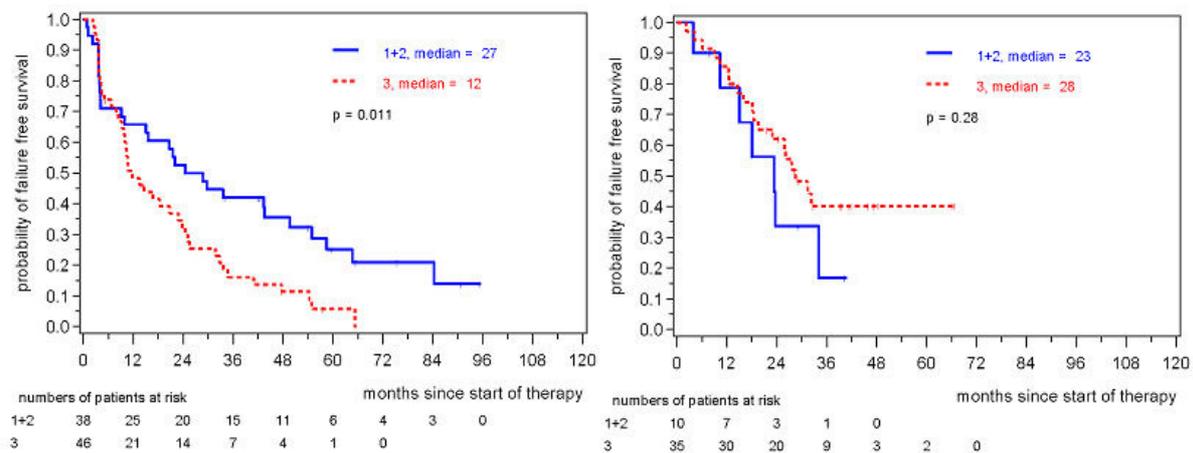
### 3.2.3 Wachstumsmuster

Bei 139 Patienten dokumentierte das Pathologenpanel das Wachstumsmuster des MCL.

In 5 % der Fälle lag reines Mantelzonenmuster (Gruppe 1 in Abbildung 4) vor, bei 31 % der Patienten wurde reines noduläres Wachstum (Gruppe 2) dokumentiert. Für die Analyse der Prognose wurden diese beiden Gruppen zu einer morphologisch strukturierteren, höher differenzierten Gruppe von 36 % der Patienten zusammengefasst.

Bei 60 % der Patienten dokumentierte das Panel ein reines diffuses Wachstumsmuster, in 1 % der Fälle lag es in Kombination mit Mantelzonenmuster vor, in 3 % der Fälle kombiniert mit nodulärem Wachstum. Diese zusammen 64 % der Patienten wurden als geringer differenzierte Gruppe 3 in der Analyse der Prognose der strukturierten Gruppen gegenübergestellt.

Die prognostische Aussage des Wachstumsmusters ist für CHOP-Therapie signifikant ( $p = 0,011$ ), für R-CHOP-Therapie ( $p = 0,28$ ) möglicherweise aufgrund geringer Fallzahl und kurzer Nachbeobachtungszeit nicht signifikant.



**Abbildung 4: TTF und Wachstumsmuster bei CHOP (links) und R-CHOP-Therapie (rechts); 1 = Mantelzonenmuster; 2 = noduläres Wachstum; 3 = diffuses Wachstum**

### 3.2.4 Proliferationsaktivität

Bei 249 Fällen wurde der Ki-67-Index durch Zählung von 1000 Zellkernen erhoben. Der mediane Ki-67-Index betrug 14,3 % bei einem Minimum von 1,2 % und einem Maximum von 90,95 %.

Bei 32 Fällen wurde der Ki-67-Index durch jeweils 11 Panelpathologen geschätzt und daraus das arithmetische Mittel gebildet. Der mediane Ki-67-Index betrug hier 17,7 % mit einem

Minimum von 6,2 % und einem Maximum von 95 %. Die mediane Standardabweichung der Pathologen betrug 7,41 bei einem Minimum von 2,52 und einem Maximum von 26,42.

Bei denselben 32 Fällen wurde die Prozentzahl der Ki-67-positiven Zellkerne mit Bildbearbeitungssoftware ermittelt. Hier ergab sich ein medianer Ki-67-Index von 27,4 % bei einem Minimum von 1,8 % und einem Maximum von 84,7 %.

Es wurde bei den 32 Fällen auch elektronisch der Ki-67-positive Flächenanteil vermessen. Hier lag der Median bei 3,6 % mit einem Minimum von 0,03 % und einem Maximum von 76,6 %.

Die Mitosenzahl pro  $\text{mm}^2$  wurde bei 170 Fällen gezählt. Der Median betrug hier 4 Mitosen /  $\text{mm}^2$  bei einem Minimum von 0 und einem Maximum von 1562.

### **3.2.5 Prognostischer Wert der Proliferationsaktivität**

Der prognostische Wert des Ki-67-Index und der Mitosenzahl wurden einzeln und adaptiert auf den IPI für TTF und auch OS überprüft. Es besteht nur eine geringe Überschneidung der Kollektive mit Ki-67-Index und mit Bestimmung der Zytologie und des Wachstumsmusters. Da Zytologie und Wachstumsmuster nur schwache prognostische Parameter sind, wurde auf eine adaptierte Analyse des Ki-67-Index mit diesen Parametern verzichtet.

#### **3.2.5.1 Prognostischer Wert des Ki-67-Index**

Bei CHOP-therapierten Patienten war der Ki-67-Index mit einem  $p = 0,0015$  ein hoch signifikanter prognostischer Parameter für die TTF. Adjustiert auf den IPI erwies er sich der Ki-67-Index mit einem  $p = 0,0032$  auch als unabhängiger hochsignifikanter Prognosemarker der TTF. Auch beim OS ist der Ki-67-Index adjustiert auf den IPI mit einem  $p = 0,0007$  ein unabhängiger hochsignifikanter prognostischer Marker.

Bei R-CHOP-therapierten Patienten war der Ki-67-Index mit einem  $p = 0,0376$  ebenfalls signifikant prognostisch für die TTF. Adjustiert auf den IPI ließ sich der Ki-67-Index mit einem  $p = 0,2942$  nicht als unabhängiger signifikanter prognostischer Marker etablieren. Betrachtet man das OS, so ist für den Ki-67-Index adjustiert auf den IPI mit einem  $p = 0,1815$  der prognostische Wert etwas höher als für die TTF, wenn auch noch nicht unabhängig signifikant.

### 3.2.5.2 Prognostischer Wert der Mitosenzahl

Der prognostische Wert der Mitosenzahl pro  $\text{mm}^2$  ist mit einem  $p = 0,0004$  ebenfalls hochsignifikant für die TTF bei CHOP-therapierten Patienten und hält auch in der Adjustierung auf den IPI mit einen  $p$ -Wert von  $0,0001$  als hochsignifikanter unabhängiger prognostischer Parameter stand. Auch zur Prognose des OS lässt sich die Mitosenzahl, adjustiert auf den IPI, mit einem  $p = 0,0398$  als signifikanter unabhängiger Prognosemarker anwenden.

Betrachtet man die R-CHOP-therapierten Patienten, so erweist sich auch hier die Mitosenzahl mit einem  $p = 0,0269$  als signifikanter prognostischer Marker für die TTF. Adjustiert für IPI ist die Mitosenzahl jedoch nicht unabhängig signifikant für die TTF ( $p = 0,0991$ ), wohl aber für das OS ( $p = 0,0276$ ).

