Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

aus dem
Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie
Direktor: Prof. Dr. Peter J. Wild

betreut am
Helios Klinikum Wuppertal, Institut für Pathologie

**Differentialdiagnostik der frühen primären Myelofibrose
(präPMF) gemäß der neuen WHO-Klassifikation**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Annika Rummel

aus Bad Soden am Taunus

Frankfurt am Main, 2020

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Hans Michael Kvasnicka
Korreferent/in:	Prof. Dr. Hubert Serve
Tag der mündlichen Prüfung:	20.10.2021

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abl	Ableson-Protoonkogen
ASS	Acetylsalicylsäure
ASXL1	Additional Sex Combs-Like 1
BCR	Breakpoint Cluster Region
BCSH	British Society for Haematology
Bzw.	Beziehungsweise
CALR	Calreticulin-Mutation
CD117	Cluster of Differentiation 117
CEL-NOS	Chronische Eosinophilenleukämie, nicht anderweitig klassifiziert
CML	Chronische myeloische Leukämie
CNL	Chronische Neutrophilenleukämie
DIPSS	Dynamic International Prognostic Scoring System
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMH	Extramedulläre Hämatopoese
ET	Essentielle Thrombozythämie
EZH2	Enhancer of Zeste Homolog 2
Ggf.	Gegebenenfalls
HE	Hämatoxylin-Eosin
HES	Hypereosinophiles Syndrom
HMR	Hochrisikomutation

HU	Hydroxyurea
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IFN- α	Interferon-alpha
IL	Interleukin
IPSET	International Prognostic Score of thrombosis in WHO-essential thrombocythemia
JAK	Januskinase
LDH	Laktatdehydrogenase
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MF	Myelofibrose
MIPSS	Mutation-enhanced international prognostic scoring system
MPL	Myoproliferative leukemia virus oncogene
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
MPN-U	Unklassifizierbare myeloproliferative Neoplasien
MPO	Myeloperoxidase
NASDCL	Naphtol-AS-D-Chloracetat-Esterase
PAS	Periodic Acid Schiff Reagent
PDGF	Platelet derived growth factor
PMF	Primäre Myelofibrose
präPMF	Präfibrotische Form der primären Myelofibrose
PV	Polycythaemia vera rubra
SF3B1	Splicing Factor 3b Subunit 1
SRSF2	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription

s. u.	Siehe unten
TET2	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2
TGF- β	Transforming growth factor- β
THAM	Trishydroxymethylaminomethan
U. a.	Unter anderem
WHO	World Health Organisation

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Primäre Myelofibrose (PMF)	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	WHO-Klassifikation der myeloproliferativen Neoplasien von 2016	2
1.1.3	Klinische Befunde der präPMF und der ET	4
1.1.4	Risikostratifizierung der PMF und der ET	6
1.1.5	Knochenmarkmorphologie der PMF im Vergleich zur ET	8
1.2	Diagnostik der myeloproliferativen Neoplasien anhand von molekularpathologischen Befunden	12
1.2.1	Weitere somatische Mutationen bei MPN	15
1.3	Differentialdiagnostik der präPMF zur ET	16
1.4	Therapie der präPMF und der ET	18
1.4.1	Hydroxyurea	19
1.4.2	Interferon-alpha	20
1.4.3	Anagrelide	21
1.4.4	Ruxolitinib	22
1.5	Fragestellung dieser Arbeit	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Übersicht über das Patientengut	24
2.2	Knochenmarkbiopsien	25
2.3	Anfärbungen der Biopsien	26
2.3.1	Routinefärbung	26
2.4	Morphologische Begutachtung	27
3	Ergebnisse	32
3.1	Histologische Begutachtung der Biopsien	32
3.2	Histologisches Bild der präfibrotische Form der PMF	33
3.3	Histologisches Bild der Essentiellen Thrombozythämie	36
3.4	Quantitative Unterscheidung der präPMF und ET	39
4	Diskussion	44
4.1	Diagnosekriterien der WHO-Klassifikation	44
4.2	Wertigkeit einzelner morphologischer Parameter	46
4.3	Wertigkeit einzelner klinischer Parameter	47

4.4	Reproduzierbarkeit der WHO-Klassifikation	49
5	Zusammenfassung	52
6	Summary	53
7	Literaturverzeichnis.....	54
8	Schriftliche Erklärung.....	65

1 Einleitung

1.1 Primäre Myelofibrose (PMF)

Die primäre Myelofibrose ist eine neoplastische Knochenmarkerkrankung aus dem Formenkreis der BCR-ABL1-negativen (Philadelphia-Chromosom-negativen) myeloproliferativen Neoplasien (MPN). Hierzu zählen des Weiteren die Essentielle Thrombozythämie (ET) sowie die Polyzythaemia vera (PV). Lediglich die chronische myeloische Leukämie ist unter den MPN BCR-ABL1-positiv.

Insgesamt werden den MPN in der aktuellen WHO-Klassifikation von 2016¹ folgende Krankheiten zugeordnet:

- Chronische myeloische Leukämie (CML)
- Polycythaemia vera rubra (PV)
- Essentielle Thrombozythämie (ET)
- Primäre Myelofibrose (PMF)
 - o Präfibrotische/frühe Form (präPMF)
 - o Fibrotische Form (PMF)
- Chronische Neutrophilenleukämie (CNL)
- Chronische Eosinophilenleukämie, nicht anderweitig klassifiziert (CEL-NOS)
- Hypereosinophiles Syndrom (HES)
- Unklassifizierbare myeloproliferative Neoplasien (MPN-U)

1.1.1 Epidemiologie

Die Inzidenz liegt zwischen 0,5 bis 1,3 pro 100.000 Einwohner jährlich^{2,3}.

Die PMF hat ihren Erkrankungsgipfel zwischen der 6. und 7. Lebensdekade, wobei beide Geschlechter annähernd gleich häufig betroffen sind⁴. Die Erkrankung tritt selten bereits im Kindesalter auf⁵. In der farbigen Bevölkerung tritt die PMF deutlich seltener auf⁶.

Familiäre Häufungen werden ebenfalls in der Literatur beschrieben, wobei in einigen Fällen ein autosomal-rezessiver Erbgang angenommen werden konnte⁷. Nach derzeitigem Wissensstand gilt die PMF jedoch als nicht vererbbar. Von einer familiären Prädisposition kann häufiger ausgegangen werden^{8,9}.

Der Erkrankungsgipfel der fibrotischen PMF liegt leicht über dem der präfibrotischen PMF, bei welcher die Patienten ein mittleres Alter von 57 Jahren bei Diagnosestellung haben¹⁰.

1.1.2 WHO-Klassifikation der myeloproliferativen Neoplasien von 2016

In der WHO-Klassifikation von 2001¹¹ fand erstmals die Einteilung der PMF in eine präfibrotische und eine fibrotische Form Einzug. Hier wurden neben den klinischen Kriterien auch histologische Befunde berücksichtigt.

In der WHO-Klassifikation von 2008 wurde diese Unterteilung der PMF erneut verlassen¹². Ein einfacheres Diagnoseschema wurde aufgeführt. Die histologische Begutachtung des Knochenmarks ist hier das zentrale diagnostische Kriterium. Großen Stellenwert wird zudem erstmals der Molekulargenetik zuteil, welche bereits in den Hauptkriterien aufgeführt wird.

2016 erfolgte eine erneute Überarbeitung der Diagnosekriterien¹. Hier wurde die Einteilung der PMF in eine präfibrotische (präPMF) und eine fibrotische Form (overt fibrotic PMF) nochmals aufgenommen. Dass die Unterscheidung zwischen den beiden Formen der PMF gerechtfertigt ist, zeigen nicht nur die unterschiedlichen Überlebenswahrscheinlichkeiten, sondern auch die therapeutischen Konsequenzen¹⁰.

Die charakteristischen klinischen Merkmale einer MPN sind in der aktuellen Klassifikation vorwiegend in die Nebenkriterien gerückt, da diese nicht spezifisch für eine MPN erscheinen.

Die Diagnosekriterien der MPN zeigen, dass eine korrekte Diagnosestellung nur in Zusammenschau der klinischen Befunde, der Knochenmarkhistologie und der Molekulardiagnostik möglich ist. In Tabelle 1 sind die aktuellen

Diagnosekriterien für die präfibrotische PMF aufgeführt; in Tabelle 2 die der Essentiellen Thrombozythämie.

Auf Basis der neuen WHO-Klassifikation sollen sich die verschiedenen Subtypen myeloproliferativer Neoplasien besser untereinander und auch gegenüber reaktiven Zuständen anderer Erkrankungen abgrenzen lassen.

Tabelle 1: WHO-Diagnosekriterien für die präPMF¹

Hauptkriterien	
1.	Megakaryozytäre Proliferation und Atypie, ohne Fibrosegrad > 1, begleitet von altersentsprechender erhöhter Knochenmarkzellularität, erhöhter Granulopoese und häufig verminderter Erythropoese
2.	Kein Erfüllen der WHO-Kriterien für BCR-ABL1-positive CML, PV, ET, myelodysplastische Syndrome oder anderer myeloischen Neoplasie
3.	Nachweis der JAK2, CALR oder MPL Mutation Oder Bei Fehlen einer dieser Mutationen: Nachweis eines anderen klonalen Markers (ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1) oder das Fehlen einer reaktiven Knochenmarkfibrose (aufgrund einer zugrundeliegenden Infektion, Autoimmunerkrankung, Haarzellenleukämie oder andere lymphoide Neoplasie, Knochenmarkmetastasen oder anderer toxischen, chronischen Myelopathien)
Nebenkriterien	
1.	Anämie, welche nicht auf eine andere Komorbidität zurückgeführt werden kann
2.	Leukozytose $\geq 11 \times 10^9/L$
3.	Tastbare Splenomegalie
4.	Laktatdehydrogenase-Erhöhung über dem Grenzwert

Für die sichere Diagnosestellung der präfibrotischen PMF müssen alle drei Hauptkriterien und ein Nebenkriterien erfüllt sein.

Tabelle 2: WHO-Diagnosekriterien für die ET¹

Hauptkriterien	
1.	Thrombozytose $\geq 450 \times 10^9/L$
2.	Knochenmarkbiopsie mit hauptsächlich megakaryozytärer Proliferation mit einer erhöhten Anzahl von vergrößerten, reifen Megakaryozyten mit hyperlobulierten Nukleolen. Keine signifikante Erhöhung oder Linksverschiebung der neutrophilen Granulopoese oder Erythropoese und sehr selten geringfügiger (Grad 1) retikulärer Fibrose
3.	Kein Erfüllen der WHO-Kriterien für BCR-ABL1-positive CML, PV, PMF, myelodysplastische Syndrome oder anderer myeloischen Neoplasie
4.	Nachweis der JAK2-, CALR- oder MPL-Mutation
Nebenkriterien	
1.	Nachweis eines klonalen Markers oder Fehlen des Beweises einer reaktiven Thrombozytose

Für die sichere Diagnosestellung der ET müssen alle vier Hauptkriterien und das Nebenkriterium erfüllt sein.

1.1.3 Klinische Befunde der präPMF und der ET

Die PMF zeigt kein einheitliches Krankheitsbild. Bis zu 30 % der Patientin sind bei Diagnosestellung asymptomatisch. Die Diagnosestellung erfolgt meist im Rahmen einer Routineuntersuchung, bei welcher klinische und laborchemische Befunde erhoben werden. Hierbei lassen eine Thrombozytose, eine Anämie, eine Erhöhung des Serum-LDH, ein leukoerythroblasisches Blutbild oder eine Splenomegalie an eine hämatologische Erkrankung denken^{4,5}.

Im initialen präfibrotischen Stadium der PMF kann diese durch eine isoliert auftretende Thrombozytose ohne weitere klinische oder laborchemische Merkmale der PMF als eine ET erscheinen und als solche fälschlicherweise diagnostiziert werden¹³⁻¹⁵. Im Wesentlichen entspricht auch das weitere

klinische Bild der präPMF dem der ET, wodurch die Diagnosestellung erschwert wird.

Mehr als 50 % der mit PMF diagnostizierten Patienten zeigen im Verlauf unspezifische Allgemeinsymptome als Zeichen der ineffektiven Hämatopoese (LDH-Erhöhung, Leukozytopenie, Anämie, Thrombozytopenie) wie Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit, Leistungsschwäche, Gewichtsverlust, mildes Fieber und/oder Dyspnoe¹⁶. Diese unspezifischen Symptome spiegeln die biologische Aktivität der Erkrankung wider, schränken die Patienten in ihrer Lebensqualität ein und sind mit einer Progression der Erkrankung assoziiert¹⁷.

Eine in ihrer Ausprägung variierende Splenomegalie findet sich bei bis zu 90 % der Patienten mit PMF^{5,18,4}. Selbst Ausdehnungen bis ins kleine Becken werden in der Literatur beschrieben¹⁹. Je nach Stadium der Erkrankung präsentiert bis zu 50 % der Patienten eine Hepatomegalie²⁰. Durch eine möglicherweise auftretende Hyperurikämie können Gichtanfälle und Nierensteine provoziert werden.

Sowohl die Splenomegalie als auch die Hepatomegalie sind Folgen der extramedullären Hämatopoese (EMH, auch myeloische Metaplasie)²¹, welche sich durch die Einwanderung neoplastischer Stammzellen entwickelt²². Auch Knochenschmerzen werden von Patienten beschrieben. Weitere mögliche Orte der EMH sind u. a. Lymphknoten, Nieren, Gastrointestinaltrakt (z. B. Ösophagus), Lunge, Pleura, Haut und Dura mater^{4,23,24}. Hierbei gibt es jedoch keine Korrelation zwischen EMH und Graduierung der Myelofibrose. Auch in sehr frühen Stadien der PMF kann bereits eine EMH vorliegen²⁰.

Im peripheren Blut zeigt sich charakteristischerweise ein leukoerythroblastisches Bild²⁵. Dieses ist geprägt von einer Linksverschiebung der Granulopoese und einer Poikilozytose und Anisozytose der Erythrozyten mit Dakrozyten (Tränentropfenzellen)²⁶.

Klinische Komplikationen sind vor allem thromboembolischer Genese und können jederzeit im Verlauf der PMF auftreten. Hierbei ist das Auftreten an atypischer Lokalisation charakteristisch (z. B. Budd-Chiari-Syndrom, Pfortaderthrombose)^{27,28}.

Eine Monozytose im peripheren Blut kennzeichnet ein Fortschreiten der Erkrankung²⁹.

Vergleicht man die klinische Darstellung der fibrotischen mit der präfibrotischen PMF, so liegen bei der präPMF deutlich seltener eine Leukozytopenie, Thrombozytopenie, Anämie, Splenomegalie oder klinische Symptome vor¹⁰. Dies spiegelt sich auch in der Risikostatifizierung wider, in welcher mehr Patienten mit der fibrotischen PMF sowohl bei Diagnosestellung als auch im Verlauf der Intermediär- oder Hochrisikogruppe zugeordnet werden. Todesursächlich bei der PMF sind am häufigsten die leukämische Transformation, kardiovaskuläre Erkrankungen und Infektionen³⁰.

1.1.4 Risikostratifizierung der PMF und der ET

Aufgrund des heterogenen klinischen Verlaufs und der unterschiedlichen medianen Überlebensdauer der PMF, ist die Einteilung der Patienten anhand von verschiedenen Prognose-Scores wichtig und sinnvoll. Hiermit lässt sich individuell die Prognosebestimmung konkretisieren und eine Therapieentscheidung beeinflussen.

Die mediane Überlebenszeit der Patienten mit PMF variiert von Monaten bis Jahren nach Erstdiagnose. Die Prognose ist jedoch zum einen abhängig vom Stadium der Erkrankung, in welcher die Diagnose gestellt wurde^{31,32} und zum anderen vom individuellen Risiko-Score, welcher anhand verschiedener prognostischen Scoring-Systeme bestimmt wird^{33,17,34,35}. So haben Patienten, welche im fibrotischen Stadium der PMF diagnostiziert wurden, eine mediane Überlebenszeit von drei bis sieben Jahren^{36,37,18}. Im Gegensatz dazu zeigen im präfibrotischen Stadium der PMF diagnostizierte Patienten eine deutlich längere Überlebenszeit von 10 bis 15 Jahren^{31,38,32,39,40}.

Aktuell stehen verschiedene Prognose-Scores für die PMF zur Verfügung (IPSS-Score, DIPPS-Score und der DIPPS-plus Score), wobei der DIPPS-plus Score eine Weiterentwicklung der vorherigen Scores darstellt.

Als neuester Score steht der MIPSS-70- bzw. MIPSS-70plus-Score zur Verfügung. Hier werden sowohl die klinischen als auch die molekulargenetischen bzw. zytogenetischen Parameter berücksichtigt.

