

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt für Hämatologie, Onkologie und  
Tumorimmunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Bedeutung der Durchflusszytometrie im Kontext der Diagnostik des  
Multiplen Myeloms**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Kunz  
aus Wolfsburg

Datum der Promotion: 18.09.2020

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>8</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1 Erkrankungsbild Multiples Myelom .....	10
1.1.1 Epidemiologie .....	10
1.1.2 Klinisches Bild und Klassifikation .....	11
1.1.3 Klassifikationen .....	12
1.2 Diagnosestellung und Stadieneinteilung .....	13
1.2.1 Diagnosekriterien und Therapieindikation .....	13
1.2.2 Stadieneinteilung .....	16
1.2.3 Differenzialdiagnostische Abgrenzung zur monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz .....	17
1.3 Durchflusszytometrie als diagnostische Methode .....	18
1.3.1 Antigenkonstellationen bei der Diagnostik des Multiplen Myeloms .....	18
1.3.2 Diagnostisches Potential der Durchflusszytometrie - Differenzierung von MGUS und MM .....	19
1.4 Zielstellung der Arbeit .....	21
<b>2 Methodik</b> .....	<b>22</b>
2.1 Patientenkollektiv .....	22
2.2 Bewertung der Ergebnisse der diagnostischen Methoden .....	23
2.3 Datenanalyse .....	24
2.3.1 Kriterien der abschließenden Diagnose .....	24
2.3.2 Visualisierung der Ergebnisse und statistische Analysen.....	25
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>26</b>
3.1 Patientenkollektiv .....	26
3.2 Befunde der diagnostischen Methoden .....	26
3.2.1 Vergleich der histologischen und zytologischen Befunde.....	28

3.2.2	Vergleich der histologischen und durchflusszytometrischen Befunde .....	29
3.3	Vergleich der diagnostischen Methoden mit der abschließenden Diagnose .....	29
3.3.1	Vergleich der unterschiedlichen diagnostischen Methoden mit der abschließenden Diagnose „Multiples Myelom“ .....	30
3.3.2	Vergleich der unterschiedlichen diagnostischen Methoden mit der abschließenden Diagnose „MGUS“ .....	31
3.3.3	Vergleich der unterschiedlichen diagnostischen Methoden mit der abschließenden Diagnose „gesunde Personen“ .....	32
3.4	Sensitivität und Spezifität der diagnostischen Methoden .....	33
3.5	Differenzierte Auswertung der durchflusszytometrischen Befunde.....	35
3.5.1	Plasmazellanteil gesamt.....	35
3.5.2	Verteilung phänotypisch normaler Plasmazellen im Gesamtkollektiv .....	36
3.5.3	Geschlechterspezifische Verteilung normaler Plasmazellen .....	37
3.5.4	Altersspezifische Verteilung normaler Plasmazellen .....	38
3.5.5	Verteilung phänotypisch aberranter Plasmazellen.....	40
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>42</b>
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	42
4.2	Aussagekraft der Zytologie .....	43
4.3	Aussagekraft der Durchflusszytometrie im Vergleich zu den anderen Untersuchungsmodalitäten.....	48
4.4	Bedeutung des Anteils phänotypisch normaler Plasmazellen im Kontext der Diagnosestellung mittels Durchflusszytometrie .....	51
4.4.1	Vergleich der medianen Anteile phänotypisch normaler Plasmazellen in Bezug auf die Gesamtplasmazellmenge.....	51
4.4.2	Bedeutung des Anteils phänotypisch normaler Plasmazellen für die Differenzierung von MGUS und MM.....	53
4.5	Möglichkeiten der Diagnosestellung mittels Durchflusszytometrie anhand der Gesamtplasmazellmenge .....	56
4.6	Kritische Auseinandersetzung mit der eigenen Arbeit .....	58
4.7	Schlussfolgerungen .....	59
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>61</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>68</b>
	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>69</b>

**Danksagung.....70**

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersspezifische Inzidenz bösartiger Plasmazell-Neubildungen in Deutschland, 2005 bis 2009 <sup>6,7</sup> , Abbildung übernommen von <a href="http://www.onkopedia.com">www.onkopedia.com</a> .....	11
Abbildung 2: Verteilung der Myelomtypen <sup>13</sup> .....	13
Abbildung 3: Anteil der immunphänotypisch normalen Plasmazellen in Bezug auf die Gesamtplasmazellmenge bei MGUS- und MM-Patienten, Abbildung übernommen von Sezer et al. <sup>37</sup> .....	21
Abbildung 4: Patientenidentifikation und retrospektive Datenaufarbeitung.....	23
Abbildung 5: Gegenüberstellung der diagnostischen Methoden .....	27
Abbildung 6: Einteilung des Kollektivs mittels abschließender Diagnosestellung in absoluten Zahlen (n=104) .....	30
Abbildung 7: Befundbewertung der einzelnen diagnostischen Methoden in der Gruppe der mittels abschließender Diagnose gewerteten Myelompatienten, n=42 .....	30
Abbildung 8: Befundbewertung der einzelnen diagnostischen Methoden in der Gruppe der mittels abschließender Diagnose gewerteten MGUS-Patienten, n=39.....	31
Abbildung 9: Befundbewertung der einzelnen diagnostischen Methoden in der Gruppe der mittels abschließender Diagnose gewerteten gesunden Personen, n=23.....	32
Abbildung 10: Verteilung der relativen gesamt PZ-Menge in den Kollektiven .....	35
Abbildung 11: Verteilung von normalen PZ innerhalb der Kollektive.....	36
Abbildung 12: Geschlechtsspezifische Darstellung der nPZ-Verteilung innerhalb der jeweiligen Gruppen .....	37
Abbildung 13: nPZ-Verteilung der Patienten <55 Jahre.....	38
Abbildung 14: nPZ-Verteilung der Patienten ≥55 Jahre.....	39
Abbildung 15: Anteil der CD19-/ CD56+ PZ in Bezug auf die Gesamtplasmazellmenge innerhalb der jeweiligen Gruppe.....	40
Abbildung 16: Anteil der CD19+/ CD56+ PZ in Bezug auf die Gesamtplasmazellmenge innerhalb der jeweiligen Gruppe.....	41
Abbildung 17: Anteil der CD19-/ CD56- PZ in Bezug auf die Gesamtplasmazellmenge innerhalb der jeweiligen Gruppe.....	41

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Diagnosekriterien der International Myeloma Working Group für das symptomatische Multiple Myelom, das Smoldering Myelom und die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz <sup>17,19</sup> .....	15
Tabelle 2: „SLiM-CRAB-Kriterien“ der International Myeloma Working Group <sup>17</sup> .....	15
Tabelle 3: Stadieneinteilung nach Durie und Salmon <sup>24</sup> .....	16
Tabelle 4: Stadieneinteilung (International Staging Systems (ISS)) <sup>27</sup> .....	17
Tabelle 5: Liste der hilfreichsten Antigene zur Detektion aberranter Plasmazellen beim MM, 2008 vom EMN veröffentlicht <sup>16</sup> .....	19
Tabelle 6: Einteilung und Merkmale der Patienten in der Studie von Sezer et al. <sup>37</sup> .....	20
Tabelle 7: Geschlechtsspezifisches medianes Alter .....	26
Tabelle 8: Abweichungen und Übereinstimmungen von Histologie- und Zytologiebefunden ....	28
Tabelle 9: Abweichungen und Übereinstimmungen von Histologie- und Durchflusszytometriebefunden .....	29
Tabelle 10: Gegenüberstellung der Bewertung durch abschließende Diagnose und Histologie in absoluten Zahlen .....	33
Tabelle 11: Gegenüberstellung der Bewertung durch abschließende Diagnose und Zytologie in absoluten Zahlen .....	33
Tabelle 12: Gegenüberstellung der Bewertung durch abschließende Diagnose und Durchflusszytometrie in absoluten Zahlen .....	33
Tabelle 13: Sensitivität, Spezifität und prädiktive Vorhersagewerte der diagnostischen Methoden .....	34
Tabelle 14: Übersicht der Ergebnisse der Arbeitsgruppen in Bezug auf den PZ-Anteil der histologischen (Histo) und zytologischen (Zyto) Untersuchungen (in % der Fälle), sowie den medianen durch die jeweilige Methode bestimmten PZ-Anteil <sup>56-58,60,61</sup> .....	47
Tabelle 15: Vergleich der medianen PZ-Verteilung normaler und aberranter PZ des vorliegenden Kollektivs mit der medianen PZ-Verteilung bei Robillard et al. <sup>51</sup> .....	52
Tabelle 16: Übersicht über den nPZ-Anteil von MGUS- und MM-Patienten der einzelnen Arbeitsgruppen (in % der Fälle) <sup>37,50,68-70</sup> .....	55

## Abkürzungsverzeichnis

aPZ	aberrante Plasmazellen
BMPC	<i>bone marrow plasma cells</i>
CRAB	<i>Calcium, Renal impairment, Anemia, Bone disease</i>
CT	Computertomographie
DFZ	Durchflusszytometrie
DNS	Desoxyribunukleinsäure
EMN	Myeloma Working Network
FC	<i>flow cytometry/ flow cytometric immunophenotyping</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
gP	gesunde Personen
gPZ	Gesamtplasmazellen
HS	<i>healthy subjects</i>
Ig	Immunglobulin
ISS	International Staging System
KMP	Knochenmarkpunktion
KSO-Test	Kolmogoroff-Smirnov-Omnibustest
MM	Multipl. Myelom/ <i>Multiple Myeloma</i>
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz/ <i>monoklonal gammopathy of undetermined significance</i>
MRE	minimale Resterkrankung
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NPC	<i>normal plasma cells</i>
NpW	negativer prädiktiver Vorhersagewert
nPZ	normale Plasmazellen
ns	nicht signifikant
PET	Positronenemissionstomographie
POEMS	Polyneuropathie, Organomegalie, Endokrinopathie, monoklonale Gammopathie mit M-Gradient, <i>Skin</i>
PpW	positiver prädiktiver Vorhersagewert
PZ	Plasmazellen
R-ISS	<i>revised ISS</i>

SLiM	<i>Sixty, Light chain, MRI</i>
SM	Schwelendes Myelom/ <i>Smoldering Myeloma</i>
WHO	World Health Organization



## Zusammenfassung

**Einleitung:** Das Multiple Myelom (MM) nimmt mit 10% einen bedeutenden Anteil der malignen hämatologischen Systemerkrankungen ein. Während sowohl histologische als auch zytologische Untersuchungen routinemäßig zur Bestimmung der Plasmazellquantität bei der Diagnosestellung eines MM eingesetzt werden, hat die Durchflusszytometrie (DFZ) in der MM-Diagnostik noch keinen weitreichenden Einzug in die klinische Routine gehalten. Dennoch wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt, die das Potential der DFZ zur Diagnosestellung eines MM untersuchten. Eine klare Abgrenzung eines MM von seiner Vorstufe konnte lediglich in einer Studie gezeigt werden.

**Methodik:** Sämtliche Patienten, bei denen in den Jahren 2008 und 2009 an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie des Campus Charité Mitte unter der Verdachtsdiagnose eines MM eine Knochenmarkpunktion durchgeführt wurde, wurden retrospektiv hinsichtlich ihrer histologischen, zytologischen und durchflusszytometrischen Befunde evaluiert und deren Aussagekraft gegenübergestellt und kritisch diskutiert. Außerdem erfolgte die Einteilung des Kollektivs in MM- und MGUS-Patienten sowie gesunde Personen (gP) anhand aller zu Verfügung stehender Befunde („abschließende Diagnose“).

**Ergebnisse:** Es wurden insgesamt 104 Personen in die Analyse eingeschlossen. Unter Berücksichtigung der abschließenden Diagnose wurden somit 42 MM- und 39 MGUS-Patienten sowie 23 gesunde Personen betrachtet. Die histologischen und zytologischen Befunde zeigten eine Übereinstimmungsrate von 60%, während die histologischen und durchflusszytometrischen Befunde in 80% der Fälle übereinstimmten. Der durchflusszytometrisch ermittelte mediane Gesamtplasmazellanteil an allen gemessenen Knochenmarkzellen betrug 5% (MM) und lag somit signifikant über dem von je 0,8% (MGUS und gP). Der Anteil phänotypisch normaler Plasmazellen (nPZ) an allen Plasmazellen zeigte sich mit im Median 2% (MM), 34% (MGUS) und 57% (gP) in den verschiedenen Gruppen signifikant divergent. Es zeigten 14% der MM- und 82% der MGUS-Patienten einen nPZ-Anteil  $\geq 20\%$ .

**Schlussfolgerungen:** Im Kontext der Diagnosestellung stellt sich die zytologische Untersuchung des Knochenmarkes als weniger verlässliche Methode im Vergleich zu histologischen Untersuchung dar. Die durchflusszytometrische Analyse des Anteils normaler Plasmazellen zeigt dahingegen deutlich verlässlichere Befunde als die Zytologie. Allerdings ist eine klare Differenzierung zwischen MGUS und MM anhand eines absoluten Grenzwertes von 20% normalen Plasmazellen nicht immer möglich.

## Abstract

**Background:** Multiple Myeloma (MM) accounts for 10% of all malignant hematological disorders. While the estimation of plasma cell infiltration in bone marrow biopsy as well as in bone marrow aspirates each represents a standard method in diagnosis of MM, flow cytometric immunophenotyping (FC) has not been implemented in clinical routine diagnostics yet. Nevertheless, numerous studies have been conducted which analyze the value of FC in regard to diagnosing MM. However, only one study was able to differentiate precisely between MM and its precursor disease using FC.

**Methods:** Patients that had undergone bone marrow biopsy in the Department of Hematology, Oncology and Tumor Immunology at Charité – University Medicine Berlin, Campus Mitte in 2008 and 2009 were retrospectively analyzed in terms of their histological, cytological and flow cytometric results. A “final diagnosis” was made by contemplating all diagnostic results available dividing the collective into three different groups.

**Results:** A total of 104 people were included in this study. Thus, 42 MM- and 39 MGUS-patients as well as 23 healthy subject (HS) were analyzed. In 60% of observed cases the histological and cytological results matched, whereas this could be seen in 80% of the cases when comparing the histological and flow cytometrical results. The median percentage of total bone marrow plasma cells (BMPC) identified by flow cytometry in MM patients differed significantly from that of MGUS patients and HS (5% vs. 0.8%). The median amount of phenotypically normal plasma cells (NPC) composed of 2% (MM), 34% (MGUS) and 57% (HS) showed significant differences between the three groups. 14% of MM-patients together with 82% of MGUS-patients showed 20% or more NPC.

**Conclusion:** Regarding the diagnosis of Multiple Myeloma the cytological results appear to be less reliable compared to the histological analysis of bone marrow plasma cells. Flow cytometric evaluation of the bone marrow, however, shows more solid results than those obtained by cytological testing. Nevertheless, a consistent differentiation between MGUS and MM by using a cutoff ratio of 20% normal to all bone marrow plasma cells could not be reached.

# 1 Einleitung

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne Erkrankung, die durch die monoklonale Proliferation von Plasmazellen charakterisiert ist und gemäß der WHO-Klassifikation zur Gruppe der reifzelligen B-Zell-Lymphome zählt. Neben der monoklonalen Proliferation der Plasmazellen (PZ) im Knochenmark mit konsekutiver Verdrängung der physiologischen Hämatopoese kann sie sowohl zu einer Anhäufung von monoklonalen, als Paraprotein bezeichneten, dysfunktionalen Immunglobulinen als auch dem Verlust der Polyklonalität dieser führen.<sup>1</sup>

In der vorliegenden Arbeit soll das diagnostische Potential der Durchflusszytometrie, die bislang nicht obligat in der Routinediagnostik und Therapiekontrolle des MM durchgeführt wird, untersucht und der aktuelle Wissensstand im Kontext der Ergebnisse diskutiert werden. Im Folgenden werden zunächst die Erkrankung sowie deren Diagnostik und Stadieneinteilung einleitend beschrieben. Hieraus wird anschließend die explizite Fragestellung der vorliegenden Arbeit abgeleitet.