### 3.2.5.3 Etablierung von Risikogruppen des Ki-67-Index

Zur prognostischen Beurteilung bei MCL wird zur Verwendung im *MCL international prognostic index* (MIPI) die Unterteilung der Ki-67-Indizes in drei Risikogruppen vorgeschlagen.

Die niedrigste Gruppe enthält die Fälle mit weniger als 10 % Ki-67-Positivität. Sie umfasst 32 % der Fälle. Wie in Abbildung 5 zu erkennen, erreicht diese Gruppe unter CHOP-Therapie ein medianes OS von 112 Monaten. Es folgt eine mittlere Gruppe von 10 bis weniger als 30 %. In dieser Gruppe liegen 52 % der Fälle, das mediane OS bei CHOP-Therapie liegt bei 59 Monaten. Die Hochrisikogruppe sind die Fälle mit über 30 % Ki-67-Index. Sie umfasst nur 16% der Patienten, das mediane OS bei CHOP-Therapie sind 34 Monate. Die OS-Werte sind mit einem  $p = 0,0002$  hoch signifikant.

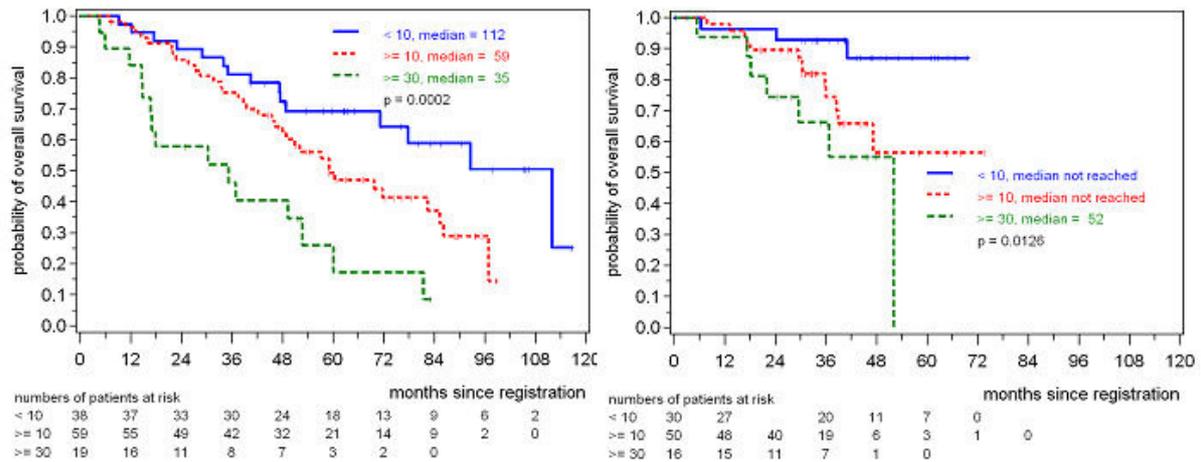


Abbildung 5: Ki-67-Indizes und OS bei CHOP (links) und R-CHOP-Therapie (rechts)

In der kleineren Gruppe der R-CHOP-therapierten Patienten (siehe Abbildung 5) hat der prognostische Wert der Risikogruppen für das OS mit einem  $p = 0,0128$  ebenfalls Bestand, obwohl bisher erst in der Hochrisikogruppe der Median des OS mit 52 Monaten erreicht wurde.

### 3.3 Methodenvergleich zur Beurteilung der Proliferationsaktivität

Betrachtet man die manuelle Zählung des Ki-67-Index von 1000 Zellen als Goldstandard der Datenerhebung für den prognostischen Faktor Proliferationsaktivität, werden hier verschiedene weniger aufwändige Methoden in Hinblick auf ihren prädiktiven Wert für den Ki-67-Index verglichen. Hierbei werden die Werte unter 60 % gesondert analysiert, da oberhalb dieses Wertes eine Scheinkorrelation wahrscheinlich ist.

Die 11 Panelpathologen hatten Schätzwerte des Ki-67-Index von identischen Fällen abgegeben, die stark voneinander abwichen. Die Schätzwerte eines einzelnen Falles konnten zwischen 5 % und 85 % schwanken. In der Gruppe unter 60 % Ki-67-Index schwankt der Korrelationskoeffizient der Pathologen zwischen  $r = 0,42$  und  $r = 0,57$  (siehe Tabelle 1). Es

Werte	Maß	Mean	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11
Unter													
60%	$r^*$	0.62	0.63	0.57	0.45	0.64	0.68	0.63	0.50	0.50	0.57	0.63	0.48
Alle	$r^*$	0.79	0.80	0.74	0.66	0.76	0.81	0.79	0.75	0.74	0.89	0.76	0.59

Tabelle 1: Die Ki-67-Schätzwerte der 11 Panelpathologen wurden mit den auf 1000 Tumorzellkernen gezählten Ki-67-Indizes einzeln und im Mittelwert (Mean) korreliert. Wegen wahrscheinlicher Scheinkorrelation wurden die Werte über 60 % ausgeschlossen.

$r^*$  = Pearsonscher Korrelationskoeffizient (lineare Korrelation)

wurde auf eine einzelne Analyse der Schätzwerte verzichtet und lediglich der Mittelwert aller 11 Pathologen bezüglich seiner Korrelation mit dem gezählten Ki-67-Index auf 1000 Tumorzellkerne untersucht. Bei der mittleren Schätzung der Pathologen für Ki-67-Indizes unter 60 % liegt der Korrelationskoeffizient nur bei  $r = 0,62$ .

Noch schlechter als die Schätzung durch die Experten ließ die elektronische Auswertung mit Bildanalysesoftware Rückschlüsse auf den durch Zählung von 1000 Tumorzellkernen ermittelten Ki-67-Index zu. Der Korrelationskoeffizient bei Werten unter 60 % liegt für die Flächenanalyse noch etwas höher bei  $r = 0,42$  und bei der Zellkernanalyse bei nur  $r = 0,28$  (siehe Tabelle 2).

Werte	Maß	Kerne	Fläche
Unter 60%	$r^*$	0.28	0.42
Alle	$r^*$	0.09	0.73

**Tabelle 2: Korrelationskoeffizienten der elektronischen Zählung der positiven Zellkerne und der positiven Fläche im Vergleich mit der manuellen Zählung von 1000 Tumorzellkernen.**

$r^*$  = Pearsonscher Korrelationskoeffizient (lineare Korrelation)

Die Zählung der Ki-67-positiven Zellen wurde von 4 Pathologen jeweils für die 100er Schritte einzeln erfasst und bezüglich ihres prädiktiven Wertes für die Zählung von 1000 Tumorzellkernen beurteilt (Tabelle 3). Dabei fand sich ein signifikanter Sprung des CCC (*Concordance Correlation Coefficient*) von 100 auf 200 Zellen ( $CCC = 0,74$  bei Werten unter 60 % Ki-67-Index). Der CCC steigerte sich nur noch in geringem Maße mit jeden weiteren 100 Zellen, die gezählt wurden.

	N	R	CCC	LCL	UCL
1 Zählung	8	4	0.68	0.54	0.79
2 Zählungen (MW)	8	4	0.74	0.63	0.84
3 Zählungen (MW)	8	4	0.76	0.63	0.84
4 Zählungen (MW)	8	4	0.78	0.62	0.87
5 Zählungen (MW)	8	4	0.80	0.68	0.88

**Tabelle 3: Concordance Correlation Coefficient (CCC) als Maß für die Übereinstimmung der Werte aus verschiedenen Zählungen. MW: Mittelwert, N: Anzahl Proben, R: Anzahl Rater (4 Pathologen), LCL, UCL: Lower/Upper 95 % Confidence limit, mit Bootstrap berechnet.**

### 3.3.1 Methodische Anmerkungen zur Zählung des Ki-67-Index

Bei MCL liegen die beurteilbaren Areale in der Mitte der Tumorknötchen, zwischen den proliferationsaktiveren internodulären T-Lymphozytenarealen und außerhalb partiell aufgesiedelter Keimzentren. Auch proliferationsaktive sogenannte Hotspots sind zu meiden (siehe Abbildung 6).