Auch für die ET gibt es einen eigens erstellten Risiko-Score, den IPSET-Score.

Der weit verbreitete und häufig benutzte „Dynamic International Prognostic Scoring System-plus“ (DIPSS-plus) ordnet die Patienten anhand von acht Faktoren in vier Risikokategorien ein (Niedrigrisiko, Intermediärrisiko 1, Intermediärrisiko 2, Hochrisiko). Die acht Faktoren umfassen: Alter > 65 Jahren, Hämoglobin < 10 g/dL, Leukozyten $> 25 \times 10^9$ /L, Blasten im peripheren Blut ≥ 1 %, B-Symptomatik, Thrombozyten $< 100 \times 10^9$ /L, Transfusionsbedürftigkeit und ungünstiger Karyotyp.

Ebenfalls der Hochrisiko-Gruppe zugeordnet wird ein CALR-/ASXL+ Mutationsstatus⁴¹⁻⁴⁴.

Eine bestmögliche prognostische Beurteilung lässt sich jedoch nur in Kombination von Scoring-System (DIPSS-plus) und morphologischer Knochenmarkbeurteilung (präfibrotisches oder fibrotisches Stadium) treffen⁴⁵.

Der MIPSS70 und der MIPSS70-plus stellen ein neues Risikostratifizierungssystem dar⁴⁶. MIPSS70 steht für „mutation-enhanced international prognostic scoring system“ und wurde für Patienten entwickelt, welche unter 70 Jahren alt sind und somit für eine Transplantation in Frage kämen. Aufgrund der prognostischen Bedeutung hinsichtlich des Gesamtüberlebens sowie des Leukämie-freien Überlebens haben die molekulargenetischen Befunde in dieses Scoring-System Einzug erhalten.

Im MIPSS70 werden sechs klinische Parameter (Hämoglobin < 10 g/dL, Leukozyten $> 25 \times 10^9$ /L, Thrombozyten $< 100 \times 10^9$ /L, peripher zirkulierende Blasten ≥ 2 % und unspezifische Symptome), fünf Hochrisikomutationen (ASXL1, SRSF2, EZH2, IDH1 und IDH2) sowie eine günstige Mutation (CALR Typ 1) berücksichtigt. Im MIPSS70plus werden ebenfalls die Mutationen aufgeführt, jedoch werden nur drei klinische Parameter erhoben (Hämoglobin < 10 g/dL, peripher zirkulierende Blasten ≥ 2 % und unspezifische Symptome). Im MIPSS70-plus sind zusätzlich zytogenetische Informationen inbegriffen.

Für den MIPSS70 wurden drei Risikogruppen festgelegt (Niedrig-, Intermediär- und Hochrisikogruppe) und für den MIPSS70-plus vier (Niedrig-, Intermediär-, Hochrisiko- und eine sehr Hochrisikogruppe).

Auch für die ET wird ein prognostisches Scoring-System genutzt. Der sogenannte IPSET-Score (International Prognostic Score of thrombosis in WHO-essential thrombocythemia) wurde 2012 von Barbui *et al.*⁴⁷ entwickelt und zur Prognose von Thromboseereignissen eingesetzt. Als Risikofaktoren für ein Auftreten von hämorrhagischen oder thromboembolischen Ereignissen zählen folgende vier Faktoren, welche jeweils mit einem Punkt gewertet werden:

- Anamnestisch stattgehabte thromboembolische Komplikationen oder schwere Blutungen
- Alter des Patienten über 60 Jahre
- Kardiovaskuläre Risikofaktoren
- JAK2-V617F-Mutation positiv

Demnach erfolgt die Einteilung in eine Niedrigrisiko- (0-1 Punkt), Intermediärisiko- (2 Punkte) und Hochrisiko-Gruppe (≥ 3 Punkte).

1.1.5 Knochenmarkmorphologie der PMF im Vergleich zur ET

Da weder die klinischen noch die molekulargenetischen Befunde eine krankheitsspezifische Diagnostik der MPNs möglich machen, ist insbesondere der Knochenmarkbefund von großer diagnostischer Bedeutung³⁶. Daher ist die histologische Begutachtung des Knochenmarks seit 2008 bereits in den Hauptkriterien der WHO-Klassifikation zu finden.

Die Knochenmarkmorphologie der PMF ist stadienabhängig sehr unterschiedlich.

Trotz des sehr variablen klinischen Erscheinungsbildes zeigt sich im Knochenmark eine mit dem initialen präfibrotischen Stadium einhergehende charakteristische Hyperzellularität ohne oder lediglich mit minimaler Retikulinfaservermehrung ($\leq$ Grad 1)^{31,48,49}. Die Hyperzellularität kommt vor allem durch eine Proliferation der Neutrophilen und atypischen Megakaryozyten zustande. Hierbei bilden die Megakaryozyten vorwiegend dichte Haufen (Cluster), welche regelmäßig an Marksinus anliegend sind^{31,50,26,51}. Häufig sind die Megakaryozyten bereits im präfibrotischen Stadium deutlich volumenvergrößert und dysplastisch verändert. Ist dies nicht der Fall, können auch kleinere Megakaryozyten durch den Einsatz von immunhistochemischen

Methoden dargestellt werden¹³. Eine erhöhte Kern-Zytoplasma-Relation, wolken- oder ballonartige große Kerne und eine lockere Chromatinstruktur unterstreichen die Atypie der Megakaryozyten. Diese Merkmale der abnormen Megakaryopoese stehen am Beginn der Entwicklungsstörung des Knochenmarks und treten unabhängig von einer Faservermehrung im Knochenmark auf⁵².

Die Granulopoese ist im initialen präfibrotischen Stadium ebenfalls bereits gesteigert, dysplastisch verändert und linksverschoben. Die Erythropoese hingegen ist meist ohne wesentliche Dysplasien reduziert^{53,31}.

Die deutliche Mehrheit der Patienten im initialen Stadium transformieren im Verlauf in das fibrotische Stadium mit EMH^{54,26}. Bei Patienten mit der fibrotischen Form der PMF liegt bereits bei Diagnosestellung eine deutliche Retikulinfaservermehrung ($\geq$ Grad 2) vor.

Die namensgebende Fibrose des Knochenmarks lässt sich am ehesten auf eine abnorme Produktion und Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zurückführen. Neben anderen Knochenmarkzellen produzieren insbesondere die Megakaryozyten PDGF (platelet derived growth factor) und TGF- β (transforming growth factor- β). Beide stimulieren die Proliferation von Fibroblasten und die Synthese von Fibronectin und Kollagen⁵⁵.

Eine Fibrose und/oder Osteosklerose wird erst im späteren Stadium der PMF sichtbar^{56,50,57}. Vermehrte retikuläre Fibrose und dicke Bündel kollagener Fasern führen meist zur Gradeinteilung MF-2 oder MF-3^{58,59} (siehe Tabelle 4).

Das Knochenmark kann teilweise noch immer hyperzelluläre Areale aufweisen, häufiger ist es jedoch normo- oder hypozellular. Große atypische Megakaryozyten dominieren das zelluläre Bild der fibrotischen PMF. Sie befinden sich in Clustern angeordnet nahe dilatierter vaskulärer Sinus^{54,31}. In den signifikant proliferierten, geschlängelten und luminal dilatierten Knochenmarksinussen findet sich charakteristischerweise eine intrasinusoidale Hämatopoese⁶⁰⁻⁶³. Nur im Spätstadium kommt es zu einer Vermehrung des Osteoids und zur appositionellen neuen Knochenformation³¹. Diese Osteosklerosierung kann bis zu 50 % des Knochenmarkraums einnehmen.

Die atypische Hämatopoese wird zunehmend durch die Proliferation der groben kollagenen Faserbündel verdrängt. In der Terminalphase liegt ein fast zellfreies Knochenmark mit stark osteosklerotischen Knochenbälkchen vor⁶⁴.

Einen ähnlichen fibrotischen Umbau des Knochenmarks lässt sich auch in Spätstadien anderer chronischer myeloproliferativer Erkrankungen sehen^{65,66}. Bei der Polycythemia vera haben beispielsweise nach 10 Jahren etwa 16 % der Patienten einen fibrotischen Umbau, der PMF ähnlich, im Knochenmark⁶⁷. Diese sekundäre Myelofibrose (post-PV-MF oder post-ET-MF) gilt es von der primären Myelofibrose abzugrenzen, da sowohl therapeutische als auch prognostische Konsequenzen entstehen. Auch bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises kann es zu einer reaktiven Knochenmarkfibrose kommen⁶⁸.

Die neuste WHO-Klassifikation der myeloproliferativen Neoplasien überarbeitete ebenfalls geringfügig die semiquantitative Graduierung der Knochenmarkfibrose¹. Die Bewertung des Fibrosegrades sollte nur in Knochenmarkbereichen mit vorliegender Hämatopoese erfolgen.

Die Einteilung der Knochenmarkfibrose ist nicht nur wichtig für die Diagnosestellung der MPN, sondern hat auch Auswirkungen auf therapeutische Entscheidungen und die Einteilung in klinische Studien.

Tabelle 4: Graduierung der Knochenmarkfibrose gemäß den WHO-Richtlinien¹

MF-0	Einzelne retikuläre Fasern ohne Überkreuzungen, Erscheinungsbild eines normalen Knochenmarks
MF-1	Lockeres Netzwerk aus Retikulinfasern mit vielen Überkreuzungen, insbesondere im perivaskulären Bereich
MF-2	Diffuse und dichte Vermehrung der Retikulinfasern mit ausgedehnter Vernetzung, teilweise mit fokalen Kollagenbündeln und/oder fokaler Osteosklerose
MF-3	Diffuse und dichte Vermehrung der Retikulinfasern mit ausgedehnter Vernetzung und grobfaserigen Kollagenbündeln, oft assoziiert mit einer Osteosklerose

Vergleicht man die Knochenmarkmorphologie der präPMF mit der der ET, lassen sich morphologische Unterschiede feststellen, welche von diagnostischer Wichtigkeit sind⁶⁹. Folgende histologische Merkmale können zur Unterscheidung zwischen der präPMF und der ET dienen: Altersentsprechende Knochenmarkzellularität, Megakaryozytenmorphologie (Cluster-Bildung, Größe und lobulierte Kerne), Myeloid-Erythroid-Verhältnis, sowie der Fibrosegrad⁷⁰. Während sowohl die Zellzahl als auch das ME-Verhältnis im Knochenmark von ET-Patienten dem eines gesunden Menschen entsprechen, findet sich bei der präPMF eine Hyperzellularität und ein erhöhtes Myeloid-Erythroid-Verhältnis⁷¹. Die Megakaryozyten zeigen sich bei der ET meist als große prominente Zellen, welche hyperlobulierte/hirschgeweihartige Zellkerne aufweisen, stark vermehrt sind und nur selten in engen Clustern angeordnet sind. Bei der präPMF findet man hingegen häufig in der Größe variable Megakaryozyten, welche in Clustern formiert sind und einen eher hypolobulierten Zellkern präsentieren^{70,69,71}. Eine retikuläre Fibrose Grad 1 ist bei der ET selten zu finden, bei der präPMF ist sie ebenfalls nicht obligat, findet sich jedoch häufiger²⁶.

Tabelle 5: Morphologische Unterschiede der präPMF und der ET gemäß den WHO-Richtlinien¹

Morphologische Kriterien	präPMF	ET
Zellularität (altersentsprechend)	Erhöht	Normal
Myeloid-Erythroid-Verhältnis	Erhöht	Normal
Größe der Megakaryozyten	Variabel	Groß
Dichte megakaryozytäre Cluster	Häufig	Selten
Megakaryozytenkerne	Hypolobuliert	Hyperlobuliert
Knochenmarkfibrose	Häufig	Sehr selten

1.2 Diagnostik der myeloproliferativen Neoplasien anhand von molekularpathologischen Befunden

Es gibt keinen spezifischen Gendefekt, welcher für die Entwicklung einer PMF oder einer anderen MPN bestimmend ist. Es haben sich jedoch drei sogenannte Treiber- oder Drivermutationen herauskristallisiert, welche in der Pathogenese der MPNs bevorzugt mitwirken: JAK2, CALR und MPL.

Diese Mutationen sind sehr unspezifisch und finden häufig erst spät in der Pathogenese der MPN statt. Vermutlich gibt es bereits früher stattfindende Mutationen, welche jedoch noch Bestandteil aktueller Forschungen sind.

Tabelle 6: Treibermutationen der MPN

	ET	PMF
JAK2	60 %	60 %
CALR	20-25 %	20-30 %
MPL	3-6 %	5-8 %
Triple negativ	5-15 %	5-10 %

Wie in der obenstehenden Tabelle 6 dargestellt, sind nach WHO-Kriterien diagnostizierte PMF-Patienten in bis zu 60 % JAK2-V617F-Mutation-positiv^{72,73}. Hierbei befindet sich die Mutation V617F (Austausch der Aminosäure 617 Valin durch Phenylalanin) in der JH2-Domäne der Janus Kinase. Diese Mutation findet sich zu einem hohen Prozentsatz auch bei weiteren Formen der MPNs (bei > 95 % der PV-Patienten und bei ebenfalls 60 % der ET-Patienten). Im Gegensatz zur ET ist jedoch die Allel-Belastung bei der präPMF für die JAK2-Mutation deutlich höher und die Mutationsbelastung zeigt sich somit bei der präPMF deutlich variabler als bei der ET⁷⁴. Bei der ET findet man hingegen nur eine geringe Variantenfrequenz der JAK-2-Mutation.

Damit nimmt die JAK-V617F-Mutation in der Pathogenese hämatopoetischer Erkrankungen eine wichtige Stellung ein. Laut einer Studie⁷⁵ ist die JAK2-Mutation bei PMF-Patienten mit einer höheren Anzahl von thromboembolischen Ereignissen, höheren Leukozytenwerten sowie mit einem geringeren Überleben verbunden.

Weitere häufige Mutationen sind die Calreticulin-Mutation (CALR), welche ca. 20-30 % der Patienten mit präPMF präsentieren, sowie die Thrombopoetin-Rezeptor-Mutation (MPL), welche mit 5-8 % der Patienten einen geringeren Anteil einnimmt. Die Allel-Belastung der MPL-Mutation ist ebenfalls bei der präPMF höher als bei der ET. Im Gegensatz zur JAK2- und MPL-Mutation, ist die Allel-Belastung der CALR-Mutation bei der ET und bei der präPMF annähernd gleich⁷⁴.

Mit 5-10 % ist auch der Anteil an triple-negativen (JAK2-V617F-, CALR- und MPL-Wildtyp) Patienten bei der präPMF nicht vernachlässigbar^{76,77,44}. Im Falle eines triple-negativen Patienten, welcher prominente myelodysplastische Eigenschaften aufweist, wäre auch die Diagnose eines myelodysplastischen Syndroms (MDS) oder einer unklassifizierbaren myeloproliferativen Neoplasie (MPN-U) angemessen.

Da alle drei benannten genetischen Mutationen auch bei der ET und bei der PV zu unterschiedlichen Anteilen zu finden sind, können sie nicht alleinig der Unterscheidung zwischen den MPN dienen^{77,44}. Die Häufigkeit der CALR- und der MPL-Mutation bei der ET entspricht ebenso wie die JAK2-Mutation ungefähr der der präPMF. Lediglich das genetische Profil der PV lässt sich durch die deutlich favorisierte JAK2-Mutation von den anderen MPN abgrenzen. Die ET und die präPMF zeigen im Gegenteil eine sehr ähnliche genetische Prädisposition⁷⁸. Bei beiden Entitäten lassen sich bei ca. 5-10 % der Patienten keine der drei genannten Mutationen finden („wild-typ“ bei der ET bzw. „triple-negativ“ bei der PMF), welche eine wichtige diagnostische und therapeutische Lücke entstehen lässt⁷⁸. Diese zu schließen versucht die neue WHO-Klassifikation von 2016 anhand der Bestimmung weiterer klonaler Marker (hochmolekulare Risikomutationen), welche bei der präPMF häufiger zu finden sind.

Alle MPN-assoziierten Mutationen resultieren entweder direkt (JAK2), indirekt (MPL) oder via komplexer Mechanismen (CALR) zu einer abnormalen Aktivitätssteigerung des JAK/STAT- und weiteren Signalwegen^{79,80}. Diese Aktivierung der Signaltransduktionswege resultiert in einer gesteigerten und von äußeren Faktoren unabhängigen Zellproliferation der hämatopoetischen Stammzellen.