## 1.1 Erkrankungsbild Multiples Myelom

Im Folgenden wird das Erkrankungsbild des Multiplen Myeloms im Hinblick auf Inzidenz, klinische Manifestation und Subtypen beleuchtet.

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Multiple Myelom, auch als Morbus Kahler bezeichnet, ist eine insgesamt seltene Erkrankung, die lediglich etwa 1% aller Krebserkrankungen ausmacht, aber mit 10% einen bedeutenden Anteil der hämatologischen Systemerkrankungen darstellt.<sup>2-4</sup> Wie Daten der Gesellschaft des epidemiologischen Krebsregisters in Deutschland zeigen, erkrankten in den Jahren 2011 bzw. 2012 6500 bzw. 6340 Menschen in Deutschland, wobei Männer im Verhältnis von 5:4 häufiger betroffen sind als Frauen.<sup>5</sup> Die Inzidenz des Multiplen Myeloms steigt mit zunehmendem Lebensalter deutlich an, sodass Männer durchschnittlich im Alter von 72 und Frauen im Alter von 73 Jahren diagnostiziert werden.

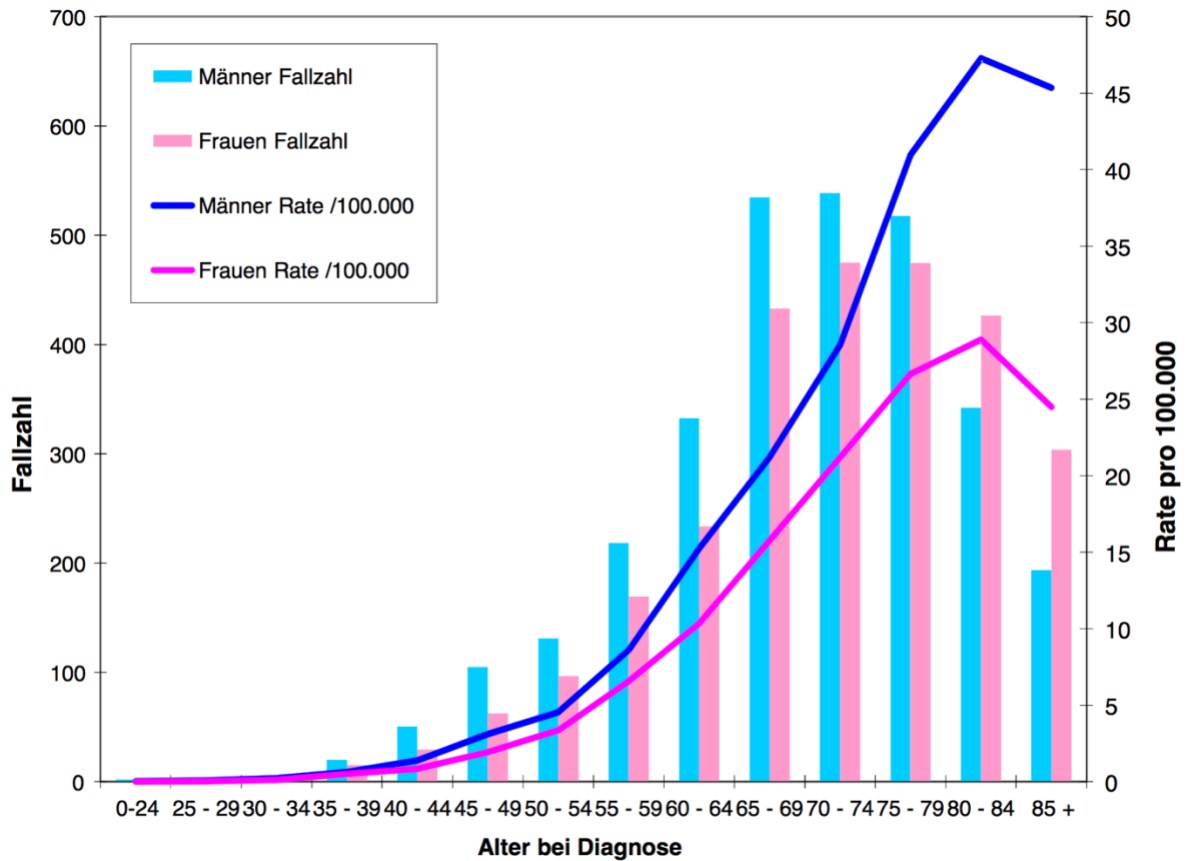


Abbildung 1: Altersspezifische Inzidenz bösartiger Plasmazell-Neubildungen in Deutschland, 2005 bis 2009<sup>6,7</sup>,  
Abbildung übernommen von [www.onkopedia.com](http://www.onkopedia.com)

### 1.1.2 Klinisches Bild und Klassifikation

Das MM präsentiert sich initial meist durch unspezifische Symptome, sodass oft mehrere Monate oder sogar Jahre vom Auftreten erster Symptome bis zur Diagnosestellung vergehen.<sup>8</sup>

Häufige Erstsymptome der Erkrankung sind Fatigue, rezidivierende Infektionen und Knochenschmerzen.<sup>9</sup> Diese sind zum einen Folge der sukzessiven Verdrängung der Hämatopoese durch die das Knochenmark infiltrierenden Plasmazellen. Zum anderen sind sie das Resultat eines veränderten Knochenstoffwechsels.<sup>1</sup> Häufig ist bei Patienten mit einem MM die Fatigue durch eine normozytäre, normochrome Anämie bedingt, welche vor allem auf die Verdrängung der Erythropoese aus dem Knochenmark zurückzuführen ist. 73% der Patienten weisen bereits bei Diagnosestellung einen Hämoglobinwert unter 12g/dL auf. Im Verlauf der Erkrankung steigt dieser Anteil auf bis zu 97%.<sup>9</sup> Des Weiteren manifestiert sich die hämatopoetische Insuffizienz in Thrombo- und Leukopenien sowie in Form eines Immundefizienzsyndroms mit wiederkehrenden Infektionen, welche zunächst auf die Verdrängung gesunder Plasmazellen (sekundärer

Immunglobulinmangel) und später auch auf die Chemo- und Strahlentherapie zurückzuführen sind.<sup>1</sup>

Neben ihrer verdrängenden Wirkung verschieben die monoklonalen Plasmazellen auf molekularer Ebene Zytokin-vermittelt das Gleichgewicht von Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität zugunsten des Knochenabbaus.<sup>10</sup> Das Resultat der erhöhten Osteoklastenaktivität zeigt sich in den für das MM charakteristischen Osteolysen, welche vor allem am Schädelknochen, Thorax und Becken sowie an den Wirbelkörpern und den proximalen Extremitäten zu finden sind und oftmals zu pathologischen Frakturen führen.<sup>9</sup> In diesem Kontext können Wirbelkörperfrakturen neben Schmerzen auch radikuläre Syndrome und neurologische Ausfallerscheinungen hervorrufen.

In Folge des erhöhten Knochenabbaus kommt es bei 20 bis 30% der Patienten zu einer Hyperkalzämie<sup>1</sup>, welche zu gastrointestinalen Beschwerden wie Übelkeit, Erbrechen und Obstipation, aber auch zu Herzrhythmusstörungen, Bewusstseinsstörungen akutem Nierenversagen und unter Umständen tödlichen Komplikationen führen kann.<sup>4</sup>

Weiterhin können erhöhte Retentionsparameter sowie schäumender Urin Hinweis auf eine durch die Paraproteine hervorgerufene Niereninsuffizienz und Proteinurie sein. Akkumulieren die monoklonalen Immunglobuline in den Lysosomen der Tubuluszellen und schädigen hierdurch dieselben, spricht man von einer Cast-Nephropathie.<sup>11</sup>

Selten tritt eine systemische Leichtketten(AL)-Amyloidose (häufig mit kardialer und/ oder renaler Beteiligung), ein POEMS-Syndrom (Polyneuropathie, Organomegalie, Endokrinopathie, monoklonale Gammopathie mit M-Gradient, Haut (=Skin)-Veränderungen) oder ein Hyperviskositätssyndrom aufgrund des massiven Anfalls von Paraprotein mit möglichen Mikrozykulationsstörungen auf.<sup>4</sup>

### 1.1.3 Klassifikationen

Die Klassifikation des Multiplen Myeloms erfolgt anhand des Typs der gebildeten monoklonalen Immunglobulins und der dazugehörigen Immunglobulin-Leichtkette. Wie auch bei den physiologischen Immunglobulinen wird hierbei zwischen IgG, IgA, IgD und selten IgM unterschieden. Des Weiteren zeigen >95% aller Patienten mit neu diagnostiziertem MM eine abnormale Konzentration freier Leichtketten (Kappa oder Lambda) im Serum. Sind diese Leichtketten auch im Urin nachweisbar, bezeichnet man sie als Bence-Jones-Proteine. Treten ausschließlich freie Leichtketten, also inkomplette Immunglobuline, auf, liegt ein Leichtkettenmyelom vor. Selten besteht eine asekretorische Form der Erkrankung, bei der keine

monoklonalen Proteine im Serum nachgewiesen werden können.<sup>1,12</sup> Abbildung 2 zeigt eine Übersicht über die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Myelomtypen.<sup>13</sup>

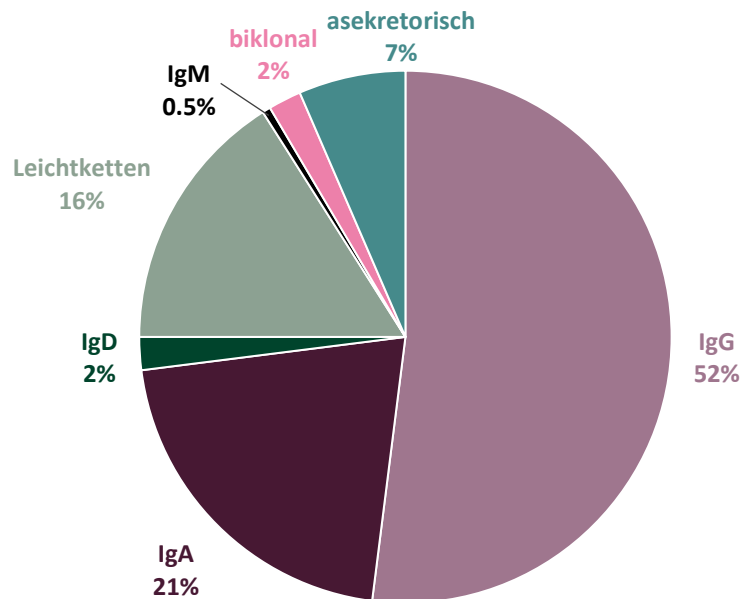


Abbildung 2: Verteilung der Myelomtypen<sup>13</sup>

## 1.2 Diagnosestellung und Stadieneinteilung

Nachstehend ist ein Überblick über die Kriterien zur Diagnosestellung des MM sowie die hierfür verwendeten diagnostischen Mittel gegeben. Des Weiteren erfolgt ein kurzer Überblick über die gängigen Stadieneinteilungen des MM und deren Aussagekraft.

### 1.2.1 Diagnosekriterien und Therapieindikation

Die Diagnosestellung des Multiplen Myeloms basiert neben der laborchemischen Analyse von Blut und Urin auf der Untersuchung des Knochenmarkes und des Skelettsystems. Der Nachweis des durch die Plasmazellen gebildeten monoklonalen Proteins erfolgt durch Serumeiweißelektrophorese, Serumimmunfixation oder den Nachweis freier Leichtketten mittels Immunassay. Im Urin kann eine Monoklonalität durch eine Eiweißelektrophorese oder eine Urinimmunfixation (typischerweise im 24-Stunden-Sammelurin) nachgewiesen werden.<sup>14</sup>

Die Beurteilung des Knochenmarkes erfolgt durch zytologische sowie histologische Untersuchungen. Während die zeitlich nach der Punktion schnell zur Verfügung stehende zytologische Auswertung des Aspirats erste Schlüsse bezüglich der Plasmazellquantität und-

morphologie zulässt, erfolgt die letztendliche Diagnosestellung zumeist anhand der histologischen Evaluation einer zusätzlich zu entnehmenden Knochenmarksbiopsie. Hierbei ist vor allem ein erhöhter (monoklonaler) Plasmazellanteil von Bedeutung. Obwohl die Aufarbeitung der Stanzbiopsie einige Tage in Anspruch nimmt, gilt diese als Goldstandard im Kontext der Knochenmarkdiagnostik des MM, da im Aspirat zum einen die absolute Anzahl an Plasmazellen oftmals unterschätzt und zum anderen keine eindeutige Aussage bezüglich einer möglichen Malignität derselben getätigt werden kann.<sup>1,15</sup> Da die Histologie und Zytologie vor allem Auskunft bezüglich der Quantität und nur eingeschränkt bezüglich der Qualität der Plasmazellen geben, eignen sich hierfür zwei weitere Verfahren. Neben der aufwändigen zytogenetischen Untersuchung, welche sowohl numerische als auch strukturelle Chromosomenaberrationen, die teilweise auch prognoserelevant sind, darstellt, ermöglicht vor allem die Durchflusszytometrie (DFZ) eine schnelle und kostengünstige Analyse der Plasmazellqualität.<sup>1,16</sup> Dieses Verfahren sowie seine Möglichkeiten und Relevanz für den klinischen Alltag wird im Abschnitt 1.3 genauer erörtert.

Der Nachweis von monoklonalem Protein im Serum oder Urin ist jedoch nicht mit der Diagnose eines Multiplen Myeloms gleichzusetzen, sondern entspricht zunächst einer monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) (siehe auch Abschnitt 1.2.3). Zur Diagnosestellung eines Multiplen Myeloms ist der Nachweis von monoklonalem Protein im Serum oder Urin nicht obligat, während ein Anteil monoklonaler Plasmazellen im Knochenmark von mehr als 10% zwingend notwendig ist. Weiterhin muss bei der Diagnosestellung eines Multiplen Myeloms zwischen einem therapiebedürftigen Myelom, welches durch bereits bestehende oder zu erwartende Endorganschäden definiert ist, und einem nicht therapiebedürftigen, sogenannten Schwelenden Myelom (*Smoldering Myeloma*) (SM), differenziert werden.<sup>17</sup> Dieses weist zwar wie auch ein Multiples Myelom einen monoklonalen Plasmazellanteil im Knochenmark von >10% auf (Tabelle 1), zeigt jedoch keine Endorganschäden und bedarf engmaschiger klinischer, laborchemischer und radiologischer Verlaufskontrollen.<sup>17,18</sup>

Endorganschäden werden in den „CRAB-Kriterien“ zusammengefasst und umfassen eine Hyperkalziämie (*Calcium*), eine Niereninsuffizienz (*Renal impairment*), eine Anämie (*Anemia*) sowie eine Knochenbeteiligung (*Bone disease*) (Tabelle 1).<sup>19</sup> Die Evaluation der Skelettbeteiligung erfolgt in diesem Kontext mittels Bildgebung in Form einer Röntgen-, CT-, PET-CT- oder MRT-Aufnahme.<sup>20</sup> Tabelle 1 zeigt die Kriterien zur Differenzierung zwischen MGUS, SM und MM.