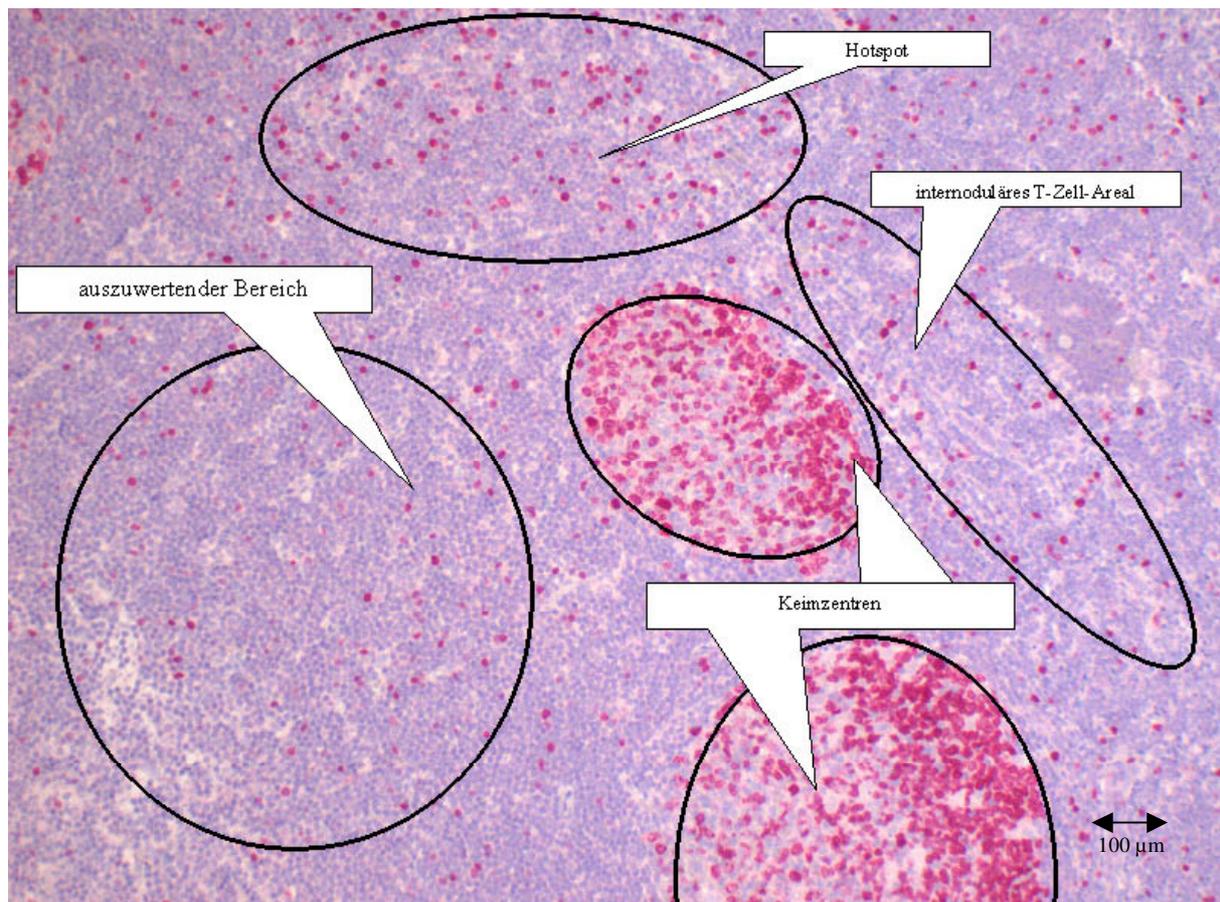
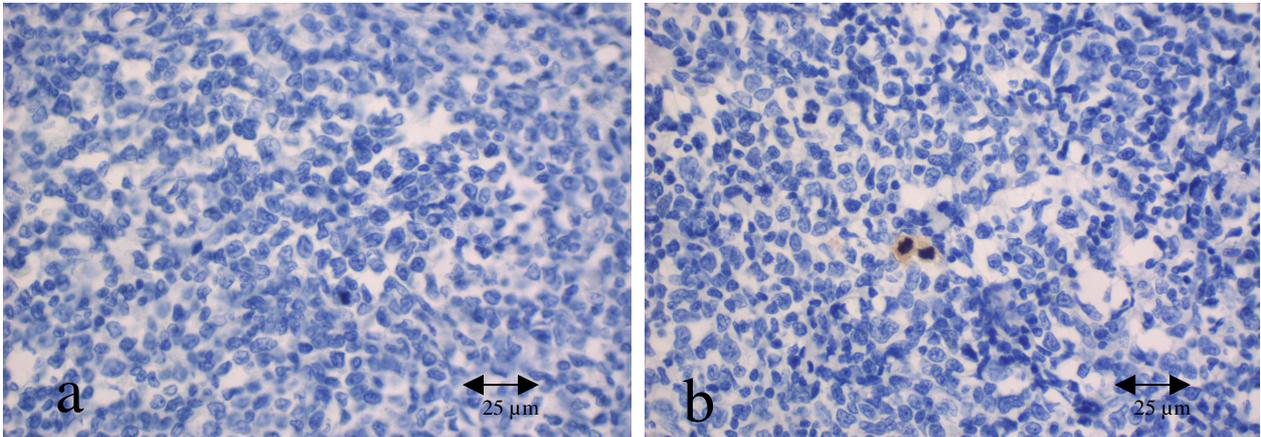


Abbildung 6: Beurteilbare Areale für Ki-67 (100x, APAAP)

Darüber hinaus ist die Kenntnis und Vermeidung von Ki-67-Färbeartefakten notwendig. Ki-67 ist auch bei schwacher nukleärer Anfärbung als positiv zu werten, jedoch färben sich bei zu schwacher Reaktion lediglich die morphologisch erkennbaren Mitosefiguren. In diesem Fall ist die Färbung nicht auswertbar und muss wiederholt werden (siehe Abbildung 7).



**Abbildung 7: Färbeartefakte: a Ki-67 komplett negativ; b Ki-67 färbt nur Mitosefiguren (je 400x, DAB). Diese Färbungen sind nicht beurteilbar und müssen wiederholt werden.**

## 4 Diskussion

Das Mantelzell-Lymphom (MCL) ist eine maligne lymphoproliferative Erkrankung, die in der WHO-Klassifikation zu den reifzelligen B-Zell-Lymphomen gezählt wird (Harris et al., 2000). Trotz des kleinzelligen, nicht-blastischen Zellbildes zeigt das MCL ein aggressives Verhalten und führt ohne Therapie nach kurzer Zeit zum Tod des Patienten. In der Vergangenheit wurde durch aggressive Polychemotherapien nur eine geringe Verlängerung der Überlebenszeit erreicht. Auch bei initialem Ansprechen auf die Therapie waren innerhalb von drei Jahren nach Diagnosestellung die meisten Patienten verstorben (Lenz et al., 2004a). Es gab jedoch schon immer eine kleine Population von MCL-Patienten, die sich durch ein besseres Ansprechen auf die Therapien und einen sehr viel besseren Verlauf mit längerer Überlebenszeit auszeichneten (Campo et al., 1999). In der Vergangenheit ist deshalb nach klinischen und biologischen Parametern gesucht worden, die den Krankheitsverlauf bereits bei Diagnosestellung vorhersagen und eine risikoadaptierte Therapie ermöglichen sollten. In den Untersuchungen erwiesen sich zahlreiche klinische Parameter als prädiktive Faktoren für den Krankheitsverlauf: Der ECOG-Leistungsindex, das Patientenalter, der LDH-Spiegel im Serum, das Krankheitsstadium nach Ann Arbor, Vorliegen von Splenomegalie und Anämie.