Die CALR-Mutation scheint sich protektiv auf das Überleben von PMF- und ET-Patienten auszuwirken^{42,81,44}. Mehr als 80 % der CALR-Mutationen sind entweder eine CALR-Mutation vom Typ 1 (52-bp Deletion) oder vom Typ 2 (5-bp Insertion)⁸². Obwohl die gleiche Aktivierung von Signalwegen bei beiden Mutationen stattfindet, zeigt sich ein Unterschied in der Prognose von PMF-Patienten. Unbeeinflusst, ob es sich um eine fibrotische oder präfibrotische PMF handelt, haben Patienten mit der Typ 1 CALR-Mutation eine bessere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit der Typ 2 Mutation^{83,84}. Dieser positive Mutationseffekt der Typ 1 CALR-Mutation zeigt sich auch bei der ET. Weiterhin ist die Typ 2 CALR-Mutation mit einer ausgeprägteren Thrombozytose bei ET-Patienten assoziiert⁸¹.

Anders verhält es sich bei den triple-negativen Patienten und Patienten mit deutlich selteneren Mutationen, welche allesamt keinen Überlebensvorteil zeigen und sogar ein erhöhtes Risiko der leukämischen Transformation aufweisen (siehe unten)^{85,43,41,10}.

Die drei Treibermutationen finden sich in einer annähernd gleichen Verteilung bei der präfibrotischen und bei der fibrotischen Form der PMF.

Ähnliche Mutationen wie sie die MPNs präsentieren⁷⁶, kommen jedoch auch in einem sehr geringen Prozentsatz bei älteren Patienten ohne jegliche hämatologische Erkrankungen vor⁸⁶⁻⁸⁸.

Weiterhin scheint der Mutationsstatus der MPN Einfluss auf die klinische Präsentation zu haben. Bei der ET führt eine CALR-Mutation zu einer deutlicheren Thrombozytose als bei ET-Patienten mit einer JAK-2- oder MPL-Mutation⁸⁹.

1.2.1 Weitere somatische Mutationen bei MPN

Neben den drei oben aufgeführten Treibermutationen der PMF, gibt es noch weitere sogenannte Nicht-Treibermutationen. Hierbei handelt es sich nicht um MPN-spezifische Mutationen. Hochrisikomutationen können sowohl bei der präfibrotischen als auch bei der fibrotischen Form der PMF gefunden werden. Diese somatischen Mutationen können den Effekt der Treibermutationen modifizieren und gegebenenfalls verstärken. Für die PMF haben sich fünf somatische Mutationen als prognosemodifizierend herauskristallisiert und werden als Hochrisikomutationen (HMR) bezeichnet: ASXL1, EZH2, SRSF2, IDH1 und IDH2⁸⁵.

Insgesamt findet sich mindestens eine dieser Mutationen bei ca. 70 % aller PMF-Patienten, und sogar zwei oder mehr Mutationen bei ca. 20 %¹⁰. Insgesamt ist die Mutationsrate der präfibrotischen Form etwas niedriger als bei der fibrotischen Form. Vor allem trifft dies jedoch auf die Mutationen ASXL1 und EZH2 zu, welche sich signifikant seltener bei der präfibrotischen Form finden lassen¹⁰.

Die Mutationen ermöglichen die Erkennung von Hoch-Risiko-Patienten. Sobald sich eine der fünf Mutationen finden lässt, werden die Patienten im DIPSS-plus als Hoch-Risiko-Patienten eingestuft. Das Auftreten dieser Mutationen ist mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert. Sowohl das Leukämie-freie Überleben als auch das Gesamtüberleben wird deutlich verschlechtert⁹⁰. Auch die Anzahl der Mutationen spielt eine Rolle für die Prognose. So resultiert aus zwei oder mehr Mutationen eine schlechtere Prognose als das beim Auftreten von nur einer Mutation der Fall wäre⁴¹.

Während die drei Treibermutationen JAK-2, CALR und MPL keine Korrelation mit dem Fibroseggrad des Knochenmarks zeigen, konnte dies mit dem Auftreten der somatischen Mutationen gezeigt werden. Die Frequenz der Hochrisikomutationen steigt mit zunehmendem Fibroseggrad an. So sind bei 25,6 % der Patienten mit Fibroseggrad-1 Hochrisikomutationen zu finden, während es bei Patienten mit einem Fibroseggrad-3 bereits 44,7 % sind⁹¹. Hier stechen erneut die beiden Mutationen ASXL1 und EZH2 hervor. Bei Patienten mit einer höhergradigen Knochenmarkfibrose konnten beide Mutationen häufiger gefunden werden und verschlechterten weitergehend die Prognose⁹¹.

Durch die Bestimmung der hochmolekularen Risikomutationen können therapeutische Entscheidungen weitreichend beeinflusst werden, beispielsweise die Durchführung einer allogenen peripheren Stammzelltransplantation. Auch in dem 2018 veröffentlichten molekularen Risikostatifikationssystem MIPSS-70 haben die Hochrisikomutationen bereits Einzug gefunden^{46,92}.

Erstmalig konnte 2016 ein Genexpressionsprofil der präPMF veröffentlicht werden. Skov *et al.*⁹³ benutzen als Kriterium zur genetischen Untersuchung die häufig erhöhten LDH-Werte bei erstdiagnostizierten präPMF-Patienten. Hierdurch konnten sieben Gene identifiziert werden, welche das genetische Profil der präPMF darstellen, und mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 89 % die präPMF korrekt diagnostizierten. Diese sieben Gene (MPO, CEACAM8, CRISP3, MS4A3, CEACAM6, HEMGN und MMP8) haben alle in unterschiedlicher Ausprägung einen Effekt unter anderem auf die Entzündungsreaktion, die Zelladhäsion, die Proliferation und die Zelldifferenzierung. Zukünftig könnte möglicherweise die Untersuchung des genetischen Profils Einzug in die diagnostischen Kriterien der präPMF erlangen.

1.3 Differentialdiagnostik der präPMF zur ET

Die richtige Diagnosestellung und Differenzierung der präPMF von der ET erfordert eine klinische Begutachtung sowie molekulardiagnostische und histologische Maßnahmen. Nicht nur die klinischen und prognostischen Unterschiede machen die Unterscheidung der beiden Krankheitsbilder relevant, auch therapeutische Konsequenzen lassen sich aus einer richtigen Diagnosestellung ziehen. Hier spielen vor allem die neuen gezielten molekularen Therapiemöglichkeiten der präPMF eine wichtige Rolle⁹⁴.

Verglichen mit der ET, zeigt die präPMF im klinischen Verlauf eine signifikant höhere Komplikationsrate. Sowohl die Komplikation der Blutung als auch der atypischen venösen Thrombose (hauptsächlich im Splanchnikus- und Mesenterialgebiet) finden häufiger bei der präPMF als bei der ET statt⁹⁵. Auch

bei der fibrotischen Form der PMF liegt das Thromboserisiko deutlich niedriger als bei der präPMF und nähert sich eher dem Risiko der ET an⁹⁵. Weiterhin werden diese hämorrhagischen Ereignisse bei der präPMF von einer niedrigdosierten ASS-Therapie noch provoziert⁹⁶. Hier konnte gezeigt werden, dass eine isolierte Thrombozytose per se kein Risikofaktor für eine Blutung darstellen muss, in Kombination mit einer ASS-Einnahme das Risiko jedoch deutlich ansteigt⁹⁶. Eine Leukozytose in der präPMF korreliert mit einem erhöhten Risiko für arterielle Thrombosen⁹⁷. Weitere bedeutsame Faktoren in Bezug auf das Thromboserisiko bei der präPMF sind eine Thrombozytenzahl $> 450 \times 10^9/L$, mindestens ein kardiovaskulärer Risikofaktor, ein Alter über 60 Jahre, die JAK2-Mutation und bereits vorherige Thromboseereignisse^{98,99}.

Mögen die Krankheitsbilder der präPMF und der ET anfangs zwar noch ein ähnliches klinisches Bild zeigen (isolierte Thrombozytose), so ändert sich dies im Verlauf des Krankheitsprogresses. Die Transformationsrate zur manifesten Myelofibrose ist in der präPMF mit 12,3 % 10 Jahre nach Erstdiagnose deutlich höher als bei der ET (0,8 %) ⁴⁰. Ähnlich verhält es sich mit dem Risiko einer leukämischen Transformation (5,8 % bei der präPMF vs. 0,7 % bei der ET). Insgesamt schlägt sich dies auf die Überlebensprognose der Patienten nieder. Bei der präPMF leben 15 Jahre nach Erstdiagnose noch 59 % der Patienten, wohingegen bei der ET noch 80 % am Leben sind. Hier zeigt sich die deutlich schlechtere Prognose der präPMF im Gegensatz zur ET^{40,10}.

Auch der Fibrosegrad ist prognosebestimmend für die Krankheitsbilder. Eine manifeste Myelofibrose hat ein höheres Risiko der Anämie, der Thrombozytopenie, der Blastentransformation und der klinischen Symptome als die präPMF¹⁰.

Letztendlich ist die WHO-Klassifikation von 2016 entscheidend für die Diagnostik der präPMF. Wie bereits oben aufgeführt, enthalten die Hauptkriterien insbesondere histopathologische und molekulargenetische Diagnosekriterien. Das klinische Erscheinungsbild wird durch die Nebenkriterien beurteilt. Hier werden das Auftreten einer Anämie, einer Leukozytose, ein LDH-Anstieg und eine Splenomegalie aufgeführt. Alle diese Nebenkriterien finden sich signifikant häufiger bei der präPMF als bei der ET. In einer ausführlichen Studie von Jeryczynski *et al.*¹⁰⁰ wurden folgende Ergebnisse bezüglich der

Quantität der Nebenkriterien gezeigt: 74,1 % der präPMF-Patienten präsentieren eine Erhöhung der LDH, während diese Erhöhung nur bei 22,7 % der ET-Patienten gefunden werden kann¹⁰⁰. Simultan verhält es sich mit der Häufigkeit des Auftretens einer Anämie, einer Leukozytose oder einer Splenomegalie, welche alle bei der präPMF häufiger auftreten als bei der ET. Insgesamt lassen sich alle vier Nebenkriterien gleichzeitig lediglich bei 6,5 % der präPMF-Patienten finden. Kumulativ zeigen 84,7 % der Patienten einen bis drei der klinischen Befunde und können somit laut WHO-Klassifikation der präPMF diagnostiziert werden. Alleine anhand der Klinik lassen sich jedoch 8,8 % der präPMF-Patienten nicht korrekt klassifizieren, da diese keine der vorgegebenen Nebenkriterien erfüllen. Diese Patienten haben somit ein erhöhtes Risiko fälschlicherweise der ET diagnostiziert zu werden, da hier bis zu 52 % keine klinische Präsentation der Nebenkriterien zeigen. Im klinischen Alltag ist es somit nicht selten, einen Patienten mit einer Thrombozytose zu sehen, welcher den typischen Knochenmarkbefund der präPMF zeigt, jedoch keine klinischen Symptome, wie sie in den Nebenkriterien aufgeführt sind. Die klinische Bewertung der Patienten reicht somit nicht aus, um die präPMF von der ET zu unterscheiden. Es gilt sowohl die histopathologische Begutachtung, die molekulargenetische Untersuchung und das klinische Bild für eine korrekte Diagnosestellung zusammen zu führen.

1.4 Therapie der präPMF und der ET

Die Therapie der PMF wird risiko-, symptom- und altersadaptiert durchgeführt. Nach WHO-Kriterien diagnostizierte, aber symptomlose Patienten müssen nicht zwingend behandelt werden¹⁰¹, hier reicht eine Kontrolle der hämatologischen Parameter in regelmäßigen Abständen aus.

Das Hauptziel in der Therapie der PMF stellt die Reduktion von thromboembolischen und hämorrhagischen Ereignissen dar. Bei den gängigen therapeutisch eingesetzten Präparaten wirkt die thrombozytenreduzierende Eigenschaft komplikationssenkend. Hierunter zählen Hydroxyurea (HU), Interferon-alpha (IFN- α) und Anagrelide. Eine Verbesserung des (prä-) fibrotischen Stadiums des Knochenmarks und somit eine

Progressionsverzögerung lässt sich jedoch durch die zytostatische Therapie alleine nicht erreichen^{54,102,103}.

Dahingegen konnten Studien zeigen, dass eine Therapie mit Interferon-alpha (IFN- α)^{104,105} und/oder mit einem JAK2-Inhibitor¹⁰⁶⁻¹⁰⁹ (Ruxolitinib) eine Verzögerung der Progression oder sogar eine Reduktion der Fibrose bewirken können. Die JAK2-Inhibition hat sich in den letzten Jahren als eine effektive Therapiemöglichkeit erwiesen und sich somit als geeignete orale Therapie etabliert.

Bei massiver Splenomegalie mit schwerer Thrombozytopenie oder bei symptomatischen Patienten kann auch eine Splenektomie erwogen werden¹¹⁰.

Als einzige kausale und kurative Maßnahme steht die allogene Stammzelltransplantation zur Verfügung¹¹¹⁻¹¹³. Dies gilt nicht nur für die PMF-Patienten, sondern auch für Patienten mit einer sekundären Myelofibrose bei ET oder PV¹¹⁴. Indiziert ist die allogene Stammzelltransplantation bei geeigneten Patienten mit insgesamt ungünstiger Prognose.

Bevor die eigentliche Transplantation durchgeführt wird, werden die PMF-Patienten mit einer Hochdosis-Chemotherapie zum Zwecke der Ablation des malignen Zellklons im Knochenmark behandelt¹¹⁵⁻¹¹⁷.

1.4.1 Hydroxyurea

Das als Litalir® oder Syrea® vermarktete Hydroxyurea hat noch immer einen großen Stellenwert in der Therapie der PMF. Es ist ein sehr effektives, thrombozytenreduzierendes, oral applizierbares Zytostatikum. Der Wirkmechanismus beruht auf einer Hemmung der Ribonukleotidreduktase der DNS-Synthese. Da es somit in der Zellteilungsphase angreift, wirkt es besonders effektiv auf sich schnell teilende Zellen, wie dies bei Tumorzellen der Fall ist¹¹⁸. Insbesondere im frühen präfibrotischen Stadium der Erkrankung lassen sich die Thrombozyten- und Leukozytenwerte positiv beeinflussen.

Mit einer zwei- bis dreimal täglichen Dosis von gewöhnlich 500 mg (insgesamt 1000 mg – 1500 mg/Tag), wird eine Thrombozytenzahl von < 400.000/ μ l und > 3.000 Leukozyten/ μ l angestrebt.

Bevorzugt im fibrotischen Stadium der PMF wird Hydroxyurea nicht nur wegen der zytoreduktiven Wirkung benutzt, sondern auch wegen der deutlichen reduzierenden Wirkung auf eine symptomatische Splenomegalie (Reduktion der Milzgröße um 40 %).

Während bei anderen Zytostatika (beispielsweise Thioguanin oder Busulfan) ein leukämisches Potential als bewiesen gilt, wird die langfristig leukämieinduzierende Nebenwirkung von Hydroxyurea in der Monotherapie noch immer kritisch diskutiert¹¹⁹. Zum Nebenwirkungsspektrum von Hydroxyurea gehören u. a. Haut- und Schleimhautveränderungen (Überpigmentierung, Haut- und Nagelatrophie, papulöse Veränderungen), leichte gastrointestinale Beschwerden (Magenschmerzen, Diarrhoe) und Cystitiden.

Hydroxyurea stellt keine kausale Therapie der Myelofibrose dar. Es konnte dahingehend kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit einer Hydroxyurea-Therapie und Patienten ohne selbige gezeigt werden. Die Knochenmarkfibrose ist von der symptomatischen Therapieform unabhängig und schreitet weiterhin stetig und unbeeinflusst voran¹⁰².

1.4.2 Interferon-alpha

Eine Therapie mit Interferon-alpha (IFN- α) ist eine weitere Möglichkeit die Poliferationsneigung der malignen Zellen zu reduzieren. Durch die immunmodulierende Aktivität des IFN- α werden die Zellen in ihrer Differenzierung gehemmt. Dies wird über Eingriffe in die Expression von hämatopoetischen Wachsfumsfaktoren¹²⁰⁻¹²² und in die zytokinvermittelten Signalwege der Zellen erreicht¹²³⁻¹²⁵. Durch den Wachstumsstop der malignen Zellen wird dem normalen hämatopoetischen Zellsystem im Knochenmark wieder Raum zur Proliferation gegeben.

Im Gegensatz zu Hydroxyurea konnte beim Einsatz von Interferon-alpha bisher kein leukämogenes Potential nachgewiesen werden¹²⁶.

Der Einsatz von IFN- α bei jungen Frauen im gebärfähigen Alter sollte kritisch hinterfragt werden und ggf. bei IFN- α -Einnahme eine Kontrazeption empfohlen

werden. Da ein mögliches teratogenes Potential prinzipiell nicht auszuschließen ist, wird es in der Schwangerschaft generell nicht empfohlen¹²⁷.

Anders als bei einer Hydroxyurea- oder Anagrelide-Therapie, bleibt die Knochenmarkfibrose unter IFN- α -Therapie stabil oder zeigt sich sogar rückläufig^{104,105}.