Tabelle 1: Diagnosekriterien der International Myeloma Working Group für das symptomatische Multiple Myelom, das Smoldering Myelom und die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz<sup>17,19</sup>

	MGUS	SM	MM
Prozentualer Anteil der monoklonalen PZ im Knochenmark	<10%	≥10-60%	≥10%
	und	und/oder	und/oder
Monoklonales Protein im Serum	<30g/L im Serum	>30g/L im Serum	nachweisbar
	und	und/oder	und/oder
Monoklonales Protein im Urin	<500mg/ 24h	≥500mg/ 24h	nachweisbar
	und	und	und
Organschäden nach CRAB-Kriterien	keine	keine	Organschäden liegen vor

C = Kalziumkonzentration im Serum >10,5 mg/dL

R = Niereninsuffizienz (Kreatinin >2 mg/dL)

A = Anämie (Hämoglobinkonzentration <10g/dL oder 2 g/dL unter dem Normwert)

B = Knochenerkrankung (Osteolysen und/ oder Osteoporosen)

Zum anderen ist die Indikation zur Therapie ebenfalls gegeben, wenn noch keine Endorganschäden im Sinne der „CRAB-Kriterien“ vorliegen, aber Biomarker nachgewiesen werden können, die mit einer Progressionswahrscheinlichkeit von 80% für Endorganschäden in den nächsten zwei Jahren assoziiert sind. Diese Merkmale werden in den so genannten „SLiM CRAB-Kriterien“ zusammengefasst und stellen eine Erweiterung der initialen „CRAB-Kriterien“ dar. Tabelle 2 zeigt die hierfür hinzugezogenen Biomarker.<sup>17,21-23</sup>

Tabelle 2: „SLiM-CRAB-Kriterien“ der International Myeloma Working Group<sup>17</sup>

	Biomarker
S ( <i>Sixty</i> = sechzig)	Plasmazellinfiltration im Knochenmark ≥60%
Li ( <i>Light chain</i> = Leichtkette)	Verhältnis der erhöhten freien Leichtkette zur nicht betroffenen Leichtkette ≥100 und Konzentration der erhöhten freien Leichtkette ≥100mg/L
M ( <i>MRI</i> = MRT)	mehr als eine fokale Läsion ≥5mm im Ganzkörper-MRT



### 1.2.2 Stadieneinteilung

Ist die Diagnose eines Myeloms gestellt, kann eine Stadieneinteilung mittels unterschiedlicher Einteilungssysteme erfolgen. 1975 wurde die Stadieneinteilung nach Durie und Salmon (Tabelle 3) für das MM eingeführt. Anhand Parameter, welche auf die Endorganschäden (Anämie, Hyperkalziämie, Knochenläsionen und Niereninsuffizienz) hinweisen und der Quantität des Paraproteins ist eine grobe Einschätzung der Tumormasse möglich.<sup>24</sup>

Tabelle 3: Stadieneinteilung nach Durie und Salmon<sup>24</sup>

	Stadium I (alle Kriterien erfüllt)	Stadium II	Stadium III (min. 1 Kriterium erfüllt)
Hämoglobin	> 10 g/dL	weder Stadium I noch III	< 8,5 g/dL
Serumkalzium	normal	normal oder erhöht	erhöht
Skelett im Röntgen	normal oder nur eine solitäre Osteolyse	weder Stadium I noch III	fortgeschrittene osteolytische Läsionen
Paraprotein	IgG < 50 g/L (Serum) IgA < 30 g/L (Serum) Bence-Jones-Protein < 4 g/24h (Urin)	weder Stadium I noch III	IgG > 70 g/L (Serum) IgA > 50 g/L (Serum) Bence-Jones-Protein > 12g/24h (Urin)
Nierenfunktion	Zusatzbezeichnung A: Serum-Kreatinin ≤ 2 mg/dL Zusatzbezeichnung B: Serum-Kreatinin > 2 mg/dL		

Die initial intendierte Prognoseabschätzung mittels der Einteilung nach Durie und Salmon zeigte sich im weiteren Verlauf jedoch als unzureichend. Obwohl diese in der klinischen Routine gelegentlich noch gebräuchlich ist, wird sie zunehmend zugunsten der 2005 eingeführten Stadieneinteilung nach dem International Staging System (ISS) (Tabelle 4) verlassen. Dieses System wurde von der International Myeloma Working Group unter Einbeziehung von 10.750 bis dahin unbehandelten Myelompatienten aus weltweit 17 Instituten entwickelt und lässt eine genauere Einschätzung der Prognose zu. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Klassifikation nach Salmon und Durie liegt darin, dass die Einteilung nur mithilfe von zwei Laborparametern und die Stadieneinteilung unabhängig von subjektiven Einflüssen, wie der Befundung des radiologischen Materials, erfolgt.<sup>25</sup> Eine Erweiterung dieses Staging Systems (R-ISS (*revised* ISS)) beinhaltet außerdem den Serumspiegel der Lactatdehydrogenase sowie die durch die FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) als Hochrisikomutationen eingestuft chromosomalen Aberrationen. Das R-ISS ermöglicht eine Abschätzung des progressionsfreien sowie Gesamtüberlebens.<sup>26</sup>

Tabelle 4: Stadieneinteilung (International Staging Systems (ISS))<sup>27</sup>

	Kriterien	Serumkonzentration	Medianes Überleben (Monate)
Stadium I	Niedriges $\beta$ 2-M	$\beta$ 2-M < 3,5 mg/L Albumin $\geq$ 3,5 g/dL	62
Stadium II	Weder Stadium I noch III	$\beta$ 2-M < 3,5 mg/L Albumin < 3,5 g/dL oder $\beta$ 2-M = 3,5mg/L bis < 5,5 mg/dL	44
Stadium III	Hohes $\beta$ 2-M	$\beta$ 2-M $\geq$ 5,5 mg/L	29

### 1.2.3 Differenzialdiagnostische Abgrenzung zur monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz

Vom MM ist die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz abzugrenzen, die selbst keinen Krankheitswert besitzt, jedoch die Präkanzerose des MM darstellt. Diese Plasmazeldyskrasie tritt im Gegensatz zum MM wesentlich öfter auf. So tritt sie in der Altersgruppe der Personen über 70 Jahren mit einer Prävalenz von 5,3% und einer Inzidenz von 3% 500-mal bis 1000-mal häufiger auf als das MM.<sup>1,28</sup>

Wie bereits im Abschnitt 1.2.1 einleitend erörtert, stellt die Abgrenzung zwischen MGUS und MM einer Herausforderung dar. Entscheidend für eine Differenzierung ist zum einen der Anteil monoklonaler Plasmazellen im Knochenmark, welcher bei der MGUS per Definition geringer ist als beim MM (Tabelle 1). Zum anderen fehlen die durch die Erkrankung verursachten Endorganschäden („CRAB“ und „SLiM-CRAB“ negativ), sodass Patienten mit MGUS oftmals beschwerdefrei sind.<sup>19</sup> Allerdings kann eine MGUS mit Symptomen, wie zum Beispiel einer peripheren Neuropathie, Vaskulitiden, hämolytischen Anämien oder Hautausschlägen einhergehen.<sup>29,30</sup> Weitere Untersuchungen zeigen außerdem ein gehäuftes Auftreten einer Thrombophlebitis sowie von Infektionen mit Mykobakterien bei allgemein erhöhtem Infektionsrisiko.<sup>31,32</sup>

Obwohl die klassischen „SLiM-CRAB-Kriterien“ bei diesen Patienten nicht erfüllt sind, bedarf es in Abhängigkeit von der Erkrankungssituation und Symptomlast einer individuellen Entscheidung, ob eine Therapieindikation zur Behandlung analog der Therapie des Multiplen Myeloms gegeben ist.<sup>30</sup>

Unabhängig davon besteht ein jährliches Risiko von etwa 1%, dass die MGUS zu einem MM oder einer verwandten Erkrankung voranschreitet.<sup>28</sup> Je höher der Anteil des Paraproteins ist, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit einer solchen Progression. So entwickeln 50% der MGUS-Patienten mit einem Paraproteingehalt von über 25 g/L innerhalb von 20 Jahren ein MM.<sup>28</sup> Patienten mit einem Paraproteingehalt unter 5 g/L zeigen dagegen nur eine Progressionswahrscheinlichkeit von 15% im selben Zeitraum.<sup>28</sup> Darüber hinaus ist sowohl das Vorliegen einer IgM-MGUS als auch ein abnormaler Quotient der freien Kappa- und Lambda-Leichtketten im Serum mit einer erhöhten Progressionswahrscheinlichkeit assoziiert.<sup>28,33,34</sup> Hieraus resultiert die Notwendigkeit einer kontinuierlichen Überwachung unterschiedlichen Ausmaßes der Patienten, bei denen eine MGUS diagnostiziert wurde.<sup>19,35</sup> So sollten Patienten mit einem niedrigen Risiko einer Progression der MGUS zu einem MM (Serum M-Protein <1,5g/dl, IgG-Typ und normaler Quotient der freien Leichtketten) lediglich körperliche Untersuchungen erhalten. Bei Hochrisikopatienten hingegen sollte zusätzlich regelmäßig Labordiagnostik erfolgen.<sup>36</sup>

### **1.3 Durchflusszytometrie als diagnostische Methode**

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, welches mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern die Antigenexpression von Zellen analysiert und somit die Identifizierung, Quantifizierung und Charakterisierung bestimmter Zellpopulationen ermöglicht. Dieses Prinzip der Immunphänotypisierung beruht auf der Emission optischer Signale seitens der antikörpermarkierten Zellen, wenn diese einzeln einen Laserstrahl passieren. Beim MM können bestimmte Antigenexpressionsmuster sowohl bei der Diagnostik als auch bei der Therapiekontrolle, insbesondere bei der quantitativen Überwachung einer minimalen Resterkrankung (MRE), eine Rolle spielen.<sup>1,37-40</sup> Auch wenn diese bislang oftmals nicht flächendeckend in der klinischen Routinediagnostik eingesetzt werden, wurden in zahlreichen Studien die Antigenbeschaffenheit normaler sowie monoklonaler Plasmazellen untersucht.<sup>16,40-52</sup>

#### **1.3.1 Antigenkonstellationen bei der Diagnostik des Multiplen Myeloms**

Plasmazellen können anhand ihrer Expression von CD38 und CD138 identifiziert werden.<sup>16,45</sup> Allerdings ist mit dieser Identifikation keine Aussage über die Dignität der Plasmazellen möglich, sodass weitere Antigene zur Charakterisierung verwendet werden müssen.<sup>16</sup> Hierzu eignen sich vor allem die Antigene CD19, CD56 und CD45. Während ein normaler Plasmazellphänotyp zumeist CD19+/ CD56-/ CD45+ aufweist<sup>41-43,45,46,49,51,52</sup>, sind CD19-/ CD56+/ CD45- oder

schwach-CD45-positive Plasmazellen als aberrant definiert.<sup>40,43-48,50,52</sup> Tabelle 5 zeigt die 2008 in den Leitlinien des „Myeloma Working Networks“ (EMN) veröffentlichten Antigenexpressionsprofile normaler und aberranter Plasmazellen, welche aktuell den Standard der Immunphänotypisierung von Plasmazellen beschreiben.<sup>16</sup>

Tabelle 5: Liste der hilfreichsten Antigene zur Detektion aberranter Plasmazellen beim MM, 2008 vom EMN veröffentlicht<sup>16</sup>

Antigen	normales Expressionsprofil (Prozentsatz der Expression auf normalen Plasmazellen)	abnormales Expressionsprofil	MM-Fälle mit abnormaler Expression	Notwendigkeit der Diagnose und Kontrolle
CD19	positiv (>70%)	negativ	95%	essentiell
CD56	negativ (<15%)	stark positiv	75%	essentiell
CD117	negativ (0%)	positiv	30%	empfohlen
CD20	negativ (0%)	positiv	30%	empfohlen
CD28	negativ/ schwach (<15%)	stark positiv	15-45%	empfohlen
CD27	stark positiv (100%)	schwach oder negativ	40-50%	empfohlen
CD81	positiv (100%)	schwach oder negativ	noch nicht veröffentlicht	vorgeschlagen
CD200	schwach positiv	stark positiv	noch nicht veröffentlicht	vorgeschlagen

### 1.3.2 Diagnostisches Potential der Durchflusszytometrie - Differenzierung von MGUS und MM

Durch die erweiterten Möglichkeiten der Plasmazellcharakterisierung kann die Durchflusszytometrie eine wichtige Rolle in der Diagnostik des MM spielen. In einer 2001 veröffentlichten Studie zeigten Sezer et al., dass mithilfe einer durchflusszytometrischen Bestimmung des Anteils normaler und aberranter Plasmazellen an der Gesamtplasmazellmenge eine Differenzierung zwischen MGUS und MM möglich ist.<sup>37</sup> Im Rahmen dieser Studie untersuchten Sezer et al. eine Gruppe von 17 MGUS- sowie insgesamt 66 MM-Patienten, welche anhand damals üblichen Diagnosekriterien von Durie und Salmon als solche definiert wurden.<sup>24,53</sup> Die Myelompatienten wurden weiterhin in zwei Untergruppen unterteilt: 13 Patienten (Gruppe A) zeigten eine Plasmazellinfiltration von 10-30% im Knochenmark, einen niedrigen Paraproteingehalt von  $\leq 3,5$  g/dL (IgG) oder  $\leq 2$  g/dL (IgA) sowie keine osteolytischen Läsionen im konventionellen Röntgen, während 53 Patienten (Gruppe B) mindestens ein Major-Kriterium

nach Durie und Salmon<sup>1</sup> erfüllten. Patienten mit MGUS wurden in einer separaten Gruppe (C) zusammengefasst (Tabelle 1). Außerdem wurde das Knochenmark von neun gesunden Personen durchflusszytometrisch analysiert.

Tabelle 6: Einteilung und Merkmale der Patienten in der Studie von Sezer et al.<sup>37</sup>

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C
Anzahl der Patienten	13	53	17
Diagnose	MM	MM	MGUS
Kriterien zur Gruppenzuordnung	ausschließlich Minor-Kriterien <sup>2</sup> und keine Osteolysen im konventionellen Röntgen	mindestens ein Major-Kriterium, nicht näher erläutert	

Zur Abgrenzung von normalen zu aberranten Plasmazellen untersuchten Sezer et al. die jeweilige Expression von CD19 und CD56. Die Plasmazellen der neun gesunden Probanden zeigten durchgängig einen CD19+/ CD56- Phänotyp. Bei den MM-Patienten wiesen 75% (Gruppe A) bzw. 80% der aberranten Plasmazellen (Gruppe B) ein CD19-/ CD56+ Expressionsmuster auf, während 25% (Gruppe A) bzw. 20% (Gruppe B) einen CD19-/ CD56- Phänotyp aufwiesen. In Gruppe A konnten in 61% und in Gruppe B in 72% der Fälle keine normalen CD19+/ CD56- Plasmazellen nachgewiesen werden. Dagegen fand sich bei allen MGUS-Patienten (Gruppe C) eine Population normaler Plasmazellen (CD19+/ CD56- Phänotyp), wobei der Anteil normaler Plasmazellen zwischen 20% und 95% (Median 60%) variierte. Während somit alle MGUS-Patienten einen Anteil normaler Plasmazellen  $\geq 20\%$  zeigten, wiesen alle MM-Patienten einen normalen Plasmazellanteil von  $< 20\%$  auf. Hieraus wurde gefolgert, dass anhand der Bestimmung des Anteils phänotypisch normaler Plasmazellen mittels einer 20%-Grenze eine sichere Differenzierung zwischen MM und MGUS möglich sei (Abbildung 3).