Die ersten beiden Parameter in der Liste, der ECOG-Leistungsindex (Oken et al., 1982) und das Patientenalter, erlauben eine Aussage auf die Fähigkeit des Patienten, eine aggressive Therapie zu tolerieren. Der ECOG-Leistungsindex der Eastern Cooperative Oncology Group beurteilt die körperliche Leistungsfähigkeit und -einschränkung des Patienten auf einer Skala von 0 bis 5. 0 Punkte entsprechen der vollen Leistungsfähigkeit, 5 Punkte entsprechen dem Tod des Patienten. Ein hoher ECOG-Wert wie auch ein hohes Patientenalter sind indirekte Hinweise auf eine schlechte Verträglichkeit einer aggressiven Therapie und damit prognostische Parameter für einen schlechten Krankheitsverlauf. Die letzteren Parameter geben einen klinischen Hinweis über die Ausbreitung der Erkrankung und die Tumorlast.

Die Lactatdehydrogenase im Serum ist erhöht bei gesteigertem Zellzerfall, wie er bei bösartigen Erkrankungen zu beobachten ist. Ein hoher LDH-Spiegel steht also für eine hohe Tumorlast. Das Erkrankungsstadium nach Ann Arbor (Carbone et al., 1971) unterteilt eine lokalisierte von einer generalisierten Lymphomerkkrankung. Ein niedriges Tumorstadium ist beim MCL ein Zeichen für einen besseren klinischen Verlauf, da häufig bei einer lokalisierten

Erkrankung die Tumorlast geringer ist als bei einer generalisierten systemischen Erkrankung. Auch können bei lokalisierter Lymphominfiltration topische Therapien wie Bestrahlungen und möglicherweise Resektion zu erfolgreicher Tumorreduktion angewendet werden (Andersen et al., 2002). Darüber hinaus ist eine lokalisierte Infiltration auch ein indirekter Hinweis auf eine gute Differenzierung der Tumorzellen mit funktionsfähigen Homing-Faktoren. Diese Homing-Faktoren führen bei Rezirkulation der Lymphomzellen durch den Blutkreislauf zu einer erneuten Ansammlung an einem bestimmten betroffenen Organ, z. B. einem Lymphknoten oder dem Colon. Weitere Hinweise auf eine generalisierte Erkrankung sind eine Infiltration der Milz (Splenomegalie) und des blutbildenden Knochenmarkes (Anämie).

Die oben beschriebenen klinischen Parameter wurden im Internationalen Prognostischen Index (IPI) (International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, 1993), der zur prognostischen Einschätzung des Diffusen Großzelligen B-Zell-Lymphoms entwickelt wurde, zusammengefasst. Die klinische Beurteilung von Patienten mit dem IPI ist weit verbreitet, und es wurde versucht, den IPI auch auf andere Entitäten wie das MCL anzuwenden. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich der IPI durchaus als signifikanter prognostischer Parameter auf den Verlauf des MCL anwenden lässt, und zwar sowohl für die TTF als auch für das OS (siehe Abschnitt 3.2.1). Diese Signifikanz bleibt sowohl für CHOP als auch für R-CHOP-Therapie bestehen.

Ein Nachteil des IPI als prognostischen Marker des MCL ist die fehlende Beurteilung der biologischen Aggressivität der Lymphomzellen, wie sie vom Histopathologen zum Zeitpunkt der primären Diagnosestellung eingeschätzt werden kann. In der histopathologischen Beurteilung des MCL lässt sich die Erkrankung in vier zytologische und drei architektonische Gruppen unterteilen. Die zytologisch besser differenzierten Formen sind die klassische MCL-Zytologie mit gekerbten Zellkernen und schmalen Zytoplasma sowie die kleinzellige Variante mit runden Zellkernen, die an die Chronische Lymphatische B-Zell-Leukämie erinnert. Davon grenzt man die unreiferen Formen, nämlich die pleomorphe Variante mit Zellen wie bei Diffusem Großzelligem B-Zell-Lymphom und die blastäre Variante mit Zellen wie bei einem B-Lymphoblastischen Lymphom ab (Banks et al., 1992; Weisenburger and Armitage, 1996). Nach der WHO-Klassifikation werden die letzten beiden Varianten als blastoide Variante zusammengefasst (Harris et al., 2000).

Bei der Beurteilung der Architektur unterscheidet man in absteigender Differenzierung das Mantelzonenwachstumsmuster vom nodulären Wachstum und dem diffusen Wachstum (Campo et al., 1999). Trotz der deutlichen Unterschiede der morphologischen Erscheinungsbilder ließ die Beurteilung von Zytologie und Architektur eine signifikante, prognostisch und therapeutisch relevante Aussage über die wahrscheinliche Überlebenszeit der Patienten nicht zu (Tiemann et al., 2005).

Die Beurteilung der Zellteilungsaktivität war in der Vergangenheit der einzige biologische Parameter, der eine signifikante und therapeutisch relevante Prognose der Überlebenszeit des Patienten erlaubte. In seiner Habilitationsschrift (Schrader, 2005) untersuchte Schrader Proben von 351 MCL-Patienten aus den Jahren 1972 bis 1994. Dabei erfolgte die Erhebung des Mitose-Index durch Zählen der Mitosefiguren pro mm<sup>2</sup> sowie die immunhistochemische Untersuchung der Proliferationsrate mit Ki-67 und Zählung von je 500 Zellen mit Errechnung eines Prozentsatzes Ki-67-positiver Tumorzellen. Es zeigte sich, dass sowohl der Mitose-Index als auch der Ki-67-Index signifikante prognostische histopathologische Parameter der Überlebenszeit von Patienten mit MCL waren (Schrader et al., 2004; Schrader et al., 2005a; Schrader et al., 2005b).

Seit der zuletzt genannten Untersuchung hat sich insbesondere auf Grund der Einführung von autologen und allogenen Stammzelltransplantationen und moderner Immuntherapien mit dem Einsatz von Antikörpern gegen das B-Zell-Antigen CD20 der Krankheitsverlauf erheblich verändert. Auch wenn das Gesamtüberleben (OS) durch den Einsatz der Immuntherapie nicht verbessert werden konnte, ist es zu einer deutlichen Verlängerung des krankheitsfreien Überlebens (TTF) gekommen (Lenz and Dreyling, 2005). Nach wie vor kommt es jedoch zu stark unterschiedlichen Krankheitsverläufen, die eine Prognose zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wünschenswert machen. Das *European MCL Network* erarbeitet zu diesem Zweck den *MCL international prognostic index* (MIPI) mit klinischen Parametern, der kürzlich vorgeschlagen wurde (Hoster et al., 2008). Das *European MCL Network* wünscht auch das Einfließen biologischer Parameter in den MIPI und hat hier insbesondere das Augenmerk auf die Tumorzellproliferation gerichtet.

Die Einführung der neuartigen Therapien hat bei anderen Lymphomentitäten etablierte Biomarker entwertet. So hat der Marker BCL2, der zuvor beim Diffusen Großzelligen B-Zell-Lymphom mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet war (Kramer et al., 1996; Sanchez

et al., 1998), unter Radio-Immunotherapie seine vorherige Relevanz verloren (Wilson et al., 2008).