2018 veröffentlichte Lanotto *et al.* Daten zur Behandlung der Myelofibrose mit pegyliertem Interferon- α ¹²⁸. Hier zeigte sich, dass der Einsatz von IFN- α Einfluss auf die molekulopathologischen Befunde hat: Die JAK2-Allelbelastung konnte um bis zu 50 % reduziert werden. Selbst komplette molekulare Remissionen konnten unter Therapie nachgewiesen werden.

1.4.3 Anagrelide

Anagrelide (Agrelin®, Agrylin®) zeigen im Gegensatz zu Hydroxyurea und IFN- α ausschließlich einen Effekt auf die Megakaryozyten¹²⁹. Das oral applizierbare Imidazoquinazolin-Derivat führt somit über einen noch nicht hinreichend bekannten Mechanismus sehr effektiv zu einer Senkung der Thrombozytenzahl im Blut^{130,131}.

Zunächst wird mit einer initialen Dosis von 4 x 0,5 mg/Tag begonnen, welche bei unzureichendem Absinken der Thrombozytenzahl um 0,5 mg/Tag gesteigert wird¹³¹.

Einen leukämischen Effekt der Anagrelide-Therapie ließ sich bisher nicht nachweisen^{131,132}. Typische Nebenwirkungen wie Palpitationen, Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe und Herzversagen lassen sich durch die vasodilatatorische und positiv inotrope Wirkung der Anagrelide erklären^{132,133}. Aufgrund dieses Nebenwirkungsprofils sollte vor allem bei kardiovaskulären Risikopatienten von dem Einsatz von Anagreliden abgeraten werden^{133,132}. Da eine Plazentagängigkeit durch die geringe Molekülgröße der Anagrelide nicht ausgeschlossen werden kann, ist der Einsatz während der Schwangerschaft nicht möglich¹³⁴.

Ebenso wie bei der Hydroxyurea-Therapie, zeigt sich die Knochenmarkfibrose jedoch weitgehend unbeeinflusst von einer Anagrelide-Therapie.

1.4.4 Ruxolitinib

Der JAK2-Inhibitor Ruxolitinib hat das Therapieschema der PMF seit seiner Zulassung im Jahr 2012 deutlich geprägt. Der oral gut verträgliche und effektive Tyrosinkinaseinhibitor steht für die Behandlung der PMF sowie für die Therapie der Post-PV- und Post-ET-Myelofibrose zur Verfügung.

Im Vergleich zu den herkömmlichen oralen Therapiemöglichkeiten, konnte durch den Einsatz von Ruxolitinib die Splenomegalie, die krankheitsassoziierten Symptome und die Lebensqualität der Patienten positiv beeinflusst werden¹³⁵. Nicht zuletzt konnte ein signifikant lebensverlängernder Effekt für Ruxolitinib bei Hochrisikopatienten gezeigt werden¹³⁶.

Weiterhin wird dem JAK2-Inhibitor eine krankheitsmodifizierende Eigenschaft zugesprochen, da in Knochenmarkuntersuchungen eine Verzögerung des Auftretens und sogar ein Rückgang der charakteristischen Fibrose festgestellt werden konnte¹³⁷.

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Trotz der neuen WHO-Diagnosekriterien von 2016 bleibt die Differenzierung der frühen Formen der MPN schwierig und teilweise kontrovers, da nicht ein einzelner Parameter entscheidend ist, sondern immer das Zusammenspiel mehrerer Faktoren beachtet werden muss.

In diesem Zusammenhang soll mit dieser Arbeit der Fragestellung nachgegangen werden, inwiefern einzelne morphologische Parameter die Diagnosefindung einer MPN beeinflussen und deren Wertigkeit spezifizieren. Weiterhin wird in dieser Arbeit diskutiert, inwiefern die Generierung eines Entscheidungsbaumes zur sicheren Diagnosestellung möglich und sinnvoll ist. Insbesondere widme ich mich der Differentialdiagnostik zwischen der präfibrotischen Form der PMF (präPMF) und der Essentiellen Thrombozythämie (ET). Hierbei stellt sich insbesondere die Frage, ob es möglich ist, bereits mit möglichst wenigen Merkmalen, eine gute Differentialdiagnostik zwischen der präPMF und der ET zu erreichen und einen praktikablen Bewertungsbogen zur Routinearbeit zu erstellen.

2 Material und Methoden

2.1 Übersicht über das Patientengut

Insgesamt konnten im Rahmen der Studie die Knochenmarkbiopsien von 348 Patienten untersucht werden. Das Patientenkollektiv setzte sich aus 193 Frauen und 155 Männern zusammen. Diese Patienten wurden im Zeitraum zwischen 2011 und 2016 entweder mit einer präPMF oder einer ET diagnostiziert. Das mittlere Alter bei mit präPMF diagnostizierten Patienten lag mit 66 Jahren leicht oberhalb des mittleren Alters der mit ET diagnostizierten Patienten (56 Jahre). Das Patientenkollektiv sowie das prozentuale Vorkommen der Treibermutationen ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Patientenkollektiv

	präPMF	ET
Anzahl	151	197
Alter (Mittel, Jahre)	66	56
Geschlecht (m/w)	72/79	83/114
JAK2 Mutation	64 %	57 %
CALR Mutation	31 %	40 %
MPL Mutation	5 %	3 %

2.2 Knochenmarkbiopsien

Die Gewinnung des Materials für die histologischen Untersuchungen erfolgte gemäß der Technik von Jamshidi und Swaim¹³⁸. Hierbei wird ein Stanzzyylinder aus der *Spina iliaca posterior* bzw. aus der *Crista iliaca posterior superior* mit einer Größe von 2 mm x 17 mm entnommen. Diese Maße sollten für eine aussagekräftige histologische Begutachtung mindestens erreicht werden. Um die für die weitere Aufarbeitung die nötige Fixation zu erreichen, wird der Knochenmarkzyylinder in einer gepufferten Formalinlösung für 12-48 Stunden aufbewahrt^{139,140}. Diese Fixation wirkt besonders gewebeschonend und ermöglicht somit den Erhalt der ursprünglichen Struktur. Um die Schneidbarkeit der Präparate zu erhalten, folgt eine Phase der Dekalzifizierung. Die Präparate werden für mindestens 3-4 Tage in einer speziellen Lösung (100 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 33 g Trishydroxymethylaminomethan (THAM) auf 1000 ml Aqua dest.) bei einem pH-Wert von 7,0 bis 7,2 gelagert. Zum Wasserentzug wird eine aufsteigende hydrophile Alkoholreihe (50-100 %) bei einer Temperatur von 39°C genutzt. Nach einem Bad in Xylol von 50 Minuten, werden abschließend die Paraffinierung und das Eingießen in die Einbettkassetten vorgenommen.

Von diesen Paraffinblöcken lassen sich nun mittels eines Grundschlittenmikrotoms 3–5 µm dicke Präparate gewinnen, welche nun auf einen Objektträger aus Glas aufgezogen werden. Anschließend erfolgt die Färbung der Präparate, je nach Bedarf, durch unterschiedliche Routinefärbungen oder Spezialfärbungen.

2.3 Anfärbungen der Biopsien

2.3.1 Routinefärbung

Für die histologische Aufarbeitung der Knochenmarkbiopsien wurden verschiedene Färbetechniken verwendet. Hierzu gehören unter anderem Hämatoxylin-Eosin (HE), May-Grünwald-Färbung, Periodic Acid Schiff Reagent (PAS) und die NASDCL-Esterase-Färbung (Naphtol-AS-D-Chloracetat-Esterase).

Durch die PAS-Färbung werden Glykogenablagerungen im Knochenmarkausstrich sowie in fixierten Schnittpräparaten nachgewiesen^{141,142}. Eine Rotfärbung zeigt eine positive PAS-Reaktion an, welche sich beispielsweise bei Megakaryozyten, Thrombozyten oder neutrophilen Granulozyten zeigt. Ein zunehmender Glykogengehalt in der reifenden Zelle geht mit einer Intensitätssteigerung der Rotfärbung einher.

Mit der NASDCL-Esterase-Färbung (Naphtol-AS-D-Chloracetat-Esterase) lässt sich vor allem ein guter Überblick über die neutrophile Granulopoese gewinnen¹³⁹. Das Zytoplasma der neutrophilen Granulozyten färbt sich rot, sodass bereits bei geringer Vergrößerung ein guter Überblick über die Granulopoese im Knochenmark gewonnen werden kann.

Die HE-Färbung ist eine der gebräuchlichsten Färbetechniken. Sie ermöglicht zunächst eine gute Übersicht über das Präparat, bevor man sich anhand von Spezialfärbungen weiterer Details widmet. Die Färbung erfolgt zunächst in saurem Hämatoxylin nach Ehrlich oder in saurem Hämalaun nach Mayer. Die Bläuung wird in fließendem Leitungswasser oder in 0,25 %iger Natriumhydrogencarbonatlösung erreicht. Nach Abspülen mit destilliertem Wasser werden die Objektträger für fünf bis 10 Minuten in verdünnter Eosinlösung gelagert. Durch die basische Eigenschaft des Hämalaun bindet dieses an saure Strukturen der Zellen. Umgekehrt verbindet sich das saure Eosin mit alkalischen Strukturen. Somit erhält man eine bläuliche Färbung der Zellkerne und eine rötliche Färbung des Zytoplasmas¹⁴³.

2.4 Morphologische Begutachtung

Um die Bewertung von Knochenmarkbiopsien zu vereinfachen und auf das Essentielle zu beschränken, wurde der von Thiele und Kvasnicka 2005 publizierte standardisierte Bogen zur Erfassung der Morphologie bei MPN¹⁴⁴ modifiziert.

In diesem ursprünglichen Bogen sind viele Parameter aufgeführt, um die konkrete MPN-Diagnose (PMF, ET, PV, CML, MPN-unklassifiziert, keine MPN, MDS) zu stellen. In Tabelle 8 sind diese einzelnen Merkmale in der rechten Spalte aufgeführt. In dem ursprünglichen Bogen werden sowohl die Zellularität, die Megakaryopoese, die Granulopoese, die Erythropoese, die Knochenmarkfibrose sowie die Makrophagen, das Stroma und die Sinusoide differenziert bewertet. Die Erythrozyten und die Granulozyten werden hinsichtlich ihrer Quantität, der Linksverschiebung und der Reifungsstörung betrachtet. Die Megakaryopoese wird sogar noch auf weitere Kriterien geprüft und nahm somit bereits in diesem Bewertungssystem eine Sonderstellung gegenüber der anderen bewerteten Zelllinien ein. Die Knochenmarkfibrose wurde wie in Tabelle 4 dargestellt nach WHO-Kriterien in 4 Grade unterteilt und somit standardisiert festgehalten.

Neben der großen Menge an aufgeführten Merkmalen erschwerte das Bewertungssystem eine einheitliche und einfach praktikable Bewertung. Dieses wurde im entsprechenden Erfassungsbogen von 2005 semiquantitativ mit einem Benotungssystem von „stark erniedrigt“ (-3) bis „stark erhöht“ (+3) durchgeführt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 8: Morphologische Parameter, welche im standardisierten Bogen zur Erfassung der Morphologie bei MPN^{145,144} bewertet werden

Knochenmarkzellularität	Altersentsprechend
Megakaryopoese	Quantität Histotopographie <ul style="list-style-type: none"> - Lockere Nesterbildung (Cluster) - Dichte Nesterbildung (Cluster) Zellgröße <ul style="list-style-type: none"> - Klein - Groß Zellkern <ul style="list-style-type: none"> - Reifungsstörung - Kernlobulierung - Hyperchromasie - Nackte Kerne
Granulopoese	Quantität Linksverschiebung Reifungsstörung Blasten Eosinophilie
Erythropoese	Quantität Linksverschiebung Reifungsstörung
Fibrose	Graduierung Osteosklerose
Makrophagen	Eisenspeicher
Stroma	Perivaskuläre Plasmazellen Lymphknötchen
Sinusoide	Proliferation Dilatation Intrasinusoidale Hämatopoese

Tabelle 9: Semiquantitatives Bewertungssystem des standardisierten Bogens zur Erfassung der Morphologie bei MPN

Reduktion	Normal	Erhöhung
-1	0	+1
-2		+2
-3		+3

Auch der bereits in vereinfachter Form genutzte Bewertungsbogen der dänischen Kollegen^{146,147} von 2013 wurde auf weniger (jedoch trotz allem voraussichtlich aussagekräftige) Merkmale heruntergebrochen, um für die Routine einen praktikableren Bewertungsbogen zu erstellen. Wie im ursprünglichen Bogen enthält auch der Bogen der dänischen Kollegen die altersentsprechende Knochenmarkzellularität, die Erythropoese, die Granulopoese, die Megakaryopoese, der Fibrosegrad, die Eisenspeicher und die Lymphknoten. Zusätzlich werden in dem modifizierten Bogen noch CD34+-Blasten, CD117+ und die Entzündungszeichen bewertet. Das Bewertungssystem wurde hier im Vergleich zum ursprünglichen Bewertungsbogen ebenfalls vereinfacht und mit einem meist dreistufigen (erhöht, normal, erniedrigt), teils auch nur zweistufigen System (vorhanden oder nicht vorhanden) modifiziert. Mit diesem bereits einfacheren Bewertungssystem konnten die dänischen Kollegen eine hohe Reproduzierbarkeit erreichen.

Die für diese Arbeit ausgewählten Merkmale basieren auf der WHO-Klassifikation von 2016. In dieser heißt es bereits in den Hauptkriterien:

1. Megakaryozytäre Proliferation und Atypie, ohne Fibrosegrad > 1 , begleitet von altersentsprechender erhöhter Knochenmarkzellularität, erhöhter Granulopoese und häufig verminderter Erythropoese

In diesem Hauptkriterium sind bereits die wesentlichen morphologischen Parameter vorgegeben. Die Aussage der megakaryozytären Proliferation und Atypie lässt jedoch zunächst einen weiten Spielraum der Begutachtung und der

Bewertung zu. Um diese Parameter zu konkretisieren und vor allem reproduzierbar zu machen, müssen genauere Definitionen betrachtet werden (s. u.).

Die in dieser Arbeit ausgewählten Merkmale werden zudem in der Bewertung nicht weiter unterteilt, sondern als positiv gewertet, sobald eine bestimmte Schwelle überschritten wurde (siehe Tabelle 11). Dies stellt eine drastische Vereinfachung im Gegensatz zu oben aufgeführter Liste der morphologischen Parameter zur standardisierten Auswertung dar. Folgende Parameter wurden in dieser Arbeit als maßgeblich relevant zur Diagnosefindung betrachtet und anhand der Knochenmarkbiopsien untersucht:

- Altersentsprechende Knochenmarkzellularität
- Megakaryozytenmorphologie
 - Nester-Bildung
 - Größe
 - Atypisch lobulierte Kerne

Um die Knochenmarkmerkmale standardisiert zu erfassen, galten als Richtlinie die von Thiele und Kvasnicka 2005 herausgegebenen Definitionen der Morphologie des Knochenmarks¹⁴⁵.

Für die Beurteilung der Knochenmarkzellularität einer Biopsie muss diese entsprechend dem Alter des Patienten begutachtet werden. So wird die Gesamtzelldichte des Knochenmarks im Vergleich zu der altersentsprechenden Zellularität der Normalpopulation gesehen¹⁴⁸. Eine Hyperzellularität entspricht somit einem Zustand oberhalb der normalen Zellularitätsgrenze.

Die Megakaryozyten im Knochenmark spielen bei der Differentialdiagnose der ET und der präPMF die zentrale histologische Bedeutung. Um die Reifestörung dieser Megakaryozyten genauer beurteilen zu können, wurde sowohl die Größe der Zellen als auch die Formation der Zellkerne und die Anordnung der Zellen im Knochenmarkstroma betrachtet.

Die Größe der Megakaryozyten wurde wie bereits in der Literatur von Kvasnicka *et al.*¹⁴⁵ vorbeschrieben von klein bis riesengroß klassifiziert. Hierbei

werden Megakaryozyten als „riesengroß“ bezeichnet, sobald sie das doppelte der Größe eines normalen Megakaryozyten überschreiten.

Die Zellkerne betrachteten wir insbesondere hinsichtlich der atypischen Lobulierung, welche auf eine Reifestörung hinweist. Das Ausmaß der Kernlappung reicht von hyperlobulierten Kernen bis hin zu plumpen, hypolobulierten Kernen, welche auch als wolkenartig beschrieben werden.