<sup>1</sup> Major-Kriterien: Vorliegen eines Plasmozytoms; eine Plasmazellinfiltration des Knochenmarkes  $> 30\%$ ; ein Paraproteingehalt von  $> 3,5$  g/dL (IgG) oder  $> 2$  g/dL (IgA); eine Leichtkettenausscheidung  $> 1$  g in 24 Stunden

<sup>2</sup> Minor-Kriterien: eine Plasmazellinfiltration von 10-30% im Knochenmark; ein Paraproteingehalt von  $\leq 3,5$  g/dL (IgG) oder  $\leq 2$  g/dL (IgA); Vorliegen von Osteolysen; Hypoglobulinämie der normalen Immunglobuline: IgM  $< 500$  mg/L, IgA  $< 1$  g/L, IgG  $< 6$  g/L

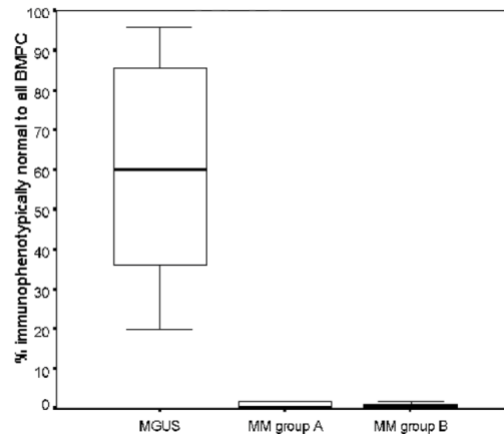


Abbildung 3: Anteil der immunphänotypisch normalen Plasmazellen in Bezug auf die Gesamtplasmazellmenge bei MGUS- und MM-Patienten, Abbildung übernommen von Sezer et al.<sup>37</sup>

Weiterhin untersuchten Sezer et al. die Anzahl von aberranten Plasmazellen im peripheren Blut, den Anteil der Plasmazellen im Knochenmark in S-Phase sowie deren DNS-Gehalt. Es zeigte sich jedoch, dass nur die oben beschriebene Bestimmung normaler Plasmazellen im Verhältnis zur Gesamtplasmazellmenge im Knochenmark eine MGUS zuverlässig von einem MM, auch in frühem Stadium (Gruppe A), differenzieren konnte.<sup>37</sup>

#### 1.4 Zielstellung der Arbeit

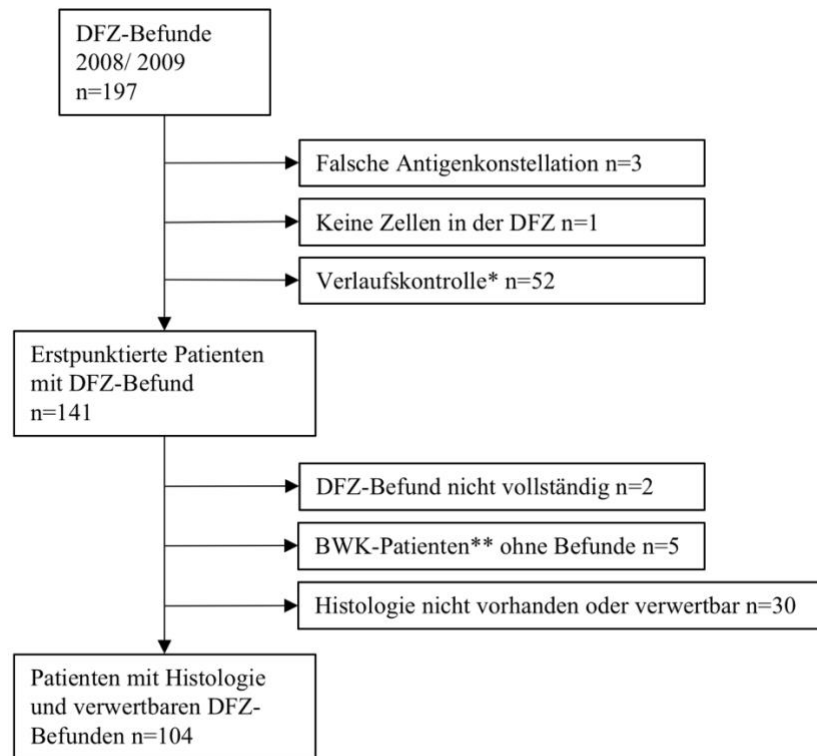
Im Rahmen der Diagnostik des Multiplen Myeloms stehen verschiedene Methoden (Histologie, Zytologie, Durchflusszytometrie) der Plasmazellquantifizierung und -charakterisierung zur Verfügung. Ziel dieser retrospektiven Untersuchung ist es, die einzelnen diagnostischen Methoden zu vergleichen und hinsichtlich ihrer Aussagekraft zu bewerten. Des Weiteren soll insbesondere die Durchflusszytometrie, welche eine häufig zum Einsatz kommende Methode der Plasmazellcharakterisierung ist, im Hinblick auf die klare Abgrenzbarkeit von Erkrankten, Personen mit der Präkanzerose eines Myeloms sowie Gesunden untersucht werden.

## 2 Methodik

### 2.1 Patientenkollektiv

Aus allen elektronisch archivierten durchflusszytometrischen Befunden wurden mithilfe der SAP®-Datenbank (SAP SE, Walldorf, Deutschland) alle Patienten identifiziert, die in den Jahren 2008 und 2009 an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie des Campus Mitte der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter der Verdachtsdiagnose eines Multiplen Myeloms oder zu dessen Ausschluss knochenmarkpunktiert wurden. Dieses Kollektiv umfasste zunächst 141 Patienten.

Die durchflusszytometrischen Befunde dieser Patienten wurden tabellarisch aufbereitet und anschließend um die in der SAP-Datenbank hinterlegten histologischen, laborchemischen und radiologischen Befunde sowie die elektronisch archivierten Zytologiebefunde ergänzt. Ebenfalls wurde die Datenbank der onkologischen Fachambulanz (TURBOMED® CompuGroup Medical Deutschland AG, Koblenz, Deutschland) genutzt, um die Laborparameter zu vervollständigen. Im Falle inkongruenter oder fehlender Daten wurde eine Vervollständigung ggf. durch Auswertung der vorliegenden Arztbriefe oder Anforderung archivierter Akten aus dem Zentralarchiv der Charité vorgenommen. War diese nicht möglich wurden die Patienten aus der Analyse ausgeschlossen. Es wurden ausschließlich Patienten betrachtet, die erstmalig unter der Verdachtsdiagnose eines Multiple Myeloms knochenmarkpunktiert wurden. Verlaufskontrollen wurden nicht berücksichtigt. Außerdem erfolgte der Ausschluss der Patienten, welche fehlerhafte und unvollständige durchflusszytometrische Befunde aufwiesen sowie solcher, die auf eine andere als die im Abschnitt 2.2 genannte Antigenkonstellation untersucht worden sind. Weiterhin wurden Patienten, deren histologisches Untersuchungsergebnis nicht auffindbar war ausgeschlossen. Von den 141 identifizierten konnte bei 104 Patienten eine suffiziente Datengrundlage erhoben und diese somit in die weiteren Analysen eingeschlossen werden. Im Flussdiagramm in Abbildung 4 wird der Prozess der Patientenidentifikation und der Datenaufarbeitung zusammenfassend dargestellt.



\* Patienten, die mindestens eine Knochenmarkpunktion im Vorfeld erhalten haben

\*\* Patienten, die aus dem Bundeswehrkrankenhaus konsiliarisch an der Charité vorgestellt wurden

Abbildung 4: Patientenidentifikation und retrospektive Datenaufarbeitung

Für jeden der eingeschlossenen Patienten umfassen die akquirierten Daten neben allgemeinen Informationen, wie Alter bei Punktion, Geschlecht und Punktionsgrund den durchflusszytometrischen, den histologischen und den zytologischen Befund. Zusätzlich wurden die radiologischen Befunde bezüglich des Nachweises von Osteolysen ausgewertet. Es erfolgte die Dokumentation von Laborbefunden, insbesondere im Hinblick auf die Werte für Kalzium, Kreatinin, Hämoglobin sowie die mittels Elektrophorese und Immunfixation ermittelte Monoklonalität des Paraproteins in Serum und Urin.

## 2.2 Bewertung der Ergebnisse der diagnostischen Methoden

Die durchflusszytometrischen Befunde sind mit dem Gerät FACSCalibur™ der Firma BD Bioscience im Rahmen der klinischen Routine erhoben worden.

Der durchflusszytometrische Befund eines jeden Patienten lieferte Angaben zum relativen Anteil von Plasmazellen in Bezug auf die Gesamtzellmenge, der Anzahl der Plasmazellen im „Livegate“ und dem Anteil normaler (CD19+/ CD56-) sowie aberranter (CD19+/ CD65+, CD19-/ CD56+,



CD19/ CD56-) Plasmazellen. Die Interpretation des Befundes erfolgte mit der an der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie angewendeten Methode nach Sezer et al. definierten Grenze: Patienten mit einem Anteil von <20% normaler Plasmazellen am Gesamtplasmazellanteil wurden im durchflusszytometrischen Befund als Myelompatienten definiert.

Die histologische sowie zytologische Untersuchung der Patienten beinhalteten den prozentualen Anteil von Plasmazellen in der Knochenmarksbiopsie bzw. im Aspirat (soweit angegeben) und die jeweilige Bewertung des Befundes als MM, im Graubereich liegend oder als hämatologisch unauffällig. Hier wurden die von den Untersuchern formulierten Befunde als ausschlaggebend gewertet. Im Kontext der Auswertung der zytologischen Untersuchung konnten nur 99 der 104 Patienten berücksichtigt werden, da bei fünf Patienten kein Aspirat gewonnen werden konnte (Punctio sicca).

Die entsprechenden Daten der Patienten wurden anonymisiert und unter Zuhilfenahme des Tabellenkalkulationsprogramms Microsoft® Excel 2015 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) in tabellarischer Form zusammengefasst und anschließend analysiert.

## 2.3 Datenanalyse

### 2.3.1 Kriterien der abschließenden Diagnose

Nach Abschluss der Datenerhebung erfolgten zunächst eine Visualisierung der Befunde der unterschiedlichen diagnostischen Methoden mithilfe von Balkendiagrammen sowie ein Vergleich derselben. Die Patienten wurden unter Berücksichtigung aller zur Verfügung stehenden Befunde (exklusive zytologischer und durchflusszytometrischer Befunde) einer „abschließenden Diagnose“ analog der im Rahmen der Einleitung aufgeführten Diagnosekriterien zugeordnet. Hierbei wurden drei Diagnosegruppen definiert:

Patienten mit gesichertem MM, Patienten mit MGUS und Patienten ohne Hinweis auf ein MM oder eine MGUS (gesunde Personen = „gP“). Eine initial definierte Gruppe „*Smoldering Myeloma*“ wurde aufgrund fehlender Patienten mit entsprechenden Merkmalen ausgeschlossen.

Zusammengefasst wurden Patienten als Myelom-Patienten definiert, wenn der histologische Befund als behandlungsbedürftiges Myelom bewertet wurde, Monoklonalität im Serum oder im Urin nachgewiesen werden konnte sowie mindestens eines der CRAB-Kriterien<sup>3</sup> erfüllt war.

<sup>3</sup> Hämoglobin <14g/dL (männlich) bzw. <12g/dL (weiblich) UND Kalzium >2,65mmol/L ODER Kreatinin >1mg/dL (männlich) bzw. >0,9 (weiblich)

Patienten wurden als MGUS-Patienten definiert, wenn der histologische Befund kein Myelom nachweisen konnte, Monoklonalität im Serum oder Urin vorhanden war und kein CRAB-Kriterium erfüllt wurde. Als gesund wurden solche Personen definiert, die einen unauffälligen histologischen Befund bzw. keine Hinweise auf ein MM aufwiesen und eine unauffällige Immunfixation zeigten.

### **2.3.2 Visualisierung der Ergebnisse und statistische Analysen**

Die durchflusszytometrischen Befunde und die hieraus abgeleiteten Diagnosen wurden mit den definierten Patientengruppen („MM“, „MGUS“ und „gP“) verglichen. In diesem Kontext wurden die Anteile der Gesamtplasmazellmenge sowie der normalen und aberranten Plasmazellen im Gesamtkollektiv sowie geschlechts- und altersspezifisch gegenübergestellt und mithilfe von *Boxplots* betrachtet. Zusätzlich wurde bei nicht eindeutigen Verteilungen eine Signifikanzanalyse mittels MATLAB (MathWorks®, Natick, Massachusetts, USA) durchgeführt. Hierbei wurde der Kolmogoroff-Smirnov-Omnibustests (KSO-Test) verwendet, welcher unabhängige Stichproben auf jegliche Art von Verteilungsunterschieden testet. Der Test prüft die Nullhypothese, dass die Verteilung der Beobachtungen in zwei Stichproben aus der gleichen Gesamtheit stammt, gegen die Alternativhypothese, dass die Stichproben aus unterschiedlich verteilten Populationen stammen.<sup>54</sup> Bei allen durchgeführten Analysen wurde ein Signifikanzniveau  $\alpha$  von 5% angenommen.

### 3 Ergebnisse

Im Kontext der Datenauswertung wird im Folgenden zunächst das Patientenkollektiv beschrieben. Darauf folgend werden zum einen die Ergebnisse der einzelnen diagnostischen Methoden dargelegt und miteinander verglichen, zum anderen erfolgt eine Gegenüberstellung der Befunde der einzelnen diagnostischen Methoden mit der abschließenden Diagnosestellung (wie in Abschnitt 2.3 definiert). Anschließend wird die Verteilung von normalen und aberranten Plasmazellen im jeweiligen Kollektiv der MM-Patienten, MGUS-Patienten und der gesunden Patienten dargestellt.

#### 3.1 Patientenkollektiv

Es wurden 104 Patienten mit einer adäquaten Datengrundlage identifiziert, bei denen in den Jahren 2008 und 2009 in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt für Hämatologie und Onkologie am Campus Charité Mitte erstmalig unter der Verdachtsdiagnose eines Multiplen Myeloms oder zum Ausschluss desselben eine Knochenmarkpunktion (KMP) durchgeführt wurde.

Das mediane Alter bei der Punktion betrug 67 Jahre (Spannweite 25-87 Jahre). Die geschlechterspezifische Altersverteilung ist in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Geschlechtsspezifisches medianes Alter

Geschlecht	Anzahl	Alter bei KMP, Median (Spannweite) in Jahren
männlich	58	67,5 (25-87)
weiblich	46	66 (25-85)

#### 3.2 Befunde der diagnostischen Methoden

Im Folgenden werden zunächst die erhobenen zytologischen, histologischen und durchflusszytometrischen Befunde zusammenfassend dargestellt. Dabei werden diese bei Zytologie und Histologie in drei Kategorien gegliedert: MM+ umfasst die in der zytologischen oder histologischen Bewertung als an einem MM erkrankten Patienten, MM± diejenigen, die durch die jeweilige diagnostische Methode nicht zweifelsfrei als gesund oder krank eingeordnet werden konnten („Graubereich“) und MM- die Patienten, die durch die jeweilige Methode als nicht an einem MM erkrankt gewertet wurden. Bei der Bewertung der Ergebnisse der

Durchflusszytometrie anhand der von Sezer et al. definierten Kriterien ist nur die Einteilung in MM+ und MM- möglich.

Die Ergebnisse der Untersuchungsmethoden sind zusammenfassend in Abbildung 5 darstellt.