Ziel dieser Arbeit war es, die prognostische Relevanz der etablierten biologischen Parameter Mitose-Index pro mm<sup>2</sup> und Ki-67-Index bei modernen Therapieprotokollen unter Einschluss der Immuntherapie zu überprüfen. Es sollte ein großes Patientenkollektiv aus den prospektiven und randomisierten Studien des *European MCL Network* mit im Panel referenzpathologisch gesicherten Diagnosen und einheitlichen Therapien untersucht werden. Ferner sollten Methoden aufgezeigt werden, wie diese Befunde in der täglichen Routinediagnostik einfach und verlässlich erhoben werden können, um sie in den von Hoster vorgeschlagenen *MCL international prognostic index* (MIPI) als biologischen Marker einbringen zu können (Hoster et al., 2008).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in prospektiven Studien die Beurteilung der mitotischen Aktivität in der initialen Biopsie durch Erstellen eines Ki-67-Index durch Zählung von 1000 Tumorzellkernen eine prognostische Aussage für die Zeit bis zum Therapieversagen (TTF) sowohl der mit CHOP als auch der mit R-CHOP therapierten Patienten erlaubt (Determann et al., 2008). Eine vergleichbare Arbeit mit ähnlich großen und diagnostisch abgesicherten Patientenkollektiven in prospektiven Studien mit modernen Therapien, insbesondere mit Rituximab-Therapie, lag in der Literatur noch nicht vor.

Für die praktische Umsetzung der Risikostratifizierung im Rahmen des MIPI werden drei Risikogruppen vorgeschlagen mit weniger als 10 %, 10-30 % und über 30 % Ki-67-Index. Diese Aufteilung erlaubt verwendbare Gruppengrößen von 32 %, 52 % und 16 % der Patienten und die höchste statistische Signifikanz beim OS. Auch unterteilt auf die Patientengruppen, die mit CHOP und R-CHOP therapiert wurden, bleiben die prognostischen Gruppen immer noch hoch signifikant. Es wird deshalb die Übernahme dieser Gruppen in den *MCL international prognostic index and combined biological index* (MIPI<sub>b</sub>) (Hoster et al., 2008) vorgeschlagen. Mit Einführung dieser Untersuchung wäre somit in zukünftigen prospektiven Therapiestudien eine Risikostratifizierung der Patienten nach Kriterien der Tumorbiologie möglich. Eine breitere Anwendung und Validierung im Rahmen der Therapiestudien des *European MCL Network* ist in Vorbereitung.

Um die Proliferationsaktivität jedoch auf breiter Basis im MIPI<sub>b</sub> zur Anwendung bringen zu können, wurden methodisch weniger aufwändige Methoden in Hinblick auf ihren prognostischen Wert für die von uns als „Goldstandard“ betrachteten Zählung von 1000 Tumorzellkernen untersucht. Die bei anderen Tumorentitäten sehr verbreitete Methode der Zählung von Mitosefiguren bei H. & E.-gefärbten histologischen Präparaten ist allen Pathologen geläufig und mit geringem technischen Aufwand überall umzusetzen. Jedoch lässt sich der Mitoseindex nicht unmittelbar in den Ki-67-Index übertragen und ist zur Einteilung in die drei vorgeschlagenen Risikogruppen nicht geeignet. Trotz der Signifikanz der prognostischen Aussage des Mitoseindex pro mm<sup>2</sup> wird die allgemeine Umsetzung nicht empfohlen, da die Streubreite der Mitosenzahl gering ist und sich nicht als unabhängiger Prognostischer Wert erwies (Hoster et al., 2008). Auch ist bei den oft dicht gelagerten, kleinen Tumorzellen eine genaue Zählung der Mitosefiguren nicht immer möglich. Ferner ist eine große Biopsie notwendig, eine kleine Probe oder auch eine nur partiell infiltrierte Probe würden das Ergebnis verfälschen.

Die immunhistochemische Untersuchung des Ki-67-Index ist eine Methode, die den meisten Pathologen zur Verfügung steht und von ihnen regelmäßig in der täglichen Diagnostik angewendet wird. Die laborchemischen Methoden sind nicht standardisiert und reichen von verschiedenen gebräuchlichen Antikörpern (Ki-S5, MiB-1) bis zu verschiedenen Entwicklungstechniken (APAAP, DAB), die jedoch bei Vermeidung der gelegentlich auftretenden Färbeartefakte zu brauchbaren Färbeergebnissen führen. In dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden der Auswertung der zur Verfügung stehenden Ki-67-Färbungen miteinander verglichen in Hinblick auf die praktische Verwendbarkeit für den MIPI.

Die einfache Schätzung des Ki-67-Index durch mikroskopische Inaugenscheinnahme, das sogenannte „eyeballing“, ist eine in der täglichen Routinediagnostik weitverbreitete Methode, um schnell und mit geringem Aufwand zu einem Ergebnis zu kommen. Trotz der großen Erfahrung der Lymphopathologen des Pathologenpanels hat diese Methode für die einzelnen Pathologen und auch für den inter-observer Mittelwert der gesamten Gruppe keine verwertbaren Ergebnisse hervorgebracht. Die einfache Schätzung des Ki-67-Index ist aus diesem Grund für die Risikostratifizierung im Rahmen des MIPI nicht geeignet. Eine mögliche Ursache für die große Diskrepanz der Pathologen untereinander ist die unterschiedliche Auswahl der als repräsentativ angesehenen Areale. Unterschiedliche Beimengungen an proliferierenden T-Lymphozyten, Stromazellen und Keimzentrumzellen,

die in der Übersichtsvergrößerung fälschlich als Tumorzellen gewertet worden sein könnten, können die Schätzung des Ki-67-Index erheblich beeinflussen. Eine weitere Fehlerquelle bei der Schätzung ist die fehlende „Selbsteichung“ des Untersuchers, der sich durch häufige Objektivierung seiner Schätzergebnisse durch Zählung immer wieder selbst korrigieren würde.

Große Hoffnung in Bezug auf Objektivität und Reliabilität lag auf der computergestützten Bildanalyse zur Ermittlung Ki-67-positiver Zellkerne oder Flächenanteile. Die hier verwendete Methode lässt jedoch keine gültige Beurteilung des Ki-67-Index zu. Trotz der guten Ergebnisse, die mit Bildanalyse bei zytologischen Ausstrichpräparaten und in der Beurteilung solider Tumoren erzielt werden, waren die Ergebnisse beim MCL hier nicht verwertbar. Eine mögliche Ursache hierfür sind die kleinen, dicht beisammen liegenden Lymphomzellen, die den Computer bei der Partikelabgrenzung überforderten. Häufig wurden mehrere Zellkerne als ein einziger gewertet oder aber ein einzelner in mehrere Partikel aufgeteilt. Um die Formenerkennung der Zellkerne durch den Computer zu umgehen, wurden auch die positiven und negativen Flächenanteile untersucht. Möglicherweise durch die unterschiedlichen Anschnittsflächen und auch die Größenvariabilität der Tumorzellen kam es hier zu Unwägbarkeiten. Eine Schwierigkeit hierbei ist, dass die proliferationsaktiveren Lymphomzellen häufig auch ein weites Zytoplasma haben, welches wiederum als Ki-67-negativer Flächenanteil gewertet wurde. Auch wenn in der vorliegenden Arbeit mit Computeranalyse keine verwertbaren Ki-67-Indizes erstellt werden konnten, sollte dieser Bereich weiter untersucht werden. Zweifellos wird neuere Bildanalyse-Software in Kürze die Partikel besser erkennen oder durch geeignete Schwellenwerte den Zytoplasmaanteil der Flächenuntersuchung besser eliminieren. Eine schnelle, kostengünstige und verlässliche Computeranalyse des Ki-67-Index wäre für die allgemeine Anwendung im MIPI sehr wünschenswert. Vielversprechende Versuche sind hierzu in Arbeit (Rule, persönliche Mitteilung).