Die Anordnung der Megakaryozyten zueinander und zum umliegenden Stroma ist ein weiteres differenzialdiagnostisch genutztes Merkmal. Megakaryozytennester (Cluster) sind mehr als drei unmittelbar zueinander benachbart liegende Megakaryozyten, ohne dass eine weitere hämatopoetische Zelle zwischen diesen liegt. Dies wird als dichtes Cluster beschrieben (dense cluster). Liegen drei Megakaryozyten eng beieinander, sind jedoch noch von wenigen hämatopoetischen Zellen getrennt, nennt man dies ein lockeres Cluster (loose cluster). Diese lockeren Cluster finden sich auch bei der ET; für die PMF sind jedoch dichte Cluster typisch.

Die erhöhte Granulopoese wurde in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da sie bei Patienten mit einer myeloproliferativen Neoplasie meist mit der bereits erfassten Hyperzellularität korreliert. Das heißt, die meisten an einer MPN erkrankten Patienten mit einem hyperzellulären Knochenmark weisen eine vermehrte Granulopoese auf, so dass beide Parameter denselben Umstand wiedergeben. Um eine Vereinfachung der Differenzialdiagnostik zu erreichen, wurde in dieser Arbeit daher lediglich die Hyperzellularität beurteilt.

3 Ergebnisse

3.1 Histologische Begutachtung der Biopsien

Die histologische Begutachtung und Beurteilung der Knochenmarkbiopsien erfolgte anhand oben genannter morphologischer Kriterien, welche in der WHO-Klassifikation von 2016¹ aufgeführt werden. Wie bereits in Tabelle 5 aufgeführt, sind dies vor allem sechs morphologische Kriterien, welche es zur Diagnosefindung zu begutachten gilt: Altersentsprechende Knochenmarkzellularität, Megakaryozytenmorphologie (Cluster-Bildung, Größe und lobulierte Kerne), die erhöhte Granulopoese, sowie der Fibrosegrad. Wie im Abschnitt 2.4. des Material- und Methoden-Teils beschrieben, erfolgte eine Beschränkung auf nur einen Teil der morphologischen Merkmale. Diese Merkmale sind Teil der in der WHO-Klassifikation von 2016 explizit aufgeführten Kriterien zur Diagnosefindung einer präPMF.

Weitere morphologische Parameter wie die Erythropoese, Granulopoese und der Fibrosegrad des Knochenmarks wurden nicht in die Beurteilung der Biopsien aufgenommen, da wir hier trotz normierter Klassifikationssysteme von einer subjektiven Bewertung der Parameter ausgingen. Weiterhin bestätigte sich bereits in vorherigen Studien, dass diese Parameter der Differentialdiagnostik der präPMF und der ET nicht nutzen. Die Erythropoese ist bei beiden Entitäten in ähnlicher Weise reduziert und bei einer höhergradigen Knochenmarkfibrose müsste sowieso bereits von der fibrotischen Form der PMF ausgegangen werden und wäre daher für diese Arbeit nicht von Relevanz. Anstatt eine Reifungsstörung der Megakaryozyten allgemein zu erfassen, ersetzten wir dieses Kriterium durch die Begutachtung vorhandener lobulierter Kerne in den Megakaryozyten.

Die mittels Routine- und speziellen Färbetechniken aufgearbeiteten Biopsien, der nach WHO-Klassifikation mit präPMF und ET diagnostizierten Patienten, zeigten jeweils charakteristische histopathologische Befunde im Knochenmark.

Augenmerk wurde vor allem auf die Zellularität des Knochenmarks sowie auf die oben aufgeführten Charakteristiken der Megakaryozytenmorphologie gelegt.

3.2 Histologisches Bild der präfibrotische Form der PMF

Das präfibrotische Stadium der PMF zeigt in der Knochenmarkbiopsie ein typischerweise hyperzelluläres Knochenmark ohne nennenswerte Knochenmarkfibrose. Entscheidend für die Diagnosestellung ist die Morphologie der Megakaryozyten, welche eine diagnostisch wegweisende Reifungsstörung der megakaryopoetischen Zelllinie aufweist. Die Zellkerne der Megakaryozyten zeigen sich typischerweise hyposegmentiert, teils wolkenartig verplumpt. Weiterhin ist die klassische und wegweisende Nesterbildung der Megakaryozyten bei der präfibrotischen Form zu finden. Die Vorstufen der Erythropoese und Granulopoese mit Linksverschiebung stellen sich ohne wesentliche Dysplasien dar. Eine Faservermehrung kann allenfalls minimal beschrieben werden, da dies eher charakteristisch für die manifeste Form der PMF wäre und bei der präPMF typischerweise nicht zu finden ist.

Abbildung 1: May-Grünwald-Färbung; Knochenmarksausstrich einer präPMF mit einem atypischen, pleomorphen Megakaryozyt mit hypolobuliert (verplumpten) Zellkernen und atypischen Kernsegmentierungen

Abbildung 2: Knochenmarkhistologie mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung; Bild einer präPMF mit hyperzellulärem Knochenmark, granulopoetischer Proliferation und Linksverschiebung neben atypischen Megakaryozyten

Abbildung 3: Knochenmarkhistologie mit Chloracetat-Esterase-Färbung; Bild einer präPMF mit vielen eng beieinander liegenden, hypolobulierten und damit reifungsgestörten Megakaryozyten in hyperzellulärem Knochenmark gelegen

Abbildung 4: Knochenmarkhistologie mit PAS-Färbung (Periodic Acid Schiff); Bild der präPMF mit dichten Nestern reifungsgestörter Megakaryozyten

Abbildung 5: Knochenmarkhistologie mit PAS-Färbung (Periodic Acid Schiff);
Vergrößerter Ausschnitt: Atypische Umkleidung von Adipozyten durch reifungsgestörten Megakaryozyten bei der präPMF

Abbildung 6: Knochenmarkhistologie mit PAS-Färbung (Periodic Acid Schiff); präPMF mit großer atypischer dichter Nesterbildung (dense cluster) von Megakaryozyten

3.3 Histologisches Bild der Essentiellen Thrombozythämie

Im Gegensatz zum morphologischen Erscheinungsbild der präPMF, präsentiert sich die Struktur des Knochenmarks bei der ET deutlich anders. Die Zellularität im Knochenmark entspricht größtenteils der eines gesunden Menschen. Auch in diesem Knochenmark steht die Megakaryozytose im Vordergrund, jedoch imponieren die Megakaryozyten als große Zellen mit einer insgesamt regelhaften Kern-Zytoplasma-Relation mit etwas hyperlobulierten Zellkernen (siehe Abbildung 9). Sie liegen relativ locker im Knochenmark verteilt und sind nicht in dichten Nestern angeordnet. Eine wesentliche Faservermehrung findet sich bei der ET ebenfalls nicht.

Abbildung 7: May-Grünwald-Färbung; Knochenmarkausstrich bei ET; Vergrößerter Ausschnitt eines prominenten Megakaryozyten, welcher sich mit hyperlobuliertem Zellkern ohne wesentliche Reifungsstörung darstellt

Abbildung 8: Knochenmarkhistologie mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung bei ET; Typisches Bild einer ET mit normozellulärem Knochenmark mit nicht reifungsgestörten locker verteilten Megakaryozyten

Abbildung 9: Knochenmarkhistologie mit Hämatoxylin-Eosin-Färbung bei der ET;
Vergrößerte Darstellung eines einzeln liegenden hyperlobulierten Megakaryozyten
ohne wesentliche Reifungsstörung

Abbildung 10: Knochenmarkhistologie mit PAS-Färbung (Periodic Acid Schiff);
Mikrofokale Nesterbildung bei der ET: Zwei nicht reifungsgestörte Megakaryozyten,
welche die Kriterien der WHO als Cluster nicht erfüllt

Insgesamt präsentiert sich das histologische Bild der ET mit deutlichen Unterschieden gegenüber dem der präPMF. Insbesondere die atypisch erscheinende Megakaryopoese, wie sie bei der präfibrotischen Form der PMF zu finden ist, kann bei der ET nicht in gleicher Weise gefunden werden.

3.4 Quantitative Unterscheidung der präPMF und ET

Nach den im Abschnitt 2.4. genannten Definitionen der Parameter, sollte die Diagnosefindung eigentlich einfach und reproduzierbar möglich sein. In Tabelle 9 sind in der linken Spalte die typischen Befunde der präPMF dargestellt, in der rechten Spalte Befunde der ET. Die klaren Kernkriterien lassen die Biopsien der linken und rechten Spalte wie erwartet einfach der präPMF bzw. der ET zuordnen. Vergleicht man diese beiden Spalten direkt miteinander fällt die Zuordnung relativ leicht. In der mittleren Spalte hingegen zeigt sich die Problematik der Knochenmarkbiopsien mit einer überlappenden Grauzone. Hier ist die Auslegung der Kriterien nicht eindeutig und diese Ausschnitte lassen keine definitive Differentialdiagnostik zu. Sie könnten sich sowohl bei Patienten mit einer präPMF als auch bei Patienten mit einer ET finden. Auch innerhalb einer Knochenmarkbiopsie kann sich das Knochenmark teils typisch, teils jedoch auch als schwierig zu beurteilen darstellen. Dieser nicht unwesentliche Teil bereitet differenzialdiagnostisch häufig Schwierigkeiten, weshalb nicht nur ein einzelner Ausstrich des Knochenmarks bewertet werden sollte.

Tabelle 10: Morphologische Schlüsselparameter zur Differenzialdiagnostik zwischen der präPMF und der ET

	präPMF	Grauzone mit überlappenden morphologischen Merkmalen	ET
Knochenmark- zellularität
Cluster-Bildung der Megakaryozyten
Größe der Megakaryozyten

Um eine einheitliche Beurteilung der Knochenmarkbiopsien zu gewährleisten, wurde auch das Bewertungssystem der morphologischen Kriterien genauer definiert und im Gegensatz zu den früheren Bewertungsbögen vereinfacht. Dabei gilt das Kriterium als gegeben (positiv), wenn die in Tabelle 11 aufgeführten Schwellenwerte überschritten wurden. Das frühere mehrstufige semiquantitative Bewertungssystem von Kvasnicka *et al.* sowie von den dänischen Kollegen wurde verlassen.

Tabelle 11: Definitionen der morphologischen Kriterien

Altersentsprechende Knochenmarkzellularität	> 30 % der normalen altersentsprechenden Zellularität
Cluster-Bildung der Megakaryozyten	> 1 Cluster pro 10 auftretende Megakaryozyten
Größe der Megakaryozyten	> 30 % große Megakaryozyten
Atypische Lobulierung der Megakaryozytenzellkerne	> 30 % atypisch lobulierte Megakaryozytenzellkerne

In Tabelle 12 ist die Häufigkeit des Auftretens der von uns gewählten morphologischen Kriterien zusammengefasst. Bei über 95 % der präPMF-Biopsien zeigte das Knochenmark eine erhöhte Zellularität sowie eine typische Nesterbildung der Megakaryozyten auf. Beides zeigte sich deutlich seltener bei der ET: Lediglich bei 17,6 % der ET-Biopsien konnte eine erhöhte Zellularität beschrieben werden und bei marginalen 1,5 % fanden sich Nesterbildungen der Megakaryozyten. Andererseits präsentieren sich die Megakaryozyten bei der ET zu über 94 % als vergrößert, während dies bei der PMF in 69 % der Fälle zutrifft. Sehr charakteristisch für die präPMF scheint die atypische Lobulierung der Megakaryozytenkerne zu sein: Bei allen Knochenmarkbiopsien von präPMF Patienten konnte dieses Merkmal gefunden werden. Bei Patienten mit ET kam es hingegen nur bei 2,9 % zu dieser atypischen Lobulierung, hier stellten sich die Zellkerne eher hyperlobuliert dar.

Tabelle 12: Häufigkeiten der einzelnen morphologischen Kriterien bei Patienten mit präPMF und ET

	präPMF	ET
Erhöhte altersentsprechende Knochenmarkzellularität	96,7 %	17,6 %
Nester-Bildung der Megakaryozyten	95,4 %	1,5 %
Größe der Megakaryozyten	69,1 %	94,6 %
Atypische Lobulierung der Megakaryozytenzellkerne	100 %	2,9 %

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nicht nur die einzelnen Häufigkeiten der morphologischen Kriterien beurteilt werden, sondern vor allem dargestellt werden, dass das gegebene morphologische Muster entscheidend für eine korrekte Diagnosestellung ist.

In Tabelle 13 ist hinsichtlich dieser These dargestellt, wie viel Prozent der Knochenmarkbiopsien keines oder nur eines der vier oben aufgeführten morphologischen Merkmale trägt und in wie viel Prozent mehr als ein Merkmal zu finden ist.

Tabelle 13: Häufigkeiten der zusammengefassten morphologischen Kriterien bei Patienten mit präPMF und ET

	präPMF	ET
Keines oder nur ein Kriterium vorhanden	0 %	81,9 %
> ein Kriterium vorhanden	100 %	18,1 %

Es zeigt sich eine deutliche Favorisierung bei der präPMF mehr als ein Merkmal zu präsentieren. Jede Knochenmarkbiopsie von Patienten mit präPMF zeigte mehr als ein Merkmal. Bei der ET hingegen zeigen 81,9 % der Biopsien keines oder nur eines der beschriebenen vier Merkmale. Problematisch zu betrachten sind die verbliebenen 18,1 % der Patienten mit einer ET, welche in der Knochenmarkbiopsie mehr als ein Kriterium präsentieren und somit fälschlicherweise einer präPMF diagnostiziert werden könnten.

4 Diskussion

4.1 Diagnosekriterien der WHO-Klassifikation

Die Diagnosen der präPMF und der ET werden anhand der WHO-Klassifikation von 2016 gestellt¹. Bis heute gibt es mangels eines charakteristischen zytogenetischen bzw. molekularbiologischen Markers keine auf molekularpathogenetischen Befunden basierende Klassifikation der präPMF oder der ET. Die WHO-Klassifikation von 2016 vereint daher sowohl das histomorphologische Erscheinungsbild, die molekularbiologischen Strukturen als auch die in den Nebenkriterien aufgeführten klinischen Parametern in den Diagnosekriterien.

Die Knochenmarkbiopsie hat eine besondere diagnostische Wertigkeit bei der Differenzierung der ET und der präPMF, da sich beide initial mit einer isolierten Thrombozythämie präsentieren können und somit zunächst keine entscheidende Klinik vorhanden ist.

Wie aus der WHO-Klassifikation von 2016 bereits hervorgeht, manifestiert sich die präPMF hauptsächlich durch eine Proliferation der megakaryozytären Zelllinie im Knochenmark. Deren Morphologie wird eine bedeutende diskriminatorische Relevanz attestiert, weshalb sie bereits in den Hauptkriterien aufgeführt ist.

Allerdings gilt es zu beachten, dass weder für die Diagnose der präPMF noch für die ET ein alleiniges histologisches Merkmal herangezogen werden sollte. Es gilt immer ein morphologisches Muster des Erscheinungsbildes des Knochenmarks zu betrachten, damit eine diagnostische Entscheidung mit einer hohen qualitativen Aussagekraft getroffen werden kann. So zeigt die präPMF immer das von der WHO-Klassifikation vorgegebene histologische Muster, wohingegen die ET zu über 80 % nur einzelne der von uns beurteilten morphologischen Merkmale aufweist.

Wie in Tabelle 13 aufgeführt, zeigen jedoch trotzdem noch 18,1 % der mit einer ET diagnostizierten Patienten das typische histopathologische Erscheinungsbild einer präPMF. Hier zeigt sich bestätigt, dass eine reine

histopathologische Begutachtung zwar von hoher diagnostischer Wertigkeit ist, jedoch alleinig ebenfalls keine definitive Diagnosestellung ermöglicht. Aufgrund dieses Umstandes ist es sinnvoll die Nebenkriterien der WHO-Klassifikation zu beachten. Benutzt man die klinischen Daten der Patienten (siehe Abschnitt 4.3.) als weiteres diagnostisches Werkzeug, kann man die Prozentzahl der bisher nicht eindeutig klassifizierbaren Patienten deutlich verringern. Es bleiben lediglich unter 10 % der ET-Patienten übrig, welche sich mit einer nicht klassischen Knochenmarkmorphologie präsentieren und deren klinische Parameter zu keiner weiterführenden Diagnosestellung führt. Diese Patienten sollten somit am ehesten der Gruppe der „Unklassifizierbaren myeloproliferativen Neoplasien“ (MPN-U) zugeteilt werden.

Weiterhin gibt es, wie in Tabelle 10 dargestellt, Knochenmarkbiopsien, welche trotz standardisierter Begutachtung der Parameter nicht eindeutig einer Erkrankung zuzuordnen sind, sondern durch ihre unklare Morphologische Darbietung einen überlappenden Bereich zwischen der ET und der präPMF einnehmen.

Insgesamt zeigt sich, dass die Integration des morphologischen Musters die Differentialdiagnostik der präPMF von der ET deutlich erleichtert und diagnostische Sicherheit gibt.