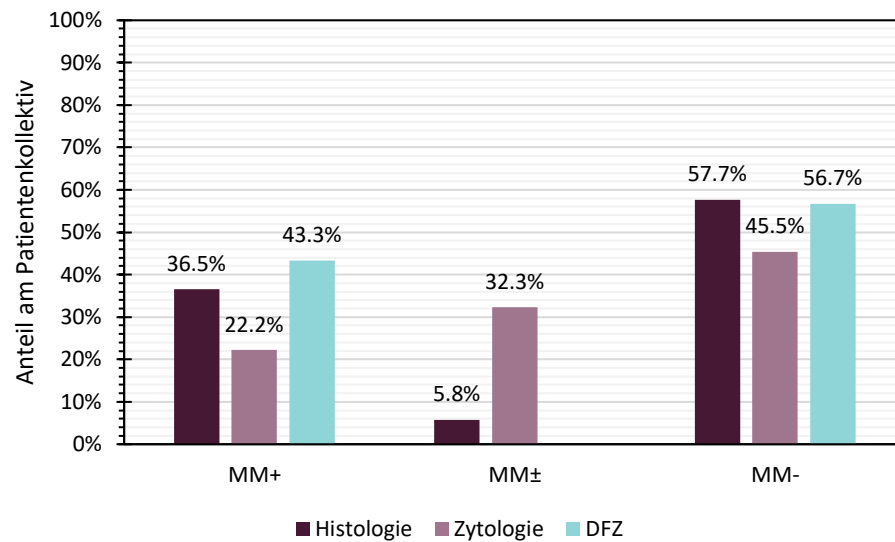


Abbildung 5: Gegenüberstellung der diagnostischen Methoden

Hierbei fand sich in der histologischen Untersuchung bei über der Hälfte der punktierten Patienten kein Hinweis auf ein Multiples Myelom im Knochenmark, während bei 6% anhand der histologischen Untersuchung keine eindeutige Zuordnung möglich war. Im Ergebnis der zytologischen Untersuchung war der Anteil der nicht sicher zuordenbaren Befunde mit 32% deutlich höher.

### 3.2.1 Vergleich der histologischen und zytologischen Befunde

In der vergleichenden Betrachtung der diagnostischen Methoden zeigten sich deutlich abweichende Befunde zwischen den einzelnen Untersuchungsmethoden. Es fand sich nur in 60% der 99 betrachteten Fälle eine Übereinstimmung der Ergebnisse von histologischer und zytologischer Untersuchung. Die fünf Patienten mit einer Punctio sicca wurden bei diesem Vergleich nicht berücksichtigt. Es fiel auf, dass fünf Patienten, bei denen sich in der zytologischen Untersuchung kein Hinweis auf ein Multiples Myelom fand, in der histologischen Untersuchung als an einem MM erkrankt eingeordnet wurden. Ebenfalls zeigte sich eine relevante Gruppe von 20 Patienten, die eine unauffällige histologische Untersuchung, aber in der zytologischen Untersuchung im Graubereich liegende Befunde aufwiesen. Tabelle 8 stellt die genaue Verteilung der Bewertung aus Histologie und Zytologie dar.

Tabelle 8: Abweichungen und Übereinstimmungen von Histologie- und Zytologiebefunden

Bewertung	histologische Bewertung	zytologische Bewertung	Anzahl Patienten (von 99)
übereinstimmend	MM+	MM+	21
	MM±	MM±	1
	MM-	MM-	37
abweichend	MM+	MM±	<b>11</b>
	MM+	MM-	<b>5</b>
	MM±	MM+	<b>1</b>
	MM±	MM-	<b>3</b>
	MM-	MM+	<b>0</b>
	MM-	MM±	<b>20</b>

### 3.2.2 Vergleich der histologischen und durchflusszytometrischen Befunde

Eine größere Übereinstimmung mit der histologischen Bewertung zeigten die durchflusszytometrischen Untersuchungsergebnisse. Es zeigte sich in 80% der 104 betrachteten Fälle eine Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden Methoden.

Wie in Tabelle 9 dargestellt, fand sich bei neun Patienten durchflusszytometrisch ein MM-Befund, während die Histologie diese als unauffällig einstufte. Umgekehrt wurden mittels Durchflusszytometrie sechs Patienten als gesund eingestuft, obwohl diese durch die histologische Untersuchung als MM eingeordnet wurden.

Tabelle 9: Abweichungen und Übereinstimmungen von Histologie- und Durchflusszytometriebefunden

Bewertung	histologische Bewertung	durchflusszytometrische Bewertung	Anzahl Patienten (von 104)
übereinstimmend	MM+	MM+	32
	MM±	MM±	0
	MM-	MM-	51
abweichend	MM+	MM±	<b>0</b>
	MM+	MM-	<b>6</b>
	MM±	MM+	<b>4</b>
	MM±	MM-	<b>2</b>
	MM-	MM+	<b>9</b>
	MM-	MM±	<b>0</b>

Insgesamt ergaben die durchflusszytometrischen und histologischen Befunde somit eine kongruentere Beurteilung der Befunde als die zytologischen und histologischen Befunde.

### 3.3 Vergleich der diagnostischen Methoden mit der abschließenden Diagnose

Von besonderem Interesse war der Vergleich der Methoden mit der Synopsis aller zur Verfügung stehender Befunde, die in der abschließenden Diagnose resultierten (siehe auch 2.3). Dieser ist im folgenden Abschnitt dargestellt.

Unter Berücksichtigung der vorhandenen Datengrundlage sowie dem weiteren klinischen Verlauf der Patienten wurden abschließend 42 der Gruppe Myelom (MM), 39 der Gruppe MGUS (MGUS) und 23 der Gruppe der gesunden Personen (gP) zugeordnet (Abbildung 6).

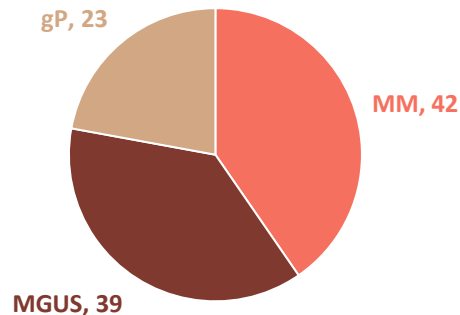


Abbildung 6: Einteilung des Kollektivs mittels abschließender Diagnosestellung in absoluten Zahlen (n=104)

### 3.3.1 Vergleich der unterschiedlichen diagnostischen Methoden mit der abschließenden Diagnose „Multiples Myelom“

Bei der Betrachtung der Gruppe der Myelompatienten (n=42) zeigte sich, dass in der histologischen Bewertung, die den Standard in der Beurteilung des Knochenmarks im Kontext der Diagnostik des Multiplen Myeloms darstellt, nur 90,5% der Befunde einen sicheren Myelomnachweis erbrachten, während die übrigen 9,5% (vier Patienten) der Befunde als Graubereich gewertet wurden (Abbildung 7). Diese vier histologisch als Graubereich bewerteten Patienten wurden durchflusszytometrisch als MM eingordnet.

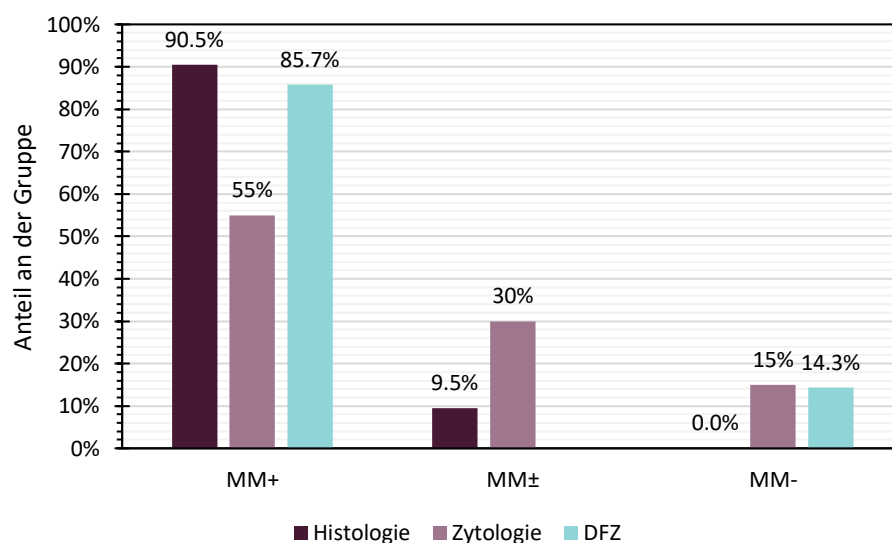


Abbildung 7: Befundbewertung der einzelnen diagnostischen Methoden in der Gruppe der mittels abschließender Diagnose gewerteten Myelompatienten, n=42

Weiterhin zeigte die Analyse der Myelompatienten, dass in der zytologischen Untersuchung lediglich 55% der Patienten als solche richtig zugeordnet wurden und 30% keinen eindeutigen und 15% sogar keinen pathologischen Befund zeigten. Im Gegensatz zur zytologischen Untersuchung wurden im Rahmen der Durchflusszytometrie bei etwa 86% der Patienten dieser Gruppe als MM-Patienten identifiziert, während ebenfalls, ähnlich der zytologischen Untersuchung, bei etwa 14% der Myelompatienten kein pathologischer durchflusszytometrischer Befund vorlag. Ein Graubereich der durchflusszytometrischen Befunde existierte, wie bereits in Abschnitt 3.2 erläutert, nicht.

### 3.3.2 Vergleich der unterschiedlichen diagnostischen Methoden mit der abschließenden Diagnose „MGUS“

In der Gruppe der im Rahmen der abschließenden Diagnose als MGUS eingeordneten Patienten (n=39) zeigte die Histologie bei keinem der Patienten einen Myelombefund. Nur etwa 5% der histologischen Befunde wurden einem Graubereich zugeordnet, während die restlichen 95% der Befunde als nicht erkrankt gewertet wurden. Ebenso ordnete die zytologische Untersuchung keinen der MGUS-Patienten als MM-erkrankt ein. Allerdings fällt auf, dass mittels Zytologie ein größerer Anteil von etwa 24% einem Graubereich zugeordnet wurde. Des Weiteren wird bei der Analyse der durchflusszytometrischen Befunde der MGUS-Patienten deutlich, dass ein Anteil von fast 18% als MM-Befund und der übrige Anteil von ca. 82% als nicht erkrankt gewertet wurde (Abbildung 8).

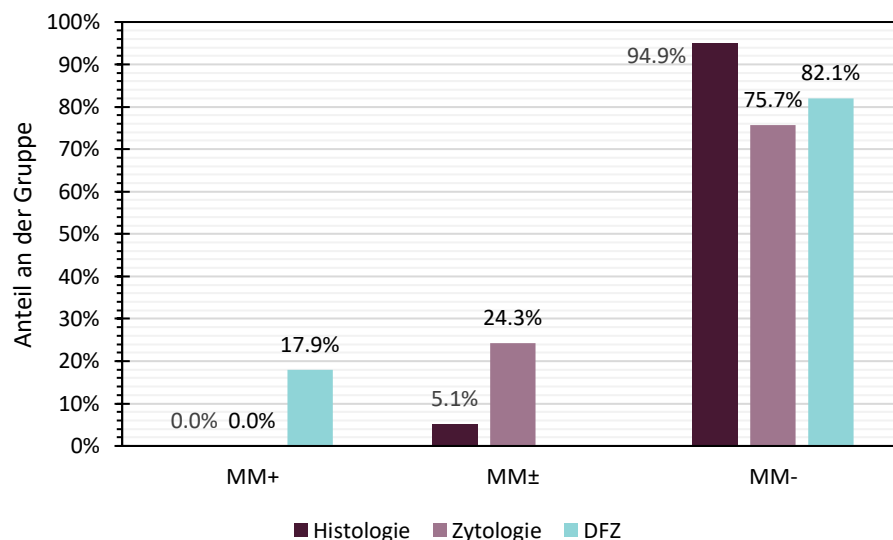


Abbildung 8: Befundbewertung der einzelnen diagnostischen Methoden in der Gruppe der mittels abschließender Diagnose gewerteten MGUS-Patienten, n=39



### 3.3.3 Vergleich der unterschiedlichen diagnostischen Methoden mit der abschließenden Diagnose „gesunde Personen“

Bei der Betrachtung jener Personen, die im Rahmen der abschließenden Diagnose als gesund eingeordnet (n=23) wurden, wick die zytologische Untersuchung deutlich von den Ergebnissen der anderen beiden Methoden ab. Während die histologische Untersuchung alle Gesunden als gesund bewertete, war dies nur bei der Hälfte der Gruppe in der zytologischen Untersuchung der Fall. Bei den übrigen Patienten erbrachte die zytologische Untersuchung einen unklaren Befund (Graubereich). Die Durchflusszytometrie ordnet im Vergleich zur Zytologie mit ca. 91% deutlich mehr Patienten als gesund ein. Wie auch in der Gruppe der MGUS-Patienten wertete die Durchflusszytometrie als einzige Methode einen Anteil der gesunden Personen als erkrankt, welcher in dieser Gruppe etwa 9% beträgt (Abbildung 9).

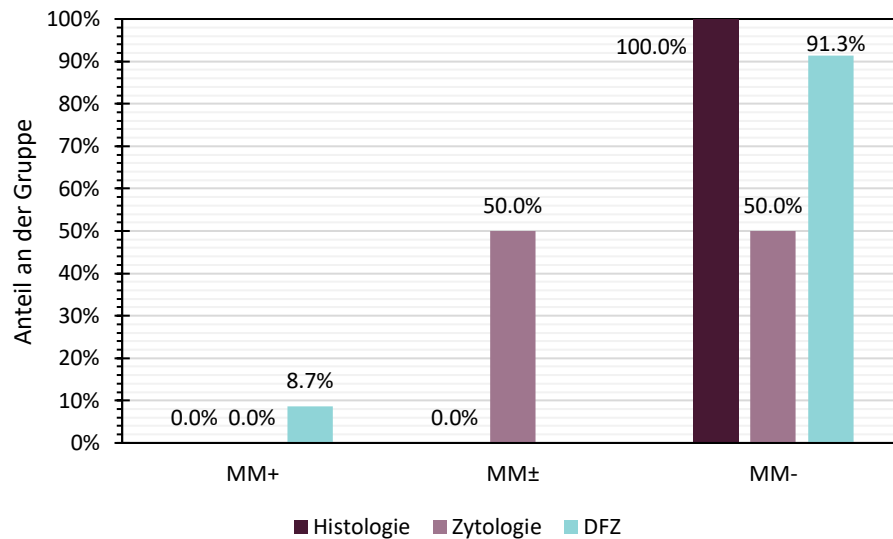


Abbildung 9: Befundbewertung der einzelnen diagnostischen Methoden in der Gruppe der mittels abschließender Diagnose gewerteten gesunden Personen, n=23

### 3.4 Sensitivität und Spezifität der diagnostischen Methoden

Im Weiteren wurde eine Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse für die einzelnen diagnostischen Methoden im Vergleich zur abschließenden Diagnose durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 bis Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 10: Gegenüberstellung der Bewertung durch abschließende Diagnose und Histologie in absoluten Zahlen

	abschließende Diagnose: MM	abschließende Diagnose: MGUS/ gP	Gesamt
Histologie: MM+	<b>38</b>	<b>0</b>	38
Histologie: MM-	<b>0</b>	<b>60</b>	60
Gesamt	38	60	98
Graubereich			<b>6</b>

Tabelle 11: Gegenüberstellung der Bewertung durch abschließende Diagnose und Zytologie in absoluten Zahlen

	abschließende Diagnose: MM	abschließende Diagnose: MGUS/gP	Gesamt
Zytologie: MM+	<b>22</b>	<b>0</b>	22
Zytologie: MM-	<b>6</b>	<b>39</b>	45
Gesamt	28	39	67
Graubereich			<b>32</b>

Tabelle 12: Gegenüberstellung der Bewertung durch abschließende Diagnose und Durchflusszytometrie in absoluten Zahlen

	abschließende Diagnose: MM	abschließende Diagnose: MGUS/gP	Gesamt
DFZ: MM+	<b>36</b>	<b>9</b>	45
DFZ: MM-	<b>6</b>	<b>53</b>	59
Gesamt	42	62	104
Graubereich			<b>0</b>

Die Patienten, die durch die jeweilige diagnostische Methode nicht einer definierten Gruppe zugewiesen werden konnten, sondern als Graubereich gewertet wurden, wurden für die Berechnung von Sensitivität und Spezifität nicht berücksichtigt, sind aber ebenfalls dargestellt.