Für die praktische Umsetzung empfiehlt sich daher jetzt die manuelle Zählung von 200 Zellkernen zur Ermittlung des Ki-67-Index. Diese Zählung ist mit geringem zeitlichen Aufwand im diagnostischen Alltag zu bewältigen und zeigt ein hohes Maß an Übereinstimmung mit unserem definierten „Goldstandard“, der Zählung von 1000 Tumorzellkernen. Eine weitere wesentliche Erhöhung des *Concordance Correlation Coefficient* (CCC) für die nächsten 300 Zellkerne ergab sich nicht. Wichtig für

reproduzierbare Ergebnisse ist jedoch die sorgfältige Auswahl der zu untersuchenden Areale, die in der Knotenmitte abseits von Keimzentrumsresten, T-Zell-Arealen und „Hot Spots“ liegen sollen.

Die Erhebung des Ki-67-Index durch die Beurteilung von 200 Tumorzellen ist ein histopathologischer Parameter, der mit geringem Aufwand und hoher Reliabilität im diagnostischen Alltag erzeugt werden kann. Er kann zur Einteilung der Patienten mit MCL in drei Risikogruppen und zur Verwendung im MIPI<sub>b</sub> zur Einordnung der Patienten in risikoangepasste Therapiegruppen verwendet werden. Für eine verwertbare und reproduzierbare Beurteilung des Ki-67-Index ist eine sorgfältige Schulung der beteiligten Pathologen notwendig, um vergleichbare repräsentative Areale auszuwählen. Die hier beschriebenen Ergebnisse stellen die Grundlage für eine Anwendung des Ki-67-Index als Therapieentscheidungshilfe in zukünftigen Studien vor.

## 5 Zusammenfassung

Das Mantelzell-Lymphom (MCL) ist eine bösartige B-Zell-Neoplasie, die in der Vergangenheit trotz intensiver Chemotherapie einen aggressiven Verlauf zeigte und bei der Mehrzahl der Patienten innerhalb zwei Jahren nach der Diagnosestellung zum Tode führte. Eine kleine Gruppe von Patienten mit Mantelzell-Lymphom zeigt jedoch einen erheblich indolenteren Krankheitsverlauf, so dass in der Vergangenheit nach Faktoren gesucht wurde, die bereits bei Diagnosestellung eine prognostische Aussage über den klinischen Verlauf erlauben. Neben klinischen Parametern wurde als bester biologischer Faktor die Proliferationsaktivität, gemessen am Ki-67-Index, identifiziert. Das Patientenkollektiv war jedoch heterogen und die Therapiestudien überwiegend retrospektiv. Ferner führte die Einführung neuer Therapiekonzepte mit myeloablativer Chemotherapie und Immuno-Chemotherapie zu einer erheblichen Verbesserung der rezidivfreien Überlebenszeit der Patienten. Ziel dieser Arbeit war daher, die prognostische Relevanz der Proliferationsaktivität unter den neuen Therapiebedingungen im Rahmen des *European MCL Network* zu überprüfen sowie die beste Methodik zur Proliferationsbeurteilung festzulegen.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die Proliferationsaktivität, gemessen am Ki-67-Index, in prospektiven und randomisierten Therapiestudien mit modernen Chemotherapien und Immuno-Chemotherapien ein hochsignifikanter biologischer Marker für die rezidivfreie Überlebenszeit und für die Gesamtüberlebenszeit von Patienten mit Mantelzell-Lymphomen ist. Die Proliferationsaktivität ist bisher der einzige biologische Marker, der in die Prognosebeurteilung von Patienten mit Mantelzell-Lymphomen eingehen kann und in Zukunft eine verlässliche Risikostratifizierung der Patienten zulassen wird. Es werden drei prognostische Gruppen mit Ki-67-Indizes unter 10 %, 10 bis 30 % sowie über 30 % zur Verwendung im *MCL international prognostic index and combined biological index* (MIPI<sub>b</sub>) vorgeschlagen.

Der Ki-67-Index für die Untersuchung wurde durch die manuelle Auszählung von je 1000 Tumorzellkernen bei 249 Patienten mit durch ein Lymphomexpertenpanel diagnostisch gesicherten Mantelzell-Lymphomen erstellt. Um eine allgemeine Umsetzbarkeit der Untersuchungen in der Routinediagnostik des Mantelzell-Lymphoms zu ermöglichen, wurden weniger aufwändige Methoden erprobt und in ihrem prognostischen Wert auf das Auszählen

von 1000 Tumorzellkernen hin untersucht. Die einfache Schätzung des Ki-67-Index durch die Lymphomexperten des *European MCL Network* und die computergestützte Auswertung durch Bilderkennungssoftware ergeben keine verwertbaren Ergebnisse. Es ist jedoch möglich, durch die manuelle Auszählung von 200 Tumorzellkernen einen hinreichend genauen Ki-67-Index aufzustellen, der im MIPI<sub>b</sub> Verwendung finden kann. Wichtig für eine verlässliche Auswertbarkeit des Ki-67-Index ist neben der Zahl der beurteilten Tumorzellkerne vor allem die Auswahl des repräsentativen Areals im histologischen Schnitt abseits von T-Zell-Arealen, aufgesiedelten Keimzentren und proliferationsaktiven „Hot Spots“.

## 6 Literaturverzeichnis

- Andersen NS, Jensen MK, de Nully BP, Geisler CH (2002) A Danish population-based analysis of 105 mantle cell lymphoma patients: incidences, clinical features, response, survival and prognostic factors. *Eur.J.Cancer* 38:401-408
- Argatoff LH, Connors JM, Klasa RJ, Horsman DE, Gascoyne RD (1997) Mantle cell lymphoma: a clinicopathologic study of 80 cases. *Blood* 89:2067-2078
- Banks PM, Chan J, Cleary ML, Delsol G, Wolf-Peeters C, Gatter K, Grogan TM, Harris NL, Isaacson PG, Jaffe ES, . (1992) Mantle cell lymphoma. A proposal for unification of morphologic, immunologic, and molecular data. *Am.J.Surg.Pathol.* 16:637-640
- Bernard M, Gressin R, Lefrere F, Drenou B, Branger B, Caulet-Maugendre S, Tass P, Brousse N, Valensi F, Milpied N, Voilat L, Sadoun A, Ghandour C, Hunault M, Leloup R, Mannone L, Hermine O, Lamy T (2001) Blastic variant of mantle cell lymphoma: a rare but highly aggressive subtype. *Leukemia* 15:1785-1791
- Bookman MA, Lardelli P, Jaffe ES, Duffey PL, Longo DL (1990) Lymphocytic lymphoma of intermediate differentiation: morphologic, immunophenotypic, and prognostic factors. *J.Natl.Cancer Inst.* 82:742-748
- Bosch F, Lopez-Guillermo A, Campo E, Ribera JM, Conde E, Piris MA, Vallespi T, Woessner S, Montserrat E (1998) Mantle cell lymphoma: presenting features, response to therapy, and prognostic factors. *Cancer* 82:567-575
- Campo E, Raffeld M, Jaffe ES (1999) Mantle-cell lymphoma. *Semin.Hematol.* 36:115-127
- Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M (1971) Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* 31:1860-1861
- Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KA, Stein H, Mason DY (1984) Immunoenzymatic labeling of monoclonal antibodies using immune complexes of alkaline phosphatase and monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP complexes). *J.Histochem.Cytochem.* 32:219-229
- Determann O, Hoster E, Ott G, Bernd WH, Loddenkemper C, Hansmann ML, Barth TE, Unterhalt M, Hiddemann W, Dreyling M, Klapper W (2008) Ki-67 predicts outcome in advanced-stage mantle cell lymphoma patients treated with anti-CD20 immunochemotherapy: results from randomized trials of the European MCL Network and the German Low Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 111:2385-2387
- Dreyling M, Lenz G, Hoster E, Van Hoof A, Gisselbrecht C, Schmits R, Metzner B, Truemper L, Reiser M, Steinhauer H, Boiron JM, Boogaerts MA, Aldaoud A, Silingardi V, Kluin-Nelemans HC, Hasford J, Parwaresch R, Unterhalt M, Hiddemann W (2005) Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network. *Blood* 105:2677-2684