Eine signifikante Verbesserung der Diagnosefindung gelingt nur anhand der Zusammenschau der morphologischen Parameter, welche das klassische beschriebene Muster bei der präPMF ergeben. Die Begutachtung nur eines einzelnen Merkmals kann zur Diagnosestellung nicht beitragen.

In dieser Arbeit wurde sich vorrangig der charakteristischen Morphologie des hyperzellulären Knochenmarks mit reifegestörten Megakaryozyten gewidmet. Inwiefern eine eventuell bereits vorhandene minimale Faservermehrung zur Unterscheidung der präPMF und der ET dient, wurde nicht betrachtet und bleibt Teil weiterer Studien.

In Anbetracht der hier beschriebenen Wichtigkeit der morphologischen Begutachtung des Knochenmarks, ist beispielsweise die noch immer geläufige Klassifikation der „British Society for Haematology“ (BSH) zu kritisieren. Wie

von Barbui *et al.* 2015⁹⁷ diskutiert, kann anhand der britischen Richtlinien nicht ausreichend zwischen einer wahren ET und einer eventuell thrombozythämisch verlaufenden präfibrotischen Form der PMF unterschieden werden, da hier keine spezifische Knochenmarkmorphologie für die ET bzw. für die präPMF formuliert ist.

4.2 Wertigkeit einzelner morphologischer Parameter

Wie aus der Tabelle 12 hervorgeht, gibt es kein einzelnes morphologisches Merkmal, welches zu 100 % charakteristisch für nur eine Krankheit steht. Selbst die atypische Lobulierung, welche sich in jedem Knochenmark von präPMF-Patienten fand, wurde leider auch zu 2,9 % bei ET-Patienten gefunden. Dieser Parameter könnte somit zusammen mit der Nesterbildung der Megakaryozyten zumindest als am charakteristischsten für eine präPMF tituiert werden.

Trotz dieser Favourisierung zweier Merkmale ist wichtig erneut zu betonen, dass die Diagnostik der MPNs nicht auf die Wertigkeit eines oder zweier einzelner morphologischer Parameter abzielt. Dies konnte bereits in Dänemark in einer 2015 durchgeführten Studie¹⁴⁷ unterstrichen werden, in welcher Pathologen in der histologischen Begutachtung von MPNs gezielt geschult wurden. Es zeigte sich, dass die Pathologen nicht in der Beurteilung einzelner Parameter geschult werden müssen, sondern darin, ein vorliegendes charakteristisches Muster einer MPN zu erkennen. Einzelne Merkmale können sich in den Subtypen der MPN überlappen und stellen kein sicheres diagnostisches Kriterium dar. Von der einheitlichen Begutachtung der Biopsien profitieren vor allem Patienten mit einer präPMF, da diese häufig als ET fehldiagnostiziert werden, jedoch bei genauerer Begutachtung das bereits beschriebene unterschiedliche histologische Bild präsentieren.

Um das Erkennen und die zuverlässige Unterscheidung der einzelnen Parameter zu gewährleisten, ist es trotz allem wichtig, die einzelnen Parameter zu benennen und in einer standardisierten Form zur Darstellung zu bringen. Konstellationen von spezifischen Schlüsselparametern, wie die in dieser Arbeit hervorgehobene Knochenmarkzellularität und die Megakaryozytenmorphologie,

sollten auch weiterhin in Zusammenschau mit molekulardiagnostischen Befunden und klinischen Daten betrachtet werden.

Insgesamt zeigt diese Arbeit, dass bereits bei einer einheitlichen Begutachtung von nur vier morphologischen Parametern und deren charakteristischen Konstellationen die Diagnosefindung der MPN profitiert. Der im Jahr 2005 publizierte Bewertungsbogen von Thiele *et al.*¹⁴⁵ zeigt sich zwar vollumfänglich, jedoch im täglichen Gebrauch weniger praktikabel. Auch der von Madelung 2013¹⁴⁶ modifizierte Bogen konnte weiter vereinfacht werden. Die histologische Beurteilung auf lediglich vier essentielle Parameter zu reduzieren, zeigt sich hinsichtlich der Praktikabilität im Alltag geeignet. Dafür gilt es jedoch die Zusammenschau der Parameter ganzheitlich stärker zu gewichten als das Vorkommen einzelner Parameter.

4.3 Wertigkeit einzelner klinischer Parameter

Problematisch zu betrachten sind die verbliebenen 18,1 % der Patienten mit ET, welche in der Knochenmarkbiopsie mehr als ein Kriterium präsentieren und somit fälschlicherweise einer präPMF diagnostiziert werden könnten.

Zur definitiven Diagnosefindung tragen daher klinische Parameter ebenso bei wie die oben beschriebene Morphologie. In den Nebenkriterien der WHO-Klassifikation werden die bedeutenden Parameter genannt: Hb-Wert (Anämie), Leukozytenzahl (insbesondere eine Leukozytose $\geq 11 \times 10^9/L$), eine Erhöhung der Laktatdehydrogenase (LDH) sowie eine Splenomegalie. Mindestens eines dieser Parameter muss für die Diagnose der präPMF vorhanden sein. Eine Anämie wird bei Männern ab einem Hämoglobin-Wert von $\leq 13 \text{ g/dL}$, bei Frauen ab einem Wert $\leq 12 \text{ g/dL}$ diagnostiziert. Sobald die Milz palpabel ist oder eine Größe $\geq 12 \text{ cm}$ in einer Bildgebung gemessen wird, gilt diese als vergrößert. Der LDH-Wert gilt meist ab 240 U/L als relevant erhöht.

Bei der ET wird in der WHO-Klassifikation die relevante Thrombozytose von $\geq 450 \times 10^9/L$ in den Hauptkriterien als einziges klinisches Merkmal aufgeführt.

Wie in einer Studie von Jeryczynski *et al.*¹⁰⁰ 2017 publiziert wurde, präsentieren mehr als 91 % der Patienten mit präPMF mindestens eines der Nebenkriterien. Im Gegensatz dazu waren es jedoch auch 48 % der Patienten mit einer ET, welche eines oder teils sogar mehrere der Nebenkriterien zeigten. Dies unterstützt die Handhabung der WHO, die klinischen Parameter lediglich in den Nebenkriterien zu führen und als nicht relevant genug für eine Aufführung in den Hauptkriterien zu bemessen. Verglichen mit ET-Patienten, zeigten Patienten mit präPMF signifikant häufiger erhöhte LDH-Werte sowie eine deutlich häufiger vorkommende Splenomegalie¹⁴⁹. Weiterhin korreliert die präPMF mit höheren Leukozytenwerten, niedrigeren Hämoglobin-Werten und höheren Thrombozytenzahlen^{150,151}. Der Hämoglobin-Wert kann jedoch auch wie von Barosi *et al.*¹⁵ 2012 beschrieben normwertig oder sogar deutlich erhöht sein. 7,6 % der präPMF-Patienten zeigten in der damaligen Kohorte eine Erythrozytose mit Hämoglobin-Werten von $\geq 16,5$ g/dL und könnten damit sogar fälschlicherweise einer Polyzythämie vera diagnostiziert werden.

Eine Zusammenschau der Studien zeigt, dass der Fokus bei der Diagnose einer präPMF vor allem auf den LDH-Wert gelegt werden sollte. Vor allem der Hämoglobin-Wert fällt aufgrund seiner Variabilität bei Diagnosestellung weniger und seltener ins Gewicht.

Nur 8,8 % der Patienten mit dem morphologischen Knochenmarkbefund einer präPMF zeigten initial keines der geforderten Nebenkriterien¹⁰⁰. Bei diesen Patienten wird die kontinuierliche Reevaluation der Diagnose empfohlen, vor allem durch wiederholte Blutentnahmen zur Diagnosesicherung bei eventuell im Verlauf auftretenden charakteristischen Werten.

4.4 Reproduzierbarkeit der WHO-Klassifikation

Bei der Anwendung der WHO-Klassifikation, insbesondere der histologischen Begutachtung der Knochenmarkbiopsien, stellt sich die Frage, ob die vorgegebenen histologischen Parameter (Megakaryozytenmorphologie, etc.) eine Reproduzierbarkeit ermöglicht.

Insbesondere die Reproduzierbarkeit der in dieser Arbeit diskutierten Differentialdiagnostik der präPMF und der ET anhand der WHO-Klassifikation wird kontrovers beschrieben.

Mehrfach wurden in Studien Knochenmarkbiopsien von mehreren Pathologen unabhängig voneinander erneut begutachtet und zum einen anhand der WHO-Klassifikation und ebenfalls anhand der älteren Kriterien der Polycythemia Vera Study Group¹⁵² von 1997 reklassifiziert. Die Studienlage ist hierbei teils kontrovers. Es finden sich zum einen Studien, bei welchen eine hohe Übereinstimmung der histologischen Auswertung anhand der WHO-Klassifikation erzielt werden konnte. Andere Studien kommen zu einem deutlich niedrigeren Prozentsatz zu einheitlichen Diagnosen, weshalb hier die Reproduzierbarkeit der WHO-Klassifikation eher angezweifelt wird.

In Tabelle 14 sind Studien aufgeführt, welche anhand der WHO-Kriterien eine hohe Reproduzierbarkeit der Diagnosen erreichen konnte. Diese Studien stützen die Aussage der WHO-Klassifikation, dass nur anhand einer Zusammenschau von standardisierten Knochenmarkmerkmalen und klinischen Daten eine valide Diagnosefindung möglich ist.

Tabelle 14: Studien mit einem hohen Prozentsatz der Übereinstimmung

Studie	Konsensus
Gianelli <i>et al.</i> , 2014 ⁷¹	76 %
Madelung <i>et al.</i> , 2013 ¹⁴⁶	83 %
Gisslinger <i>et al.</i> , 2013 ¹⁵³	83 %
Thiele <i>et al.</i> , 2011 ⁷⁰	88 %
Barbui <i>et al.</i> , 2011 ⁴⁰	81 %

Andererseits argumentieren Studien wie jene von Wilkens, dass insbesondere die Megakaryozytenmorphologie einer sehr subjektiven Betrachtung unterliegt und somit keine Reproduzierbarkeit von ungeübten Pathologen angenommen werden kann. In den aufgeführten Studien der Tabelle 15 wird der routinemäßige Gebrauch der WHO-Klassifikation angezweifelt, da nicht speziell geübte Pathologen einen zu geringen Prozentsatz an Diagnosekonsensus bieten. Dadurch sei eine valide Diagnosefindung anhand der WHO-Klassifikation nicht gegeben. Da die hier betrachteten Erkrankungen relativ selten sind und viele Pathologen nur selten MPNs diagnostizieren, könne die WHO-Klassifikation keine definitive Entscheidungshilfe darstellen. Buhr *et al.*¹⁵⁴ propagieren außerdem, dass durch den Gebrauch der WHO-Klassifikation ein deutlich höherer Anteil an unklassifizierbaren myeloproliferativen Neoplasien (MPN-U) entstehe.

Tabelle 15: Studien mit einer niedrigeren Reproduzierbarkeit der WHO-Kriterien

Studie	Konsensus
Buhr <i>et al.</i> , 2012 ¹⁵⁴	62 %
Koopmans <i>et al.</i> , 2011 ¹⁵⁵	70 %
Brousseau <i>et al.</i> , 2010 ¹⁵⁶	65 %
Wilkins <i>et al.</i> 2008 ¹⁵⁷	53 %

Weiterhin existieren Studien, welche die Klassifikation der WHO unterstützen und eine Einteilung der Patienten anhand dieser vorgenommen haben. In diesen Studien (siehe Tabelle 16) fehlen jedoch objektivierbare und spezialisierte Knochenmarkkriterien anhand welcher die Klassifikation vorgenommen wurde.

Tabelle 16: Zusätzliche Studien, welche die WHO unterstützen

Florena <i>et al.</i> , 2004 ⁶⁹
Kreft <i>et al.</i> , 2005 ¹⁵⁸
Gianelli <i>et al.</i> , 2006 ¹⁵⁹
Gianelli <i>et al.</i> , 2008 ¹⁶⁰
Vener <i>et al.</i> , 2008 ³⁹
Ejerblad <i>et al.</i> , 2013 ¹⁶¹

Zusammengefasst gehen wir davon aus, dass die Diagnosefindung reproduzierbar ist, solange nicht einzelne Merkmale betrachtet werden, sondern das morphologische Muster insgesamt beurteilt wird. Anhand einer standardisierten Diagnoserichtlinie wird eine hohe Übereinstimmungsrate der Pathologen erreicht, sodass nur noch eine sehr kleine Subgruppe der „Unklassifizierbaren myeloproliferativen Neoplasien (MPN-U)“ übrig bleibt.

Inwiefern weitere Parameter wie das initiale Fibrorestadium die Diagnosefindung beeinflussen, bleibt weiterhin Gegenstand aktueller Forschungen. Insgesamt sollte bei ET-Patienten mit einer eher untypischen klinischen Präsentation, wie das Vorliegen einer Anämie oder einer Splenomegalie an die Möglichkeit eines präfibrotischen Stadiums der PMF gedacht werden und diese anhand der morphologischen Begutachtung des Knochenmarks genauer beleuchtet werden.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit stützt sich auf die retrospektive Begutachtung von 348 Knochenmarkbiopsien, welche anhand der WHO-Klassifikation von 2016 erneut reevaluiert wurden. Insbesondere widmeten wir uns der Differentialdiagnostik der „echten ET“ und der thrombozythämisch verlaufenden Form der PMF (präPMF). Die Einteilung erfolgte anhand morphologischer Kriterien, wie sie in der WHO-Klassifikation von 2016 aufgeführt sind.

Zusammengefasst ist eine richtungsweisende diagnostische Entscheidung der Patienten mit ET und präPMF nur möglich, wenn man sowohl die molekulargenetischen und klinischen Parameter in Kombination mit histologischen Kriterien und deren charakteristischen Mustern betrachtet. Eine repräsentative Knochenmarkbiopsie und deren standardisierte Befundung ist daher von absoluter diagnostischer Wichtigkeit für die Subtypisierung der MPN. Augenmerk sollte auf das typisch dargebotene morphologische Muster gelegt werden und nicht auf einzelne Merkmale. Die vorliegende Knochenmarkbiopsie muss nicht, wie früher praktiziert, anhand vieler einzelner Merkmale detailliert betrachtet und bewertet werden. Durch eine kombinierte Betrachtung von nur wenigen morphologischen Schlüsselparametern ist bereits eine Diagnose mit hoher Reproduzierbarkeit möglich. Mit dieser Arbeit wird der Stellenwert der WHO-Klassifikation unterstrichen, da die hier vorgegebenen Kriterien absolut essentiell und trotzdem in ihrem Umfang ausreichend sind, um die Differentialdiagnostik der MPN in Zukunft zu verbessern.

6 Summary

The work at hand is premised on a retrospective analysis of 348 bone marrow biopsies, which have been reevaluated based on the WHO classification from 2016. Especially, we analysed the differential diagnostic of essential thrombocythemia (ET) versus the thrombocythemic prefibrotic form of primary myelofibrosis (prePMF) mimicking ET.

Additional to a standardized histopathological analysis, a representative bone marrow biopsy is essential in the diagnostical system of myeloproliferative diseases.

More particularly, the characteristic morphological patterns of the present bone marrow biopsy should be recognised instead of solely analysing many morphological features separately. These characteristic patterns of bone marrow histopathology can be assigned different subtypes of myeloproliferative diseases.

A combined evaluation of only a few morphological key features enables a diagnosis of high reproducibility and is therefore sufficient for a valid diagnosis.

In summary, a valid diagnosis can only be made by merging the molecular genetic factors, the clinical presentation in combination with histological criteria and their characteristic pattern.

This study demonstrates the importance of the WHO classification and supports their guidelines, which are improving the differential diagnosis of myeloproliferative diseases.