Tabelle 13 zeigt die sich daraus errechneten Sensitivitäten bzw. Spezifitäten sowie die positiven prädiktiven Vorhersagewerte (PpW) und negativen prädiktiven Vorhersagewerte (NpW) der diagnostischen Methoden.

Tabelle 13: Sensitivität, Spezifität und prädiktive Vorhersagewerte der diagnostischen Methoden

	Histologie	Zytologie	DFZ
Sensitivität	<b>100%</b>	<b>78,57%</b>	<b>85,71%</b>
Spezifität	<b>100%</b>	<b>100%</b>	<b>85,48%</b>
PpW	100%	100%	80,00%
NpW	100%	86,67%	89,83%
Graubereich	<b>5,8%</b>	<b>32,3%</b>	<b>0%</b>

Die Histologie zeigt mit 100% die größte Sensitivität, gefolgt von der Durchflusszytometrie mit einer Sensitivität von ca. 86%, während die Zytologie mit ca. 79% die geringste Sensitivität aufweist. Im Hinblick auf die Spezifität weist auch hier die Histologie mit 100% das bestmögliche Ergebnis auf. Ebenfalls zeigt die Zytologie eine Spezifität von 100%, während die Durchflusszytometrie mit ca. 85% die geringste Spezifität erreicht. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Zytologie mit 32,3% einen sehr hohen Anteil an im Graubereich liegender Ergebnisse erbringt, welcher in der histologischen und durchflusszytometrischen Untersuchung deutlich geringer ist (5,8% bzw. 0%).

### 3.5 Differenzierte Auswertung der durchflusszytometrischen Befunde

Die im Rahmen der durchflusszytometrischen Untersuchung erhobenen Befunde wurden im folgenden Abschnitt in den mittels der abschließenden Diagnosestellung definierten drei Kollektiven (MM, MGUS, gP) weiter analysiert.

#### 3.5.1 Plasmazellanteil gesamt

Für die folgenden Analysen wurden alle mittels der Antigenexpression von CD 38 sowie CD 138 identifizierten Plasmazellen bezogen auf die Anzahl der Gesamtevents berücksichtigt. In diesem Zusammenhang zeigte sich in der im Rahmen der abschließenden Diagnose definierten MM-Gruppe ein medianer Plasmazellanteil von 5%. In der MGUS- sowie der gP-Gruppe ist der Anteil von Plasmazellen mit je 0,8% im Median signifikant geringer. Außerdem wiesen alle MGUS-Patienten und alle bis auf eine gesunde Person einen Gesamtplasmazell (gPZ)-Anteil von  $\leq 3\%$  auf. Die genaue Verteilung der Gesamtplasmazellen in den einzelnen Kollektiven sowie eine vergrößerte Ansicht der Gruppen MGUS und gP ist in Abbildung 10 aufgezeigt. Obwohl die Gesunden geringfügig mehr Plasmazellen als die MGUS-Patienten aufwiesen, war dieser Unterschied im KSO-Test nicht signifikant ( $p=0,4448$ ; bei  $\alpha=0,05$ ).

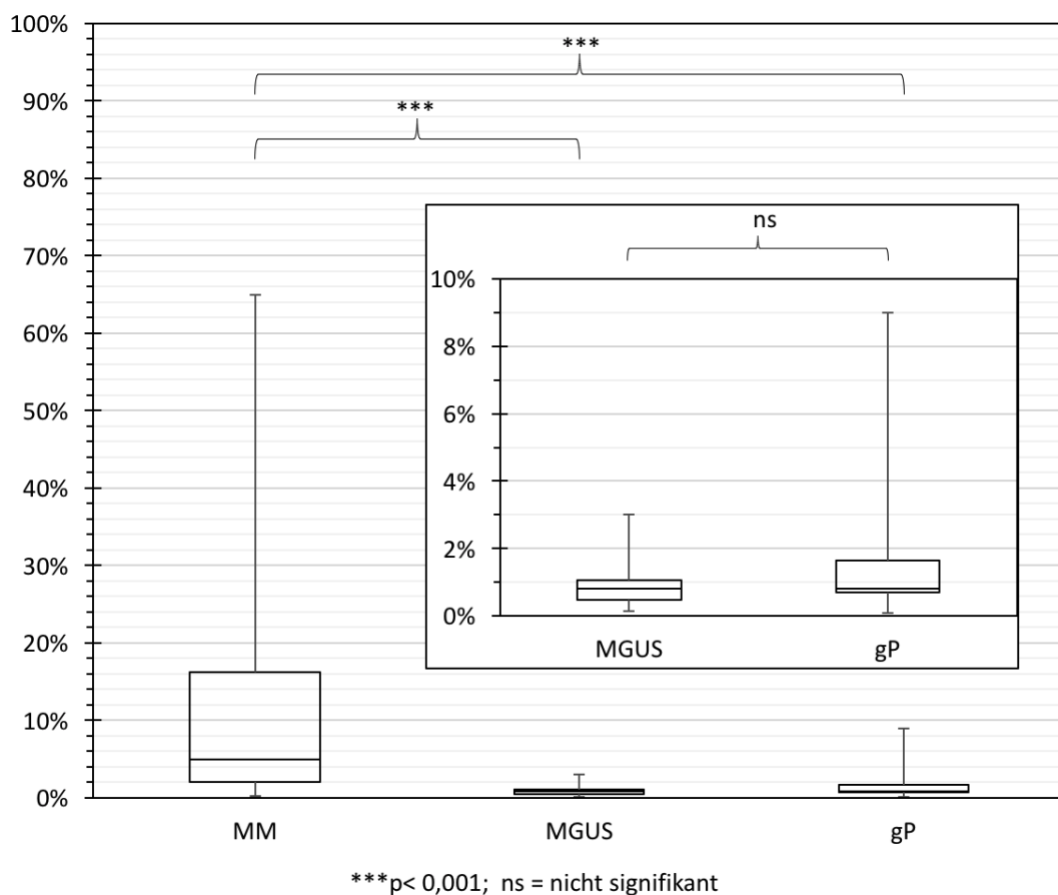


Abbildung 10: Verteilung der relativen gesamt PZ-Menge in den Kollektiven

### 3.5.2 Verteilung phänotypisch normaler Plasmazellen im Gesamtkollektiv

In der Analyse der CD19-positiven und CD56-negativen und somit phänotypisch normalen Plasmazellen (nPZ) in den einzelnen Gruppen zeigten sich deutliche Unterschiede (Abbildung 11).

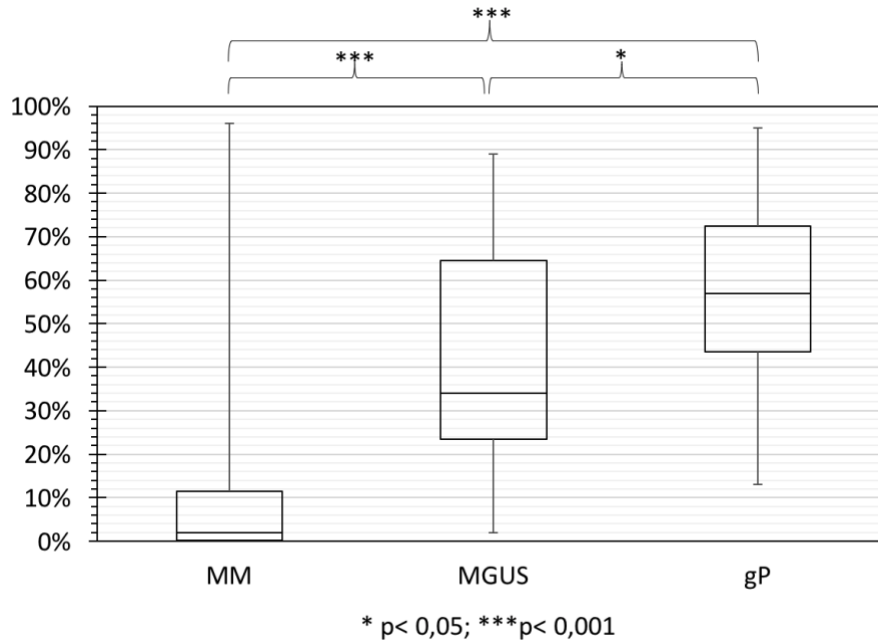


Abbildung 11: Verteilung von normalen PZ innerhalb der Kollektive

Besonders auffällig war hierbei die geringe Menge von lediglich im Median 2% nPz bei den MM-Patienten. Hingegen lag in der MGUS- und gP-Gruppe ein medianer nPZ-Anteil von 34% bzw. 57% vor. Eine Gegenüberstellung der nPZ-Verteilungen der MM- und der MGUS-Patienten zeigte, dass sich die zentralen Tendenzen unterschieden. Die statistische Prüfung mittels KSO-Test bestätigte einen signifikanten Unterschied zwischen den nPZ-Verteilung der beiden Gruppen ( $p=1,6153e-10$ ; bei  $\alpha=0,05$ ).

Im Vergleich zwischen den Gruppen MGUS und gP war die nPZ-Verteilung ähnlicher, jedoch zeigte sich auch hier ein signifikanter Unterschied der nPZ-Verteilungen zwischen MGUS- und gesunden Patienten ( $p=0,0172$ ; bei  $\alpha=0,05$ ).

In der Betrachtung der nPZ-Verteilung mittels der durch Sezer et al. definierten nPZ-Grenze von 20%, zeigte sich, dass 14% der MM-Patienten nPZ-Anteil oberhalb dieser Grenze aufwiesen. In der MGUS-Gruppe lag der Anteil von Patienten mit  $\geq 20\%$  nPZ mit 82% deutlich über dem der MM-Patienten sowie unter dem der gP-Gruppe. Hier wiesen 91% der Patienten einen nPZ-Anteil von  $\geq 20\%$  auf.

### 3.5.3 Geschlechterspezifische Verteilung normaler Plasmazellen

Bei Betrachtung der Verteilung der normalen Plasmazellen in den einzelnen Gruppen selektiert nach Geschlecht zeigte sich, dass vor allem in der Gruppe der Gesunden und der Myelompatienten eine scheinbar geschlechterabhängige nPZ-Verteilungen vorliegt.

So sind in der Gruppe der männlichen MM-Patienten im Vergleich zu den weiblichen MM-Patientinnen vereinzelt besonders große nPZ-Anteile zu finden. Des Weiteren zeigen die weiblichen gesunden Personen insgesamt einen kleineren Anteil normaler Plasmazellen als die gesunden Männer (Abbildung 12).

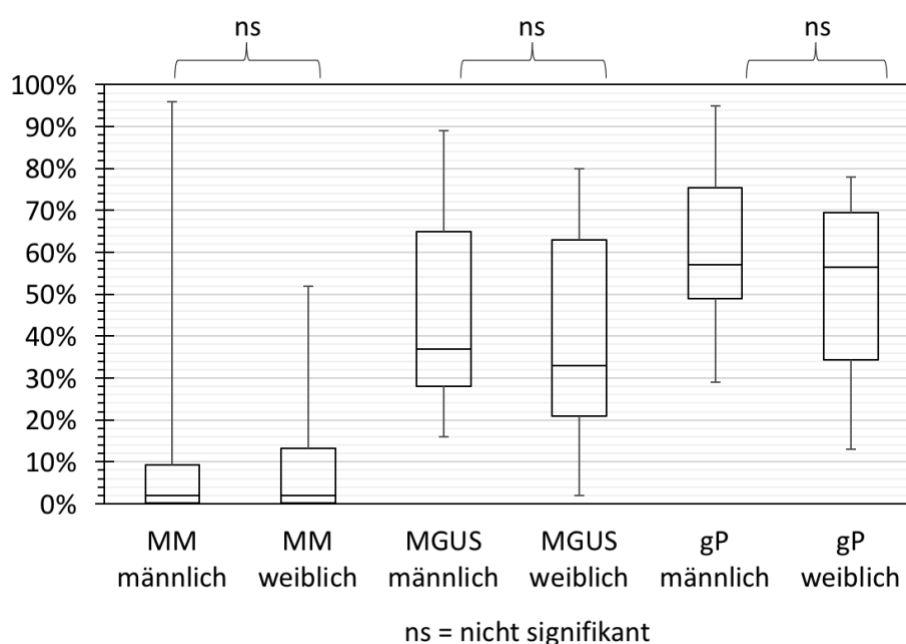


Abbildung 12: Geschlechtsspezifische Darstellung der nPZ-Verteilung innerhalb der jeweiligen Gruppen

Nach der statistischen Prüfung mittels KSO-Test sind diese Beobachtungen jedoch als eher zufällig zu werten (MM:  $p=0,9465$ ; gP:  $p=0,6513$ ; MGUS:  $p=0,3819$ ; bei  $\alpha=0,05$ ).

Im Vergleich zu den Ergebnissen von Sezer et al. zeigten lediglich die gesunden Männer eine Übereinstimmung mit denselben (nPZ-Anteil  $\geq 20\%$ ). So fand sich bei allen gesunden Männer ein nPZ-Anteil  $\geq 20\%$ . In allen anderen Gruppen konnten die Beobachtungen von Sezer et al. nicht bestätigt werden. Nur bei 75% der gesunden Frauen lag der nPZ-Anteil im hiesigen Kollektiv bei einer nPZ-Grenze von  $\geq 20\%$ . In der MGUS-Gruppe zeigten 86% der Männer und 78% der Frauen einen nPZ-Anteil von  $\geq 20\%$ . Im Kollektiv der MM-Patienten wiesen 18% der Männer und 10% der Frauen einen solchen nPZ-Anteil auf.

### 3.5.4 Altersspezifische Verteilung normaler Plasmazellen

In einer weiteren Analyse wurde die Verteilung normaler Plasmazellen in den jeweiligen Kohorten in zwei verschiedenen Altersgruppen betrachtet. Die Gruppe der Patienten im Alter von 55 Jahren oder älter umfasste 84 Patienten, während 20 Patienten im Alter von unter 55 Jahren betrachtet wurden.

In der Gruppe der unter 55-jährigen Patienten konnte bei den MGUS-Patienten sowie den gesunden Personen eine Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Sezer et al. erzielt werden (Abbildung 13).

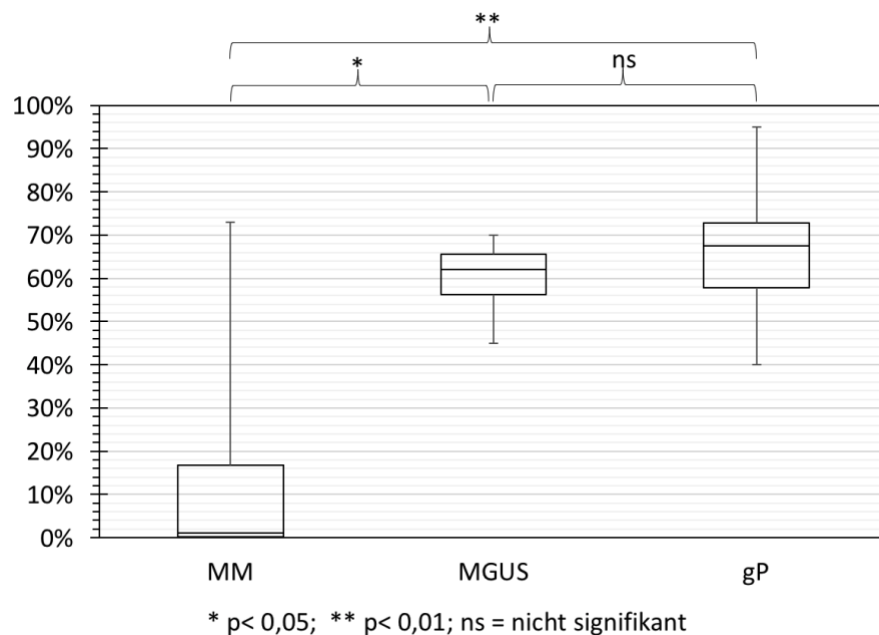


Abbildung 13: nPZ-Verteilung der Patienten <55 Jahre

Während Sezer et al einen nPZ-Anteil von  $\geq 20\%$  in diesen Gruppen beschreiben, wiesen im vorliegenden Kollektiv alle MGUS-Patienten und alle gesunden Personen einen nPZ-Anteil von sogar  $\geq 40\%$  auf. Die Befunde der MM-Patienten wichen teilweise von den Ergebnissen von Sezer et al. ab, da zwei MM-Patienten einen nPZ-Anteil  $\geq 20\%$  zeigten.