- Elias JM, Phillips ME, Boss E, Merot Y, Mihm MC, Jr. (1987) The substitution of glucose-antiglucose oxidase complex (GAG) for peroxidase-antiperoxidase (PAP) in immunohistochemical studies of skin. *Int.J.Dermatol.* 26:362-365
- Harris NL (1994) Mantle cell lymphoma. *J.Clin.Oncol.* 12:876-877
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD (2000) The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting--Airlie House, Virginia, November, 1997. *Hematol.J.* 1:53-66
- Hiddemann W, Unterhalt M, Herrmann R, Woltjen HH, Kreuser ED, Trumper L, Reuss-Borst M, Terhardt-Kasten E, Busch M, Neubauer A, Kaiser U, Hanrath RD, Middeke H, Helm G, Freund M, Stein H, Tiemann M, Parwaresch R (1998) Mantle-cell lymphomas have more widespread disease and a slower response to chemotherapy compared with follicle-center lymphomas: results of a prospective comparative analysis of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *J.Clin.Oncol.* 16:1922-1930
- Hiddemann W, Unterhalt M, Wormann B (1996) [Therapy of low-grade non-Hodgkin lymphomas]. *Schweiz.Rundsch.Med.Prax.* 85:357-363
- Hoster E, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, Van Hoof A, Kluin-Nelemans HC, Pfreundschuh M, Reiser M, Metzner B, Einsele H, Peter N, Jung W, Wormann B, Ludwig WD, Duhrsen U, Eimermacher H, Wandt H, Hasford J, Hiddemann W, Unterhalt M (2008) A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 111:558-565
- International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project (1993) A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N.Engl.J.Med.* 329:987-994
- Kramer MH, Hermans J, Parker J, Krol AD, Kluin-Nelemans JC, Haak HL, van Groningen K, Van Krieken JH, de Jong D, Kluin PM (1996) Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J.Clin.Oncol.* 14:2131-2138
- Kreipe H, Wacker HH, Heidebrecht HJ, Haas K, Hauberg M, Tiemann M, Parwaresch R (1993) Determination of the growth fraction in non-Hodgkin's lymphomas by monoclonal antibody Ki-S5 directed against a formalin-resistant epitope of the Ki-67 antigen. *Am.J.Pathol.* 142:1689-1694
- Lennert K (1975) Morphology and classification of malignant lymphomas and so-called reticuloses. *Acta Neuropathol.Suppl* 6:1-16
- Lenz G, Dreyling M (2005) Does the combination of rituximab and thalidomide influence the long-term perspectives of advanced-stage MCL? *Nat.Clin.Pract.Oncol.* 2:72-73
- Lenz G, Dreyling M, Hiddemann W (2004a) Mantle cell lymphoma: established therapeutic options and future directions. *Ann.Hematol.* 83:71-77
- Lenz G, Dreyling M, Hoster E, Wormann B, Duhrsen U, Metzner B, Eimermacher H, Neubauer A, Wandt H, Steinhauer H, Martin S, Heidemann E, Aldaoud A, Parwaresch R, Hasford J, Unterhalt M, Hiddemann W (2005) Immunochemotherapy with rituximab

- and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J.Clin.Oncol.* 23:1984-1992
- Lenz G, Dreyling M, Schiegnitz E, Forstpointner R, Wandt H, Freund M, Hess G, Truemper L, Diehl V, Kropff M, Kneba M, Schmitz N, Metzner B, Pfirmann M, Unterhalt M, Hiddemann W (2004b) Myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission prolongs progression-free survival in follicular lymphoma: results of a prospective, randomized trial of the German Low-Grade Lymphoma Study Group. *Blood* 104:2667-2674
- Meusers P, Hense J, Brittinger G (1997) Mantle cell lymphoma: diagnostic criteria, clinical aspects and therapeutic problems. *Leukemia* 11 Suppl 2:S60-S64
- Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP (1982) Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am.J.Clin.Oncol.* 5:649-655
- Raffeld M, Jaffe ES (1991) bcl-1, t(11;14), and mantle cell-derived lymphomas. *Blood* 78:259-263
- Rimokh R, Berger F, Delsol G, Dignonet I, Rouault JP, Tignaud JD, Gadoux M, Coiffier B, Bryon PA, Magaud JP (1994) Detection of the chromosomal translocation t(11;14) by polymerase chain reaction in mantle cell lymphomas. *Blood* 83:1871-1875
- Robb-Smith AH (1982) U.S. National Cancer Institute working formulation of non-Hodgkin's lymphomas for clinical use. *Lancet* 2:432-434
- Samaha H, Dumontet C, Ketterer N, Moullet I, Thieblemont C, Bouafia F, Callet-Bauchu E, Felman P, Berger F, Salles G, Coiffier B (1998) Mantle cell lymphoma: a retrospective study of 121 cases. *Leukemia* 12:1281-1287
- Sanchez E, Chacon I, Plaza MM, Munoz E, Cruz MA, Martinez B, Lopez L, Martinez-Montero JC, Orradre JL, Saez AI, Garcia JF, Piris MA (1998) Clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma is dependent on the relationship between different cell-cycle regulator proteins. *J.Clin.Oncol.* 16:1931-1939
- Schrader, C. Histopathologische und immunhistochemische Charakterisierung neuer Prognosefaktoren beim Mantelzell-Lymphom und deren klinische Bedeutung / vorgelegt von Carsten Schrader. 2005. Kiel, Univ., Habil.-Schr, 2006. Ref Type: Thesis/Dissertation
- Schrader C, Janssen D, Klapper W, Siebmann JU, Meusers P, Brittinger G, Kneba M, Tiemann M, Parwaresch R (2005a) Minichromosome maintenance protein 6, a proliferation marker superior to Ki-67 and independent predictor of survival in patients with mantle cell lymphoma. *Br.J.Cancer* 93:939-945
- Schrader C, Janssen D, Meusers P, Brittinger G, Siebmann JU, Parwaresch R, Tiemann M (2005b) Repp86: a new prognostic marker in mantle cell lymphoma. *Eur.J.Haematol.* 75:498-504