7 Literaturverzeichnis

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
2. Mehta J, Wang H, Iqbal SU, Mesa R. Epidemiology of myeloproliferative neoplasms in the United States. *Leuk Lymphoma*. 2014;55(3):595-600. doi:10.3109/10428194.2013.813500.
3. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol*. 2014;92(4):289-297. doi:10.1111/ejh.12256.
4. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2014;89(9):915-925. doi:10.1002/ajh.23703.
5. Cervantes F, Barosi G, Demory JL, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: Disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. *Br J Haematol*. 1998;102(3):684-690.
6. Ward HP, Block MH. The natural history of agnogenic myeloid metaplasia (AMM) and a critical evaluation of its relationship with the myeloproliferative syndrome. *Medicine (Baltimore)*. 1971;50(5):357-420.
7. Rumi E. Familial chronic myeloproliferative disorders: The state of the art. *Hematol Oncol*. 2008;26(3):131-138. doi:10.1002/hon.863.
8. Cervantes F, Ribera JM, Sanchez-Bisono J, Brugues R, Rozman C. Myeloproliferative disease in two young siblings. *Cancer*. 1984;54(5):899-902.
9. Roszbach H-C. Familial infantile myelofibrosis as an autosomal recessive disorder: Preponderance among children from Saudi Arabia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2006;23(5):453-454. doi:10.1080/08880010600623240.
10. Guglielmelli P, Pacilli A, Rotunno G, et al. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis. *Blood*. 2017;129(24):3227-3236. doi:10.1182/blood-2017-01-761999.
11. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100(7):2292-2302. doi:10.1182/blood-2002-04-1199.
12. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: Rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-951. doi:10.1182/blood-2009-03-209262.
13. Thiele J, Kvasnicka HM. Diagnostic differentiation of essential thrombocythaemia from thrombocythaemias associated with chronic idiopathic myelofibrosis by discriminate analysis of bone marrow features--a clinicopathological study on 272 patients. *Histol Histopathol*. 2003;18(1):93-102. doi:10.14670/HH-18.93.
14. Thiele J, Kvasnicka HM. Clinicopathological criteria for differential diagnosis of thrombocythemia in various myeloproliferative disorders. *Semin Thromb Hemost*. 2006;32(3):219-230. doi:10.1055/s-2006-939433.
15. Barosi G, Rosti V, Bonetti E, et al. Evidence that prefibrotic myelofibrosis is aligned along a clinical and biological continuum featuring primary myelofibrosis. *PLoS ONE*. 2012;7(4):e35631. doi:10.1371/journal.pone.0035631.

16. Mesa RA, Kantarjian H, Tefferi A, et al. Evaluating the serial use of the Myelofibrosis Symptom Assessment Form for measuring symptomatic improvement: Performance in 87 myelofibrosis patients on a JAK1 and JAK2 inhibitor (INCB018424) clinical trial. *Cancer*. 2011;117(21):4869-4877. doi:10.1002/cncr.26129.
17. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2009;113(13):2895-2901. doi:10.1182/blood-2008-07-170449.
18. Barosi G, Hoffman R. Idiopathic myelofibrosis. *Semin Hematol*. 2005;42(4):248-258. doi:10.1053/j.seminhematol.2005.05.018.
19. Hasselbalch H. Idiopathic myelofibrosis: A clinical study of 80 patients. *Am J Hematol*. 1990;34(4):291-300.
20. Kvasnicka HM, Thiele J, Werden C, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Prognostic factors in idiopathic (primary) osteomyelofibrosis. *Cancer*. 1997;80(4):708-719.
21. Barosi G, Rosti V, Massa M, et al. Spleen neoangiogenesis in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol*. 2004;124(5):618-625.
22. Wang X, Prakash S, Lu M, et al. Spleens of myelofibrosis patients contain malignant hematopoietic stem cells. *J Clin Invest*. 2012;122(11):3888-3899. doi:10.1172/JCI64397.
23. Schofield JK, Shun JL, Cerio R, Grice K. Cutaneous extramedullary hematopoiesis with a preponderance of atypical megakaryocytes in myelofibrosis. *J Am Acad Dermatol*. 1990;22(2 Pt 2):334-337.
24. Fedeli G, Certo M, Cannizzaro O, et al. Extramedullary hematopoiesis involving the esophagus in myelofibrosis. *Am J Gastroenterol*. 1990;85(11):1512-1514.
25. Wolf BC, Neiman RS. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: Pathophysiologic implications of the correlation between bone marrow changes and progression of splenomegaly. *Blood*. 1985;65(4):803-809.
26. Kvasnicka HM, Thiele J. Prodromal myeloproliferative neoplasms: The 2008 WHO classification. *Am J Hematol*. 2010;85(1):62-69. doi:10.1002/ajh.21543.
27. Brière JB. Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis associated with myeloproliferative disorders: Diagnosis and management. *Semin Thromb Hemost*. 2006;32(3):208-218. doi:10.1055/s-2006-939432.
28. Smalberg JH, Darwish Murad S, Braakman E, Valk PJ, Janssen HLA, Leebeek FWG. Myeloproliferative disease in the pathogenesis and survival of Budd-Chiari syndrome. *Haematologica*. 2006;91(12):1712-1713.
29. Boiocchi L, Espinal-Witter R, Geyer JT, et al. Development of monocytosis in patients with primary myelofibrosis indicates an accelerated phase of the disease. *Mod Pathol*. 2013;26(2):204-212. doi:10.1038/modpathol.2012.165.
30. Hultcrantz M, Wilkes SR, Kristinsson SY, et al. Risk and Cause of Death in Patients Diagnosed With Myeloproliferative Neoplasms in Sweden Between 1973 and 2005: A Population-Based Study. *J Clin Oncol*. 2015;33(20):2288-2295. doi:10.1200/JCO.2014.57.6652.
31. Thiele J, Kvasnicka HM. Hematopathologic findings in chronic idiopathic myelofibrosis. *Semin Oncol*. 2005;32(4):380-394. doi:10.1053/j.seminoncol.2005.04.010.

32. Kvasnicka HM, Thiele J. The impact of clinicopathological studies on staging and survival in essential thrombocythemia, chronic idiopathic myelofibrosis, and polycythemia rubra vera. *Semin Thromb Hemost*. 2006;32(4 Pt 2):362-371. doi:10.1055/s-2006-942757.
33. Tefferi A, Huang J, Schwager S, et al. Validation and comparison of contemporary prognostic models in primary myelofibrosis: Analysis based on 334 patients from a single institution. *Cancer*. 2007;109(10):2083-2088. doi:10.1002/cncr.22630.
34. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: A study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010;115(9):1703-1708. doi:10.1182/blood-2009-09-245837.
35. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, et al. DIPSS plus: A refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol*. 2011;29(4):392-397. doi:10.1200/JCO.2010.32.2446.
36. Tefferi A. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med*. 2000;342(17):1255-1265. doi:10.1056/NEJM200004273421706.
37. Cervantes F, Barosi G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: Diagnosis, prognostic factors, and staging. *Semin Oncol*. 2005;32(4):395-402. doi:10.1053/j.seminoncol.2005.04.011.
38. Thiele J, Kvasnicka HM. Grade of bone marrow fibrosis is associated with relevant hematological findings-a clinicopathological study on 865 patients with chronic idiopathic myelofibrosis. *Ann Hematol*. 2006;85(4):226-232. doi:10.1007/s00277-005-0042-8.
39. Vener C, Fracchiolla NS, Gianelli U, et al. Prognostic implications of the European consensus for grading of bone marrow fibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis. *Blood*. 2008;111(4):1862-1865. doi:10.1182/blood-2007-09-112953.
40. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: An international study. *J Clin Oncol*. 2011;29(23):3179-3184. doi:10.1200/JCO.2010.34.5298.
41. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: An international study of 797 patients. *Leukemia*. 2014;28(9):1804-1810. doi:10.1038/leu.2014.76.
42. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: Clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014;28(7):1472-1477. doi:10.1038/leu.2014.3.
43. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: An international study of 570 patients. *Leukemia*. 2014;28(7):1494-1500. doi:10.1038/leu.2014.57.
44. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014;124(16):2507-13; quiz 2615. doi:10.1182/blood-2014-05-579136.
45. Gianelli U, Vener C, Bossi A, et al. The European Consensus on grading of bone marrow fibrosis allows a better prognostication of patients with primary myelofibrosis. *Mod Pathol*. 2012;25(9):1193-1202. doi:10.1038/modpathol.2012.87.

46. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2018;36(4):310-318. doi:10.1200/JCO.2017.76.4886.
47. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood*. 2012;120(26):5128-33; quiz 5252. doi:10.1182/blood-2012-07-444067.
48. Dickstein JI, Vardiman JW. Hematopathologic findings in the myeloproliferative disorders. *Semin Oncol*. 1995;22(4):355-373.
49. Thiele J, Kvasnicka HM, Boeltken B, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. Initial (prefibrotic) stages of idiopathic (primary) myelofibrosis (IMF) - a clinicopathological study. *Leukemia*. 1999;13(11):1741-1748.
50. Thiele J, Kvasnicka HM, Orazi A. Bone marrow histopathology in myeloproliferative disorders--current diagnostic approach. *Semin Hematol*. 2005;42(4):184-195. doi:10.1053/j.seminhematol.2005.05.020.
51. Thiele J, Kvasnicka HM. The 2008 WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis. *Curr Hematol Malig Rep*. 2009;4(1):33-40. doi:10.1007/s11899-009-0005-6.
52. Thiele J, Kvasnicka HM, Werden C, Zankovich R, Diehl V, Fischer R. 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*. 1996;22(3-4):303-317. doi:10.3109/10428199609051762.
53. Thiele J, Kvasnicka HM. Prefibrotic chronic idiopathic myelofibrosis--a diagnostic enigma? *Acta Haematol*. 2004;111(3):155-159. doi:10.1159/000076524.
54. Buhr T, Büsche G, Choritz H, Länger F, Kreipe H. Evolution of myelofibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis as evidenced in sequential bone marrow biopsy specimens. *Am J Clin Pathol*. 2003;119(1):152-158. doi:10.1309/PTVG-B3DX-B8A8-M7KD.
55. Martyré MC, Romquin N, Le Bousse-Kerdiles MC, et al. Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol*. 1994;88(1):9-16.
56. Thiele J, Kvasnicka HM. Myelofibrosis--what's in a name? Consensus on definition and EUMNET grading. *Pathobiology*. 2007;74(2):89-96. doi:10.1159/000101708.
57. Thiele J, Kvasnicka HM, Vardiman J. Bone marrow histopathology in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders: A forgotten pearl. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2006;19(3):413-437. doi:10.1016/j.beha.2005.07.015.
58. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica*. 2005;90(8):1128-1132.
59. Kvasnicka HM, Beham-Schmid C, Bob R, et al. Problems and pitfalls in grading of bone marrow fibrosis, collagen deposition and osteosclerosis - a consensus-based study. *Histopathology*. 2016;68(6):905-915. doi:10.1111/his.12871.
60. Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2000;96(10):3374-3380.

61. Kvasnicka HM, Thiele J. Bone marrow angiogenesis: Methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders. *Histol Histopathol.* 2004;19(4):1245-1260. doi:10.14670/HH-19.1245.
62. Ni H, Barosi G, Hoffman R. Quantitative evaluation of bone marrow angiogenesis in idiopathic myelofibrosis. *Am J Clin Pathol.* 2006;126(2):241-247. doi:10.1309/4YGK-ED5L-WFW4-AVDV.
63. Boveri E, Passamonti F, Rumi E, et al. Bone marrow microvessel density in chronic myeloproliferative disorders: A study of 115 patients with clinicopathological and molecular correlations. *Br J Haematol.* 2008;140(2):162-168. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06885.x.
64. Thiele J, Steinberg T, Zankovich R, Fischer R. Primary myelofibrosis-osteomyelosclerosis (agnogenic myeloid metaplasia): Correlation of clinical findings with bone marrow histopathology and prognosis. *Anticancer Res.* 1989;9(2):429-435.
65. Georgii A, Buesche G, Kreft A. The histopathology of chronic myeloproliferative diseases. *Baillieres Clin Haematol.* 1998;11(4):721-749.
66. Georgii A, Buhr T, Buesche G, Kreft A, Choritz H. Classification and staging of Ph-negative myeloproliferative disorders by histopathology from bone marrow biopsies. *Leuk Lymphoma.* 1996;22 Suppl 1:15-29. doi:10.3109/10428199609074357.
67. Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Martínez-Avilés L, et al. Postpolycythaemic myelofibrosis: Frequency and risk factors for this complication in 116 patients. *Br J Haematol.* 2009;146(5):504-509. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07804.x.
68. Aharon A, Levy Y, Bar-Dayán Y, et al. Successful treatment of early secondary myelofibrosis in SLE with IVIG. *Lupus.* 1997;6(4):408-411. doi:10.1177/096120339700600412.
69. Florena AM, Tripodo C, Iannitto E, Porcasi R, Ingraio S, Franco V. Value of bone marrow biopsy in the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica.* 2004;89(8):911-919.
70. Thiele J, Kvasnicka HM, Müllauer L, Buxhofer-Ausch V, Gisslinger B, Gisslinger H. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: A multicenter study to validate the WHO classification. *Blood.* 2011;117(21):5710-5718. doi:10.1182/blood-2010-07-293761.
71. Gianelli U, Bossi A, Cortinovis I, et al. Reproducibility of the WHO histological criteria for the diagnosis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Mod Pathol.* 2014;27(6):814-822. doi:10.1038/modpathol.2013.196.
72. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005;352(17):1779-1790. doi:10.1056/NEJMoa051113.
73. Bock O, Büsche G, Koop C, Schröter S, Buhr T, Kreipe H. Detection of the single hotspot mutation in the JH2 pseudokinase domain of Janus kinase 2 in bone marrow trephine biopsies derived from chronic myeloproliferative disorders. *J Mol Diagn.* 2006;8(2):170-177.
74. Palandri F, Latagliata R, Polverelli N, et al. Mutations and long-term outcome of 217 young patients with essential thrombocythemia or early primary myelofibrosis. *Leukemia.* 2015;29(6):1344-1349. doi:10.1038/leu.2015.87.
75. Campbell PJ, Griesshammer M, Döhner K, et al. V617F mutation in JAK2 is associated with poorer survival in idiopathic myelofibrosis. *Blood.* 2006;107(5):2098-2100. doi:10.1182/blood-2005-08-3395.

76. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*. 2010;24(6):1128-1138. doi:10.1038/leu.2010.69.
77. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: Molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. *J Clin Oncol*. 2011;29(5):573-582. doi:10.1200/JCO.2010.29.8711.
78. Harrison CN, Vannucchi AM. Closing the gap: Genetic landscape of MPN. *Blood*. 2016;127(3):276-278. doi:10.1182/blood-2015-10-674101.
79. Akada H, Yan D, Zou H, Fiering S, Hutchison RE, Mohi MG. Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood*. 2010;115(17):3589-3597. doi:10.1182/blood-2009-04-215848.
80. Vannucchi AM, Guglielmelli P, Tefferi A. Advances in understanding and management of myeloproliferative neoplasms. *CA Cancer J Clin*. 2009;59(3):171-191. doi:10.3322/caac.20009.
81. Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P, et al. Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: A collaborative study of 1027 patients. *Am J Hematol*. 2014;89(8):E121-4. doi:10.1002/ajh.23743.
82. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2379-2390. doi:10.1056/NEJMoa1311347.
83. Kourie HR, Ameye L, Paesmans M, Bron D. Improved survival in patients with CALR1 compared to CALR2 mutated primary myelofibrosis: A meta-analysis. *Br J Haematol*. 2017;179(5):846-848. doi:10.1111/bjh.14259.
84. Tefferi A, Lasho TL, Tischer A, et al. The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants. *Blood*. 2014;124(15):2465-2466. doi:10.1182/blood-2014-07-588426.
85. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013;27(9):1861-1869. doi:10.1038/leu.2013.119.
86. Xie M, Lu C, Wang J, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*. 2014;20(12):1472-1478. doi:10.1038/nm.3733.
87. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488-2498. doi:10.1056/NEJMoa1408617.
88. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477-2487. doi:10.1056/NEJMoa1409405.
89. Agarwal R, Blombery P, McBean M, et al. Clinicopathological differences exist between CALR- and JAK2-mutated myeloproliferative neoplasms despite a similar molecular landscape: Data from targeted next-generation sequencing in the diagnostic laboratory. *Ann Hematol*. 2017;96(5):725-732. doi:10.1007/s00277-017-2937-6.
90. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, et al. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. *Blood Adv*. 2016;1(2):105-111. doi:10.1182/bloodadvances.2016000208.
91. Guglielmelli P, Rotunno G, Pacilli A, et al. Prognostic impact of bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis. A study of the AGIMM group on 490 patients. *Am J Hematol*. 2016;91(9):918-922. doi:10.1002/ajh.24442.

92. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, et al. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol*. 2018;36(17):1769-1770. doi:10.1200/JCO.2018.78.9867.
93. Skov V, Burton M, Thomassen M, et al. A 7-Gene Signature Depicts the Biochemical Profile of Early Prefibrotic Myelofibrosis. *PLoS ONE*. 2016;11(8):e0161570. doi:10.1371/journal.pone.0161570.
94. Barosi G. Essential thrombocythemia vs. early/prefibrotic myelofibrosis: Why does it matter. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2014;27(2):129-140. doi:10.1016/j.beha.2014.07.004.
95. Rupoli S, Goteri G, Picardi P, et al. Thrombosis in essential thrombocythemia and early/prefibrotic primary myelofibrosis: The role of the WHO histological diagnosis. *Diagn Pathol*. 2015;10:29. doi:10.1186/s13000-015-0269-1.
96. Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, et al. Incidence and risk factors for bleeding in 1104 patients with essential thrombocythemia or prefibrotic myelofibrosis diagnosed according to the 2008 WHO criteria. *Leukemia*. 2012;26(4):716-719. doi:10.1038/leu.2011.258.
97. Buxhofer-Ausch V, Gisslinger H, Thiele J, et al. Leukocytosis as an important risk factor for arterial thrombosis in WHO-defined early/prefibrotic myelofibrosis: An international study of 264 patients. *Am J Hematol*. 2012;87(7):669-672. doi:10.1002/ajh.23217.
98. Elliott MA, Pardanani A, Lasho TL, Schwager SM, Tefferi A. Thrombosis in myelofibrosis: Prior thrombosis is the only predictive factor and most venous events are provoked. *Haematologica*. 2010;95(10):1788-1791. doi:10.3324/haematol.2010.025064.
99. Cervantes F, Alvarez-Larrán A, Arellano-Rodrigo E, Granell M, Domingo A, Montserrat E. Frequency and risk factors for thrombosis in idiopathic myelofibrosis: Analysis in a series of 155 patients from a single institution. *Leukemia*. 2006;20(1):55-60. doi:10.1038/sj.leu.2404048.
100. Jeryczynski G, Thiele J, Gisslinger B, et al. Pre-fibrotic/early primary myelofibrosis vs. WHO-defined essential thrombocythemia: The impact of minor clinical diagnostic criteria on the outcome of the disease. *Am J Hematol*. 2017;92(9):885-891. doi:10.1002/ajh.24788.
101. Reilly JT. Idiopathic myelofibrosis: Pathogenesis, natural history and management. *Blood Rev*. 1997;11(4):233-242.
102. Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, Diehl V. Dynamics of fibrosis in chronic idiopathic (primary) myelofibrosis during therapy: A follow-up study on 309 patients. *Leuk Lymphoma*. 2003;44(6):949-953. doi:10.1080/1042819031000077070.
103. Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, Diehl V. Bone marrow histopathology following cytoreductive therapy in chronic idiopathic myelofibrosis. *Histopathology*. 2003;43(5):470-479.
104. Chott A, Gisslinger H, Thiele J, et al. Interferon-alpha-induced morphological changes of megakaryocytes: A histomorphometrical study on bone marrow biopsies in chronic myeloproliferative disorders with excessive thrombocytosis. *Br J Haematol*. 1990;74(1):10-16.
105. Pizzi M, Silver RT, Barel A, Orazi A. Recombinant interferon- α in myelofibrosis reduces bone marrow fibrosis, improves its morphology and is associated with clinical response. *Mod Pathol*. 2015;28(10):1315-1323. doi:10.1038/modpathol.2015.93.

106. Wilkins BS, Radia D, Woodley C, Farhi SE, Keohane C, Harrison CN. Resolution of bone marrow fibrosis in a patient receiving JAK1/JAK2 inhibitor treatment with ruxolitinib. *Haematologica*. 2013;98(12):1872-1876. doi:10.3324/haematol.2013.095109.
107. Iurlo A, Gianelli U, Rapezzi D, et al. Imatinib and ruxolitinib association: First experience in two patients. *Haematologica*. 2014;99(6):e76-7. doi:10.3324/haematol.2013.102525.
108. Iurlo A, Cattaneo D, Boiocchi L, et al. Clinical and morphologic features in five post-polycythemic myelofibrosis patients treated with ruxolitinib. *Ann Hematol*. 2015;94(10):1749-1751. doi:10.1007/s00277-015-2429-5.
109. Jamieson C, Hasserjian R, Gotlib J, et al. Effect of treatment with a JAK2-selective inhibitor, fedratinib, on bone marrow fibrosis in patients with myelofibrosis. *J Transl Med*. 2015;13:294. doi:10.1186/s12967-015-0644-4.
110. Barosi G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: Diagnostic definition and prognostic classification for clinical studies and treatment guidelines. *J Clin Oncol*. 1999;17(9):2954-2970. doi:10.1200/JCO.1999.17.9.2954.
111. Ni H, Barosi G, Rondelli D, Hoffman R. Studies of the site and distribution of CD34+ cells in idiopathic myelofibrosis. *Am J Clin Pathol*. 2005;123(6):833-839. doi:10.1309/7A5J-U9KJ-K89V-QPH9.
112. Kröger N, Thiele J, Zander A, et al. Rapid regression of bone marrow fibrosis after dose-reduced allogeneic stem cell transplantation in patients with primary myelofibrosis. *Exp Hematol*. 2007;35(11):1719-1722. doi:10.1016/j.exphem.2007.08.022.
113. Thiele J, Kvasnicka HM, Dietrich H, et al. Dynamics of bone marrow changes in patients with chronic idiopathic myelofibrosis following allogeneic stem cell transplantation. *Histol Histopathol*. 2005;20(3):879-889. doi:10.14670/HH-20.879.
114. Rondelli D. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Haematologica*. 2008;93(10):1449-1450. doi:10.3324/haematol.13801.
115. Link H, Kolb HJ, Ebell W, et al. Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. Teil II: Indikationen zur Transplantation von hämatopoetischen Stammzellen nach myeloablativer Therapie. *Med Klin (Munich)*. 1997;92(9):534-545.
116. Guardiola P, Anderson JE, Bandini G, et al. Allogeneic stem cell transplantation for agnogenic myeloid metaplasia: A European Group for Blood and Marrow Transplantation, Société Française de Greffe de Moelle, Gruppo Italiano per il Trapianto del Midollo Osseo, and Fred Hutchinson Cancer Research Center Collaborative Study. *Blood*. 1999;93(9):2831-2838.
117. Devine SM, Hoffman R, Verma A, et al. Allogeneic blood cell transplantation following reduced-intensity conditioning is effective therapy for older patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*. 2002;99(6):2255-2258.
118. Tagger AY, Boux J, Wright JA. Hydroxy14Curea uptake by normal and transformed human cells: Evidence for a mechanism of passive diffusion. *Biochem Cell Biol*. 1987;65(11):925-929.
119. Nand S, Stock W, Godwin J, Fisher SG. Leukemogenic risk of hydroxyurea therapy in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Am J Hematol*. 1996;52(1):42-46. doi:10.1002/(SICI)1096-8652(199605)52:1<42::AID-AJH7>3.0.CO;2-6.
120. Aman MJ, Keller U, Derigs G, Mohamadzadeh M, Huber C, Peschel C. Regulation of cytokine expression by interferon-alpha in human bone marrow stromal cells: Inhibition of

- hematopoietic growth factors and induction of interleukin-1 receptor antagonist. *Blood*. 1994;84(12):4142-4150.
121. Koury MJ. Programmed cell death (apoptosis) in hematopoiesis. *Exp Hematol*. 1992;20(4):391-394.
 122. Peschel C, Aman MJ, Rudolf G, Aulitzky WE, Huber C. Regulation of the cytokine network by interferon: A potential mechanism of interferon in chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol*. 1993;30(3 Suppl 3):28-31.
 123. Dowding C, Gordon M, Guo AP, et al. Potential mechanisms of action of interferon-alpha in CML. *Leuk Lymphoma*. 1993;11 Suppl 1:185-191. doi:10.3109/10428199309047884.
 124. Galvani DW, Cawley JC. The effects of alpha interferon on human long-term bone marrow culture. *Leuk Res*. 1990;14(6):525-531.
 125. Shan B, Vazquez E, Lewis JA. Interferon selectively inhibits the expression of mitochondrial genes: A novel pathway for interferon-mediated responses. *EMBO J*. 1990;9(13):4307-4314.
 126. Fruchtmann SM. Treatment paradigms in the management of myeloproliferative disorders. *Semin Hematol*. 2004;41(2 Suppl 3):18-22.
 127. Schmidt HH, Neumeister P, Kainer F, Karpf EF, Linkesch W, Sill H. Treatment of essential thrombocythemia during pregnancy: Antiabortive effect of interferon-alpha? *Ann Hematol*. 1998;77(6):291-292.
 128. Ianotto J-C, Chauveau A, Boyer-Perrard F, et al. Benefits and pitfalls of pegylated interferon- α 2a therapy in patients with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis: A French Intergroup of Myeloproliferative neoplasms (FIM) study. *Haematologica*. 2018;103(3):438-446. doi:10.3324/haematol.2017.181297.
 129. Spencer CM, Brogden RN. Anagrelide. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in the treatment of thrombocythaemia. *Drugs*. 1994;47(5):809-822.
 130. Petrides PE. Anagrelide: A decade of clinical experience with its use for the treatment of primary thrombocythaemia. *Expert Opin Pharmacother*. 2004;5(8):1781-1798. doi:10.1517/14656566.5.8.1781.
 131. Petrides PE, Beykirch MK, Trapp OM. Anagrelide, a novel platelet lowering option in essential thrombocythaemia: Treatment experience in 48 patients in Germany. *Eur J Haematol*. 1998;61(2):71-76.
 132. Oertel MD. Anagrelide, a selective thrombocytopenic agent. *Am J Health Syst Pharm*. 1998;55(19):1979-1986.
 133. Tefferi A, Silverstein MN, Hoagland HC. Primary thrombocythemia. *Semin Oncol*. 1995;22(4):334-340.
 134. Tefferi A, Fonseca R, Pereira DL, Hoagland HC. A long-term retrospective study of young women with essential thrombocythemia. *Mayo Clin Proc*. 2001;76(1):22-28. doi:10.4065/76.1.22.
 135. Harrison C, Kiladjian J-J, Al-Ali HK, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2012;366(9):787-798. doi:10.1056/NEJMoa1110556.

136. Verstovsek S, Gotlib J, Mesa RA, et al. Long-term survival in patients treated with ruxolitinib for myelofibrosis: COMFORT-I and -II pooled analyses. *J Hematol Oncol.* 2017;10(1):156. doi:10.1186/s13045-017-0527-7.
137. Kvasnicka HM, Thiele J, Bueso-Ramos CE, et al. Long-term effects of ruxolitinib versus best available therapy on bone marrow fibrosis in patients with myelofibrosis. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):42. doi:10.1186/s13045-018-0585-5.
138. Jamshidi K, Swaim WR. Bone marrow biopsy with unaltered architecture: A new biopsy device. *J Lab Clin Med.* 1971;77(2):335-342.
139. Schaefer HE. Die histologische Bearbeitungstechnik von Beckenkammbiopsien auf der Basis von Entkalkung und Paraffineinbettung unter Berücksichtigung osteologischer und hämatologischer Fragestellungen. *Pathologe.* 1995;16(1):11-27.
140. Schaefer HE. How to fix, decalcify and stain paraffin embedded bone marrow biopsies. *Pathology of the Bone Marrow.*
141. Buss H, Caesar R, Eckhardt T, et al. *Pathologie: 1 Rechtsfragen in der Pathologie Einführung in die biotische Diagnostik Herz und Gefäßsystem Hämatologie Atmungsorgane.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1984. <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-97874-6>.
142. Schaefer HE. Zytologische Hämatopathologie unter besonderer Berücksichtigung histochemischer Methoden1. In: Bonk U, ed. *Aktuelle klinische Zytologie.* Vol. 38: S. Karger AG; 1990:196-260. *Contributions to Oncology.*
143. Bain BJ, Koch S. *Knochenmarkpathologie: Atlas und Lehrbuch ; mit 17 Tabellen.* Berlin: Blackwell Wiss.-Verl; 2000. Blackwell Wissenschaft.
144. Michiels JJ, Kvasnicka HM, Thiele J. *Myeloproliferative disorders: Current perspectives on diagnostic criteria, histopathology, and treatment in essential thrombocythemia, polycythemia rubra vera, and chronic idiopathic myelofibrosis.* Much, Germany: Verlag ME-Uwe Grunwald; 2005.
145. Thiele J, Kvasnicka HM, Diehl V. Standardization of bone marrow features--does it work in hematopathology for histological discrimination of different disease patterns? *Histol Histopathol.* 2005;20(2):633-644. doi:10.14670/HH-20.633.
146. Madelung AB, Bondo H, Stamp I, et al. World Health Organization-defined classification of myeloproliferative neoplasms: Morphological reproducibility and clinical correlations--the Danish experience. *Am J Hematol.* 2013;88(12):1012-1016. doi:10.1002/ajh.23554.
147. Madelung AB, Bondo H, Stamp I, et al. WHO classification 2008 of myeloproliferative neoplasms: A workshop learning effect--the Danish experience. *APMIS.* 2015;123(9):787-792. doi:10.1111/apm.12417.
148. HARTSOCK RJ, SMITH EB, PETTY CS. NORMAL VARIATIONS WITH AGING OF THE AMOUNT OF HEMATOPOIETIC TISSUE IN BONE MARROW FROM THE ANTERIOR ILIAC CREST. A STUDY MADE FROM 177 CASES OF SUDDEN DEATH EXAMINED BY NECROPSY. *Am J Clin Pathol.* 1965;43:326-331. doi:10.1093/ajcp/43.4.326.
149. Kamiunten A, Shide K, Kameda T, et al. Early/prefibrotic primary myelofibrosis in patients who were initially diagnosed with essential thrombocythemia. *Int J Hematol.* 2018;108(4):411-415. doi:10.1007/s12185-018-2495-2.
150. Edahiro Y, Araki M, Inano T, et al. Clinical and molecular features of patients with prefibrotic primary myelofibrosis previously diagnosed as having essential thrombocythemia in Japan. *Eur J Haematol.* 2019;102(6):516-520. doi:10.1111/ejh.13236.

151. Rumi E, Boveri E, Bellini M, et al. Clinical course and outcome of essential thrombocythemia and prefibrotic myelofibrosis according to the revised WHO 2016 diagnostic criteria. *Oncotarget*. 2017;8(60):101735-101744. doi:10.18632/oncotarget.21594.
152. Murphy S, Peterson P, Iland H, Laszlo J. Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: A final report on diagnostic criteria, survival, and leukemic transition by treatment. *Semin Hematol*. 1997;34(1):29-39.
153. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, et al. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: The ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. *Blood*. 2013;121(10):1720-1728. doi:10.1182/blood-2012-07-443770.
154. Buhr T, Hebeda K, Kaloutsi V, Porwit A, van der Walt J, Kreipe H. European Bone Marrow Working Group trial on reproducibility of World Health Organization criteria to discriminate essential thrombocythemia from prefibrotic primary myelofibrosis. *Haematologica*. 2012;97(3):360-365. doi:10.3324/haematol.2011.047811.
155. Koopmans SM, Bot FJ, Lam KH, van Marion AMW, Raeve H de, Hebeda KM. Reproducibility of histologic classification in nonfibrotic myeloproliferative neoplasia. *Am J Clin Pathol*. 2011;136(4):618-624. doi:10.1309/AJCP2UG9SGGWAHUA.
156. Brousseau M, Parot-Schinkel E, Moles M-P, Boyer F, Hunault M, Rousselet M-C. Practical application and clinical impact of the WHO histopathological criteria on bone marrow biopsy for the diagnosis of essential thrombocythemia versus prefibrotic primary myelofibrosis. *Histopathology*. 2010;56(6):758-767. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03545.x.
157. Wilkins BS, Erber WN, Bareford D, et al. Bone marrow pathology in essential thrombocythemia: Interobserver reliability and utility for identifying disease subtypes. *Blood*. 2008;111(1):60-70. doi:10.1182/blood-2007-05-091850.
158. Kreft A, Büche G, Ghalibafian M, Buhr T, Fischer T, Kirkpatrick CJ. The incidence of myelofibrosis in essential thrombocythaemia, polycythaemia vera and chronic idiopathic myelofibrosis: A retrospective evaluation of sequential bone marrow biopsies. *Acta Haematol*. 2005;113(2):137-143. doi:10.1159/000083452.
159. Gianelli U, Vener C, Raviele PR, et al. Essential thrombocythemia or chronic idiopathic myelofibrosis? A single-center study based on hematopoietic bone marrow histology. *Leuk Lymphoma*. 2006;47(9):1774-1781. doi:10.1080/10428190600678975.
160. Gianelli U, Iurlo A, Vener C, et al. The significance of bone marrow biopsy and JAK2V617F mutation in the differential diagnosis between the "early" prepolycythemic phase of polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(3):336-342. doi:10.1309/6BQ5K8LHVYAKUAF4.
161. Ejerblad E, Kvasnicka HM, Thiele J, et al. Diagnosis according to World Health Organization determines the long-term prognosis in patients with myeloproliferative neoplasms treated with anagrelide: Results of a prospective long-term follow-up. *Hematology*. 2013;18(1):8-13. doi:10.1179/1607845412Y.0000000023.

8 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Differentialdiagnostik der frühen primären Myelofibrose (präPMF) gemäß der neuen WHO-Klassifikation

in dem Dr. Senckenbergischen Institut für Pathologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. med. Hans Michael Kvasnicka ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht und die Ergebnisse der Arbeit wurden bisher nicht veröffentlicht.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)