Bei Patienten, die 55 Jahre und älter waren, zeigte sich eine andere Verteilung der normalen Plasmazellen (Abbildung 14).

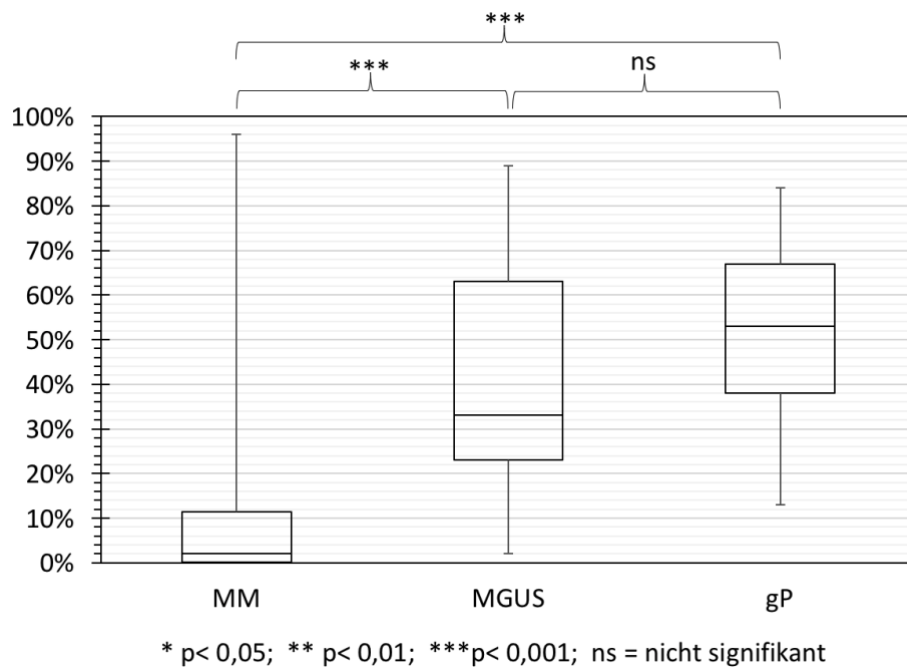


Abbildung 14: nPZ-Verteilung der Patienten  $\geq 55$  Jahre

Hier wiesen 80% der MGUS- und 87% der gesunden Patienten einen nPZ-Anteil von  $\geq 20\%$  auf. In der Gruppe der MM-Patienten zeigten rund 12% einen solchen nPZ-Anteil oberhalb der Grenze von 20%.



### 3.5.5 Verteilung phänotypisch aberranter Plasmazellen

Der Anteil phänotypisch aberranter Plasmazellen (aPZ) setzte sich, wie in Kapitel 2 bereits erwähnt, aus drei verschiedenen Subgruppen zusammen, die sich im Hinblick auf ihre CD19- und CD56-Expression unterscheiden. In der Gruppe der MM-Patienten nimmt der Anteil von CD19-/CD56+ PZ an der Gesamtplasmazellmenge im Median 80% ein und lag somit um ein Vielfaches über dem der MGUS- und gP-Patienten. Bei Letzteren waren im Median lediglich 6% bzw. 4% der aPZ in Bezug auf alle PZ durch CD19-/CD56+ PZ bedingt (Abbildung 15).

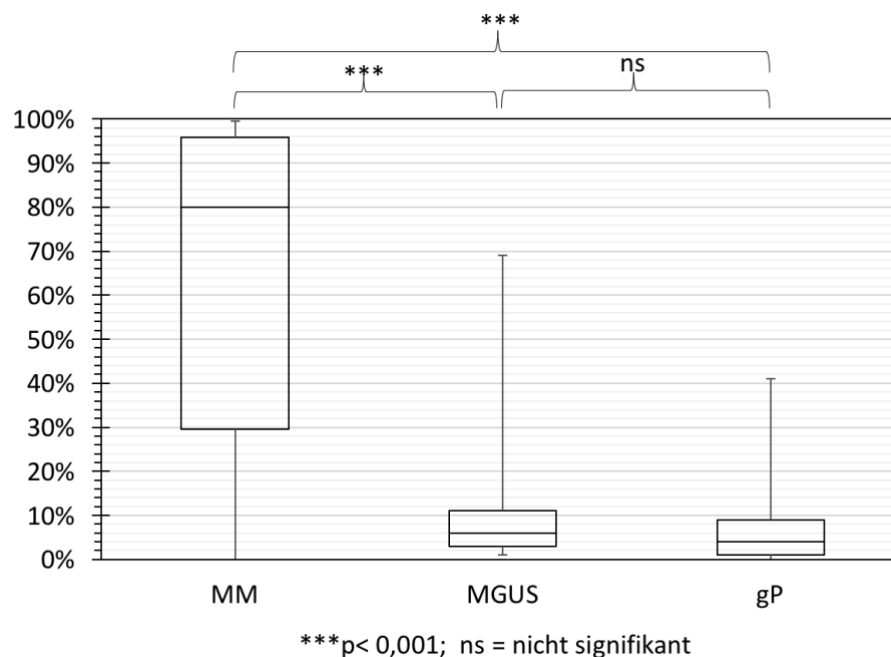


Abbildung 15: Anteil der CD19-/CD56+ PZ in Bezug auf die Gesamtplasmazellmenge innerhalb der jeweiligen Gruppe

Weniger eindeutig zeichnete sich die Verteilung der CD19+/CD56+ sowie der CD19-/CD56- PZ ab. Hier zeigte der KSO-Test für beide Antigenkonstellationen keinen signifikanten Unterschied der PZ-Verteilung zwischen den MGUS- und gesunden Patienten (CD19-/CD56-:  $p=0,1507$ ; CD19+/CD56+:  $p=0,7321$ ; bei  $\alpha=0,05$ ). Dennoch ließen sich Verteilungstendenzen feststellen. Während die CD19+/CD56+ PZ in der Gruppe gP mit einem medianen Anteil von 22% am häufigsten vertreten waren, fanden sich CD19-/CD56- PZ mit einem medianen Anteil von 15% am häufigsten in der Gruppe MGUS (Abbildung 16 und Abbildung 17).

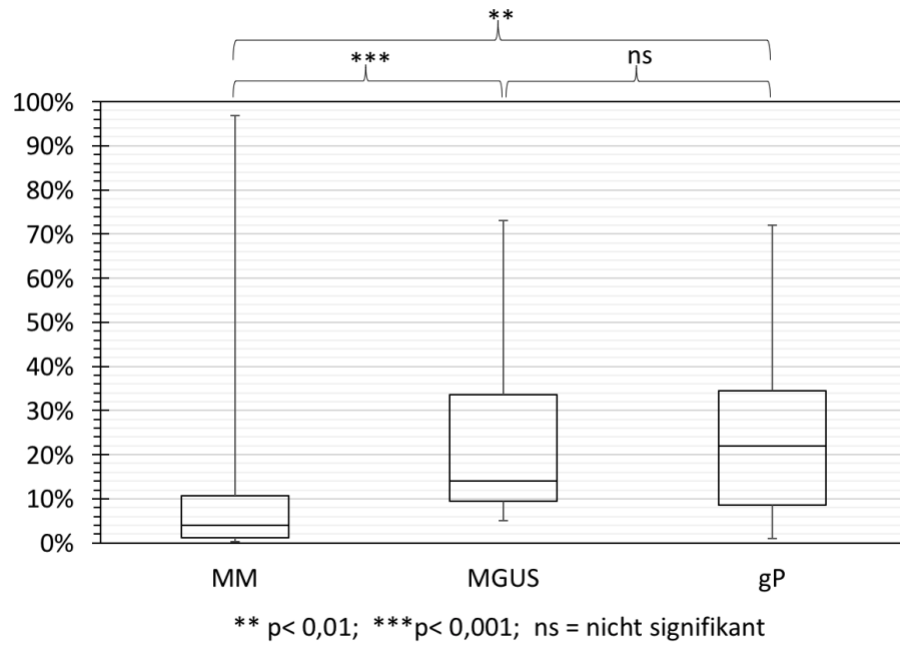


Abbildung 16: Anteil der CD19+/ CD56+ PZ in Bezug auf die Gesamtplasmazellmenge innerhalb der jeweiligen Gruppe

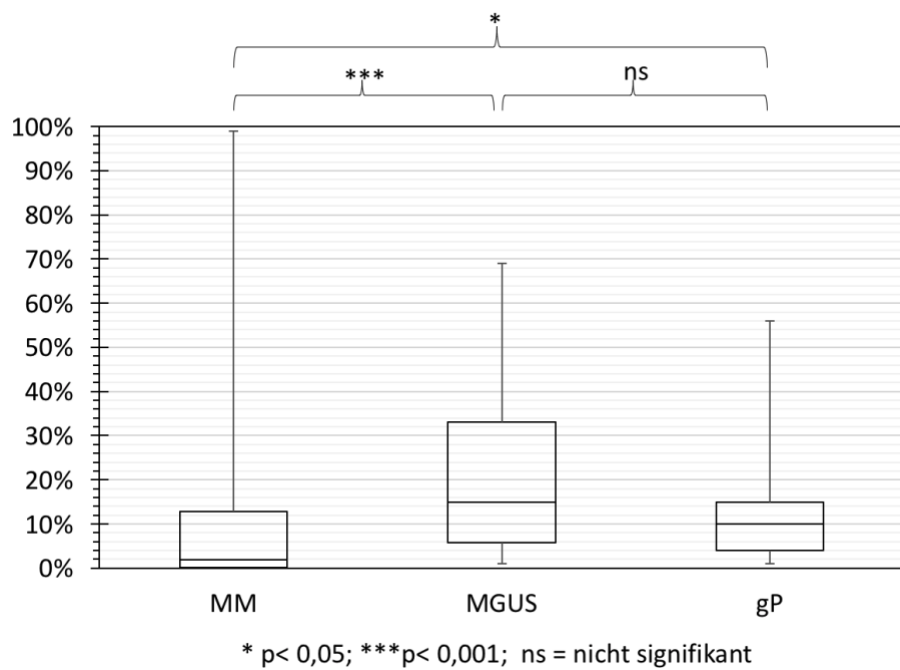


Abbildung 17: Anteil der CD19-/ CD56- PZ in Bezug auf die Gesamtplasmazellmenge innerhalb der jeweiligen Gruppe

## 4 Diskussion

In der folgenden Diskussion werden zunächst die wichtigsten im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse zusammenfassend dargestellt. Anschließend werden diese Ergebnisse im Vergleich mit anderen Arbeiten im Hinblick auf die Aussagekraft von zytologischer und durchflusszytometrischer Untersuchung beleuchtet und kritisch diskutiert. Schlussendlich erfolgt die vergleichende Betrachtung der hier erhobenen Befunde und den durch Sezer et al. veröffentlichten Ergebnissen.

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden 104 Patienten retrospektiv analysiert, bei denen in den Jahren 2008 und 2009 in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt für Hämatologie und Onkologie der Charité erstmalig eine Knochenmarkpunktion im Kontext der Diagnostik eines Multiplen Myeloms durchgeführt wurde. Von diesen Patienten wurden 58% durch die histologische bzw. 46% und 57% durch die zytologische und durchflusszytometrische Diagnostik als gesund eingeordnet, während 37% bzw. 22% und 43% durch selbige Untersuchungen als erkrankt eingeordnet wurden. Keine sichere Zuordnung (Graubereich) war in 6% (Histologie) bzw. 32% (Zytologie) der Patienten möglich, während ein solcher Graubereich in der Auswertung der Durchflusszytometrie analog zu Sezer et al. aufgrund definierter Grenzen nicht existent ist.

Im Vergleich der histologischen und zytologischen Befunde wurde lediglich in 60% der Fälle eine Übereinstimmung festgestellt, während eine größere Übereinstimmung von 80% beim Vergleich der histologischen mit den durchflusszytometrischen Untersuchungsergebnissen festgestellt wurde.

Zur weiteren Analyse wurden die Patienten unter Berücksichtigung aller zur Verfügung stehenden Befunde abschließenden Diagnosegruppen zugeordnet (42 MM-Patienten, 39 MGUS-Patienten, 23 gesunden Personen). Im anschließenden Abgleich mit den einzelnen Untersuchungsmodalitäten zeigte die Histologie in allen Gruppen den größten Anteil kongruenter Befunde (91% bei MM, 95% bei MGUS, 100% bei gP), gefolgt von der Durchflusszytometrie (86% bei MM, 82% bei MGUS, 91% bei gP). Die Zytologie zeigte in allen Gruppen den kleinsten Anteil übereinstimmender Befunde mit der abschließenden Diagnose (55% bei MM, 76% bei MGUS, 50% bei gP).

Während in der MM-Gruppe im Median ein Gesamtplasmazellanteil von 5% nachgewiesen wurde, zeigten sich in den anderen beiden Gruppen ein signifikant geringerer Anteil von 0,8%. Auch bezüglich des Anteils phänotypisch normaler Plasmazellen zeigten sich zwischen MM- bzw. MGUS- und gP-Gruppe mit im Median 2% bzw. 34% und 57% signifikante Unterschiede.

Weiterhin wiesen 14% in der MM-Gruppe bzw. 82% und 91% in der MGUS- und gP-Gruppe einen nPZ-Anteil  $\geq 20\%$  auf.

Bei der Analyse der phänotypisch aberranten Plasmazellen zeigte sich lediglich beim medianen Anteil der CD19-/ CD56+ Plasmazellen in Bezug auf die Gesamtplasmazellmenge ein signifikanter Verteilungsunterschied zwischen den MM-, MGUS-, und gP-Gruppen, der in der MM-Gruppe deutlich über dem der MGUS- und gP-Gruppe (80% vs. 6% bzw. 4%) lag.

## **4.2 Aussagekraft der Zytologie**

Die Aussagekraft von zytologischer und histologischer Untersuchung im Kontext der Diagnostik des Multiplen Myeloms wurde bereits im Rahmen vorheriger Studien evaluiert. So verglichen Buss et al. in einer 1987 publizierten Studie zytologische und histologische Befunde von Patienten mit klinischem Verdacht auf ein MM.<sup>55</sup> Hierbei wurde die klinische Verdachtsdiagnose eines Multiplen Myeloms in 83% der Fälle entweder durch einen pathologischen Histologie- und/oder Zytologiebefund bestätigt. Jedoch zeigten sowohl die histologische als auch die zytologische Untersuchung übereinstimmend einen Myelombefund bei lediglich 59% der Patienten, während bei 17% der Patienten beide Methoden kongruent einen unauffälligen Befund erbrachten, sodass bei 76% beide Untersuchungsmodalitäten einen übereinstimmenden Befund erbrachten.<sup>55</sup> Im Vergleich zur vorliegenden Studie (Übereinstimmung in 60% der Fälle zwischen Zytologie und Histologie) ist somit die Abweichung zwischen zytologischen und histologischen Befunden in der Studie von Buss et al. etwas geringer. Nichtsdestotrotz fanden sich bei 24% der von Buss et al. untersuchten Patienten zwischen Histologie und Zytologie divergente Befunde (7% unauffällige Zytologie bei pathologischer Histologie, 17% pathologische Zytologie bei unauffälliger Histologie). Diese Ergebnisse sind somit mit dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit, dass Histologie und Zytologie in einem relevanten Anteil der Fälle nicht kongruente Befunde liefern, übereinstimmend.