- Schrader C, Meusers P, Brittinger G, Teymoortash A, Siebmann JU, Janssen D, Parwaresch R, Tiemann M (2004) Topoisomerase IIalpha expression in mantle cell lymphoma: a marker of cell proliferation and a prognostic factor for clinical outcome. *Leukemia* 18:1200-1206
- Shipp MA (1994) Prognostic factors in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: who has "high-risk" disease? *Blood* 83:1165-1173
- Tiemann M, Schrader C, Klapper W, Dreyling MH, Campo E, Norton A, Berger F, Kluin P, Ott G, Pileri S, Pedrinis E, Feller AC, Merz H, Janssen D, Hansmann ML, Van Krieken JH, Moller P, Stein H, Unterhalt M, Hiddemann W, Parwaresch R (2005) Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. *Br.J.Haematol.* 131:29-38
- Velders GA, Kluin-Nelemans JC, De Boer CJ, Hermans J, Noordijk EM, Schuurin E, Kramer MH, Van Deijk WA, Rahder JB, Kluin PM, Van Krieken JH (1996) Mantle-cell lymphoma: a population-based clinical study. *J.Clin.Oncol.* 14:1269-1274
- Weisenburger DD, Armitage JO (1996) Mantle cell lymphoma-- an entity comes of age. *Blood* 87:4483-4494
- Weisenburger DD, Kim H, Rappaport H (1982) Mantle-zone lymphoma: a follicular variant of intermediate lymphocytic lymphoma. *Cancer* 49:1429-1438
- Weisenburger DD, Vose JM, Greiner TC, Lynch JC, Chan WC, Bierman PJ, Dave BJ, Sanger WG, Armitage JO (2000) Mantle cell lymphoma. A clinicopathologic study of 68 cases from the Nebraska Lymphoma Study Group. *Am.J.Hematol.* 64:190-196
- Wilson WH, Dunleavy K, Pittaluga S, Hegde U, Grant N, Steinberg SM, Raffeld M, Gutierrez M, Chabner BA, Staudt L, Jaffe ES, Janik JE (2008) Phase II study of dose-adjusted EPOCH and rituximab in untreated diffuse large B-cell lymphoma with analysis of germinal center and post-germinal center biomarkers. *J.Clin.Oncol.* 26:2717-2724
- Zoldan MC, Inghirami G, Masuda Y, Vandekerckhove F, Raphael B, Amorosi E, Hymes K, Frizzera G (1996) Large-cell variants of mantle cell lymphoma: cytologic characteristics and p53 anomalies may predict poor outcome. *Br.J.Haematol.* 93:475-486
- Zucca E, Fontana S, Roggero E, Pedrinis E, Pampallona S, Cavalli F (1994) Treatment and prognosis of centrocytic (mantle cell) lymphoma: a retrospective analysis of twenty-six patients treated in one institution. *Leuk.Lymphoma* 13:105-110
- Zucca E, Roggero E, Pinotti G, Pedrinis E, Cappella C, Venco A, Cavalli F (1995) Patterns of survival in mantle cell lymphoma. *Ann.Oncol.* 6:257-262

## 7 Verzeichnis der Abkürzungen

APAAP	alkaline Phosphatase-antialkaline Phosphatase
B-CLL	Chronische Lymphatische B-Zell-Leukämie
CCC	<i>concordance correlation coefficient</i> (Konkordanzkorrelationskoeffizient)
CHOP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednison
CHVmP/BV	Cyclophosphamid, Adriamycin, VM26, Prednison, Bleomycin, Vincristin
CHVP	Cyclophosphamid, Doxorubicin, Etoposid, Prednison
CIOP	Cyclophosphamid, Idarubicin, Vincristin, Prednison
COP	Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison
CR	<i>complete remission</i> (Vollremission)
DAB	Diaminobenzidin
DLBCL	<i>diffuse large B-cell-lymphoma</i> (Diffuses Großzelliges B-Zell- Lymphom)
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
freq	<i>frequency</i> (Häufigkeit)
GLSG	<i>German Low Grade Lymphoma Study Group</i> (deutschen Studiengruppe für niedrigmaligne Lymphome)
H. & E.	Hämatoxylin und Eosin
HIR	<i>high intermediate risk</i> (hohes mittleres Risiko)
HR	<i>high risk</i> (hohes Risiko)
IgD	Immunglobulin D
IgM	Immunglobulin M
IPI	<i>international prognostic index</i> (internationaler prognostischer Index)
KM	Knochenmark
LDH	Laktatdehydrogenase
LIR	<i>low intermediate risk</i> (geringes mittleres Risiko)
LR	<i>low risk</i> (geringes Risiko)
MCL	<i>mantle cell lymphoma</i> (Mantelzell-Lymphom)
MCP	Mitoxantron, Chlorambucil, Prednisolon

MIPI	<i>MCL international prognostic index</i> (MCL internationaler prognostischer Index)
MIPI <sub>b</sub>	<i>MCL international prognostic index and combined biological index</i> (MCL internationaler prognostischer Index mit biologischer Relevanz)
OR	<i>overall response</i> (Therapieansprechen)
OS	<i>overall survival</i> (Gesamtüberlebenszeit)
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PnM	Prednimustin, Mitoxantron
PR	<i>partial remission</i> (Teilremission)
R-CHOP	CHOP mit Rituximab
REAL	<i>revised European and American lymphoma</i> (-Klassifikation)
RD	<i>response duration</i> (Erfolgsdauer)
TTF	<i>time to treatment failure</i> (Zeit bis zum Therapieversagen)
WHO	<i>world health organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)

## 8 Danksagung

Ich danke:

Wolfram Klapper für die Überlassung des Themas und die sehr persönliche Betreuung,  
Günter Klöppel für die allgemeinpathologische Ausbildung sowie Rat und Hilfe bei dieser Arbeit,

Hans-Heinrich Wacker (Kiel), Hans Konrad Müller-Hermelink (Würzburg) und Harald Stein (Berlin) für die überlassenen MCL-Fälle,

Wolfgang Hiddemann und Martin Dreyling (LMV München) für die Benutzung der Patientendatenbank des *European MCL Network*,

Eva Hoster und Michael Unterhalt (LMV München) für Hilfe bei der statistischen Auswertung,

Jeroen van der Laak (Nijmegen) für Hilfe bei der computergestützten graphischen Bildanalyse,

Den Panelpathologen des *European MCL Network* für den Reviewprozess mit Diagnosesicherung, histologischer Typisierung und Schätzwerten von Ki-67: Thomas Barth (Ulm), Françoise Berger (Lyon), Wolfram Bernd (Lübeck), Martin Hansmann (Frankfurt am Main), Roman Kodet (Prag), Christoph Loddenkemper (Berlin), German Ott (Würzburg), Reza Parwaresch (Kiel), Stefano Pileri (Bologna), Elisabeth Ralfkiaer (Kopenhagen),

Ilske Oshlies für kollegialen Rat und Hilfe,

Dem Labor der Sektion für Hämatopathologie in Kiel für die Anfertigung der histologischen Präparate: Sigrid Augustin, Olivera Batic, Christina Boie, Charlotte von Drathen, Monika Hauberg, Hanne Jacobsen, Christiane Mäder, Edda Sevecke-Wessel, Christiane Stange, Michael Weiß,

Reza Parwaresch † für die Weckung meines Interesses an der Hämatopathologie

und meiner Frau Almut Determann für ihre Liebe und Unterstützung.

## 9 Lebenslauf

Olaf Determann

geboren am 2. August 1970 in Buchholz in der Nordheide

1987-88 Austauschschüler an der El Dorado High School in Placerville, Ca, USA

1990 Abitur am Albert-Einstein-Gymnasium in Buchholz in der Nordheide

1990-91 Zivildienst im Rettungsdienst beim Deutschen Roten Kreuz, Kreisverband  
Winsen an der Luhe

1991-98 Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

1998 Staatsexamen

1998-2000 Arzt im Praktikum und

seit 2000 Weiterbildungsassistent am Institut für Pathologie im Universitätsklinikum  
Schleswig-Holstein, Campus Kiel, an der Christian-Albrechts-Universität zu  
Kiel

Schwerpunkt in der Sektion für Hämatopathologie und Lymphknotenregister

2006-8 Erstellung der vorliegenden Inauguraldissertation