Die initiale Diagnosestellung in der Arbeit von Buss et al. erfolgte anhand klinischer Befunde, die innerhalb der Publikation jedoch nicht genau definiert wurden, sodass eine direkte

Vergleichbarkeit mit der in der vorliegenden Arbeit klar definierten Gruppe der MM-Patienten eingeschränkt ist.

Im vorliegenden Kollektiv hatte der histologische Befund einen ausschlaggebenden Einfluss in Bezug auf die abschließende Diagnosestellung, sodass daraus eine große Übereinstimmung von histologischem Befund und abschließender Diagnose resultiert, während Buss et al. keinen Bezug auf den Stellenwert der Histologie bei der initialen Diagnosestellung (anhand der Klinik) nehmen. Obwohl Buss et al. bei der Bewertung der zytologischen und histologischen Befunde keinen Graubereich definierten, zeigten dennoch einige Patientin einen unklaren Befund: Von den Patienten, die einen übereinstimmenden histologischen und zytologischen Befund zeigten (n=160/59%) sei nach Angaben der Autoren bei 17,5% (n=28) eine Diagnosestellung allein aufgrund des histologischen Befundes erschwert gewesen, sodass der histologische Befund nur unter Berücksichtigung der zytologischen Analyse eine Diagnosestellung ermöglicht hat. Umgekehrt war dies bei 10% (n=16) der Patienten in der zytologischen Untersuchung der Fall, sodass bei diesen Patienten nur eine Diagnosestellung unter Hinzuziehen der histologischen Analyse möglich war. Setzt man diese Anteile der Patienten mit dem in der vorliegenden Arbeit definierten Graubereich gleich, so zeigt die Histologie in der Arbeit von Buss et al. eine schlechtere Aussagekraft im Hinblick auf die Diagnosestellung eines MM.

In der Gesamtbetrachtung der Arbeit von Buss et al. sind insbesondere die 17% der Patienten hervorzuheben, die einen pathologischen Zytologie- bei gleichzeitig unauffälligem Histologiebefund aufwiesen und bei denen somit der klinische Anhalt eines Multiplen Myeloms lediglich mittels Zytologie bestätigt wurde. In der vorliegenden Arbeit gab es im Gegensatz zu Buss et al. keinen Patienten mit pathologischem Befund in der Zytologie bei gleichzeitig unauffälligem histologischen Befund.

Eine Diagnosestellung allein auf dem Boden der zytologischen Ergebnisse, wie von Buss et al. durchgeführt, scheint bei der Betrachtung weiterer im Rahmen der vorliegenden Arbeit erhobenen Ergebnisse jedoch problematisch. Dies wird insbesondere bei der Betrachtung der Ergebnisse deutlich, die zeigen, dass die Zytologie häufig keinen eindeutigen Befund im Hinblick auf eine Diagnosestellung liefert. So zeigte die Zytologie in der Gruppe der Gesunden bei 50% der Personen im Graubereich liegende Befunde, sodass bei der Hälfte der untersuchten gesunden Personen keine klare Aussage anhand der zytologischen Untersuchung getroffen werden kann. Neben der mangelhaften Identifikation von Gesunden, konnten ebenfalls die an einem Multiplen Myelom erkrankten Patienten nur etwa zur Hälfte (55%) mittels Zytologie richtig zugeordnet

werden. Darüber hinaus hätte in der vorliegenden Untersuchung eine alleinige zytologische Untersuchung 15% der Patienten, bei denen ein MM vorlag, fälschlicherweise als gesund eingeordnet.

Eine mögliche Erklärung für die oben beschriebenen Abweichungen in der Bewertung von histologischen und zytologischen Befunden in der vorliegenden Arbeit sowie der von Buss et al. liefern weitere Arbeiten, die deutliche Abweichungen bei der Quantifizierung der Plasmazellmenge in beiden Methoden feststellten.

So untersuchte eine Arbeit von Terpstra et al. die PZ-Anteile in zytologischem Aspirat und Knochenmarksbiopsie von 54 MM-Patienten, um die in anderen Studien dargestellten Abweichungen der beiden diagnostischen Methoden zu beleuchten.<sup>56</sup> In dieser Untersuchung fand sich eine Übereinstimmung des Plasmazellgehaltes in der zytologischen und histologischen Untersuchung in lediglich 48% der Fälle, während weitere 48% der Patienten einen deutlich größeren PZ-Anteil im histologischen als im zytologischen Befund aufwiesen. Vor allem bei fokalem Knochenmarksbefall wies die Zytologie eine Unterschätzung des Plasmazellanteils im Knochenmark auf. Die Autoren schlussfolgerten, dass die Tumormasse bei Patienten mit MM valider mittels Histologie im Vergleich zur zytologischen Untersuchung ermittelt werden kann.<sup>56</sup> Auch im in der vorliegenden Studie untersuchten Kollektiv zeigten die histologischen Befunde der MM-Patienten insgesamt betrachtet mit im Median 30% einen größeren Plasmazellanteil als die zytologischen Befunde mit im Median 25% Plasmazellanteil (Ergebnisse nicht dargestellt). Hierbei wiesen ca. 67% der MM-Patienten in der histologischen Untersuchung einen größeren Plasmazellanteil auf, während 23% einen größeren Plasmazellanteil in der zytologischen Untersuchung erbrachten. Lediglich 10% der betrachteten MM-Patienten zeigten einen übereinstimmenden Plasmazellanteil in den Befunden der beiden diagnostischen Methoden. Hieraus wird deutlich, dass die Zytologie den Plasmazellanteil tendenziell unterschätzt und somit auch bei der initialen Diagnosestellung niedrigere Plasmazellanzahlen liefert.

Weitere Untersuchungen anderer Gruppen postulierten ebenfalls in anderen Zusammenhängen, dass die Ergebnisse von zytologischer und histologischer Untersuchung beim Myelompatienten, wie auch in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, häufig divergieren. Stifter et al. korrelierten den PZ-Anteil von 59 MM-Patienten, mittels zytologischer und histologischer Untersuchung (CD138 markierte Zellen) bestimmt, mit dem Gesamtüberleben der untersuchten Patienten.<sup>57</sup> Während die zytologischen Befunde im Median 29% Plasmazellen zeigten, lag der PZ-Anteil der histologischen Befunde mit im Median 50% deutlich höher. Die größten Unterschiede wurden hier

analog zu Terpstra et al. bei mikroskopisch ermitteltem nodulärem Knochenmarksbefall beobachtet, welcher im von Stifter et al. untersuchten Kollektiv bei 20% der untersuchten MM-Patienten vorlag. Die Autoren erläuterten, dass ein fokaler Prozess, wie er beim MM häufig beobachtet werden kann, negativen Einfluss auf die Genauigkeit und Verlässlichkeit der Plasmazellanalyse mittels Zytologie haben kann. Weiterhin folgerten sie, dass die Histologie auch im Hinblick auf die Tumormasse im Vergleich zur Zytologie die überlegene diagnostische Methode ist. Sie beschrieben außerdem eine Verminderung der Gesamtüberlebenszeit von Patientin mit einem PZ-Infiltrationsanteil >50% in der Histologie sowie mit einem Anteil atypischer PZ >25% in der zytologischen Diagnostik.<sup>57</sup> Die vorliegende Arbeit liefert durch den retrospektiven Charakter der Analyse bedingt weder Aussagen bezüglich des Infiltrationsmusters des Knochenmarks durch Plasmazellen noch hinsichtlich der Überlebenszeit der einzelnen Patienten.

Neben den bereits genannten Untersuchungen berichteten auch weitere Studien, dass die zytologische Untersuchung den PZ-Anteil im Knochenmark häufig unterschätzt. Bei der Untersuchung von Adhäsionsmolekülen auf Osteoblasten und Plasmazellen im Kontext der Osteolyseentstehung von MM-Patienten beschrieben Ely et al. nebenbefundlich, dass die Histologiebefunde in 44% der 352 untersuchten Fälle einen höheren PZ-Anteil darstellten als die der Zytologie. In diesen Fällen lag die durchschnittliche Abweichung des PZ-Anteils bei über 20%.<sup>58</sup> Auch Veillon et al. kamen im Rahmen ihrer Übersichtsarbeit zu dem Schluss, dass der PZ-Anteil im Aspirat im Vergleich zur Knochenmarkbiopsie deutlich unterschätzt wird.<sup>59</sup>

Ebenso untersuchten Matsue et al. die PZ-Quantität mittels verschiedener diagnostischer Methoden.<sup>60</sup> Es zeigte sich ein deutlich höherer medianer PZ-Anteil in der histologischen Untersuchung (13,3%) im Vergleich zur zytologischen (3,7%) und durchflusszytometrischen (2,4%) Analyse. Die Autoren betonen deutlich die Überlegenheit der histologischen Untersuchung gegenüber der Zytologie und empfehlen somit die Diagnosestellung eines MM anhand der CD138-markierten Knochenmarkstanze und nicht anhand zytologischer Befunde.<sup>60</sup>

Tabelle 14 zeigt zusammenfassend, dass der histologisch bestimmte PZ-Anteil in der vorliegenden Arbeit sowie in der Literatur beschrieben, in einem Großteil der Fälle über dem zytologisch bestimmten PZ-Anteil liegt.

Tabelle 14: Übersicht der Ergebnisse der Arbeitsgruppen in Bezug auf den PZ-Anteil der histologischen (Histo) und zytologischen (Zyto) Untersuchungen (in % der Fälle), sowie den medianen durch die jeweilige Methode bestimmten PZ-Anteil<sup>56-58,60</sup>

Studie	Histo = Zyto	Histo > Zyto	Medianer PZ- Anteil Histo	Medianer PZ- Anteil Zyto
vorliegende Arbeit	10%	69%	30%	25%
Stifter et al.			50%	29%
Terpstra et al.	48%	48%		
Ely et al.		44%		
Matsue et al.			13%	4%

Die oben diskutierten abweichenden prozentualen PZ-Anteile und die daraus resultierenden ebenfalls divergierenden histologischen und zytologischen Bewertungen im Hinblick auf die Diagnosestellung stellen die Histologie als der Zytologie überlegene diagnostische Methode dar. Allerdings lässt die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Sensitivitäts- und Spezifitätsanalyse die Zytologie entgegen dieser Aussage als sehr verlässliche Methode erscheinen. Eine Sensitivität von 79% und eine Spezifität von 100% ergibt sich jedoch nur dadurch, dass lediglich 56 der 99 Patienten einen Befund mit klarer Zuordnung zeigten. Somit gibt die zytologische Untersuchung im Vergleich zu den anderen diagnostischen Methoden deutlich seltener eine klare Aussage über eine mögliche Erkrankung. Wenn sie jedoch ein Ergebnis liefert sollte dieses durchaus im Kontext der Diagnosestellung in Betracht gezogen werden.

Während einige Autoren eine kombinierte histologische sowie zytologische Untersuchung empfehlen<sup>55,57</sup>, stellen andere klar die Histologie als der Zytologie überlegene Methode dar, bzw. betonen die Rolle der Histologie als wesentlichen Bestandteil der Diagnosestellung sowie der Überwachung eines Multiplen Myeloms.<sup>56,61-63</sup>

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sowohl anhand der vorliegenden als auch anhand bereits veröffentlichter Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen eine Diagnosestellung solitär auf dem Boden der Zytologie nur in Einzelfällen möglich und sinnvoll erscheint. Bei ca. einem Drittel der Patienten liefert die zytologische Untersuchung in der vorliegenden Untersuchung keine klaren



Ergebnisse und ist bei geringerer Aussagekraft im Vergleich zur Histologie als deutlich weniger verlässliche Methode im Kontext der Diagnostik des Multiplen Myeloms zu werten. Dies kann unter anderem darauf zurückgeführt werden, dass das Multiple Myelom häufig einen fokalen Krankheitsprozess darstellt, welcher die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Bestimmung von Plasmazellanteilen in Knochenmarkaspiraten beeinflusst. Ein weiterer Grund für den niedrigeren Plasmazellgehalt im zytologischen Präparat im Vergleich zum histologischen könnte darin bestehen, dass sich Plasmazellen unter Umständen schwerer aspirieren lassen als die übrigen Zellen des Knochenmarks und somit eine nicht repräsentative Probe gewonnen wird.

Nichtsdestotrotz sollte eine zytologische Untersuchung im Rahmen der Diagnostik des Multiplen Myeloms durchgeführt werden, insbesondere da deren Befunde deutlich schneller vorliegen als die der histologischen Untersuchung. Außerdem sollte die zytologische Untersuchung ergänzend zur Histologie hinzugezogen werden, wenn der histologische Befund einen nicht eindeutigen Befund zeigt. In der vorliegenden Arbeit stimmte der zytologische Befund von drei der vier Patienten mit im Graubereich liegendem histologischem Befund mit der abschließenden Diagnose überein, sodass eine gemeinsame Betrachtung von histologischen und zytologischen Befunden sinnvoll ist. Unter Berücksichtigung der großen Übereinstimmung der histologischen Befunde mit der abschließenden Diagnose sollte die Histologie dennoch weiterhin den Goldstandard in der Diagnostik des MM darstellen.

#### **4.3 Aussagekraft der Durchflusszytometrie im Vergleich zu den anderen Untersuchungsmodalitäten**

Die Bewertung der durchflusszytometrischen Ergebnisse kann anhand unterschiedlicher Parameter wie der Klonalität, der Gesamtplasmazellmenge oder des Anteils normaler Plasmazellen erfolgen. Eine Vielzahl von Studien untersuchten das diagnostische Potential der Durchflusszytometrie mittels dieser Parameter, sodass im Folgenden die Ergebnisse dieser Studien vorgestellt und zur vorliegenden Arbeit in Bezug gesetzt werden.

Die durchflusszytometrischen Befunde im vorliegenden Kollektiv, deren Bewertung auf dem Boden der von Sezer et al. definierten Grenze von <20% normalen Plasmazellen erfolgte, zeigen im Gegensatz zu den zytologischen Befunden eine deutlich größere Übereinstimmung mit denen der Histologie und der abschließenden Diagnose.

Dieses Ergebnis deckt sich mit denen der Studie von Tran et al., die ebenfalls durchflusszytometrische Befunde mit histologischen und zytologischen Befunden verglichen, um das diagnostische Potential der Durchflusszytometrie zu beleuchten. Untersucht wurden Patienten mit V.a. eine Plasmazellerkrankung bzw. Patienten, deren Plasmazellanteil >1% der Leukozyten ausmachte. Hierbei zeigte sich, dass die histologischen und durchflusszytometrischen Befunde der 280 betrachteten Fälle im Hinblick auf die untersuchte Klonalität mittels beider Untersuchungsmodalitäten eine große Übereinstimmungsrate lieferten und betonen die Sinnhaftigkeit des routinemäßigen Einsatzes der Durchflusszytometrie zur Diagnosestellung von Plasmazellerkrankungen.<sup>64</sup> Während im vorliegenden Kollektiv in 80% der Fälle eine Kongruenz der histologischen und durchflusszytometrischen Bewertung vorlag, wurde diese in der Studie von Tran et al. in 90% der Fälle beschrieben.<sup>64</sup> In der vorliegenden Arbeit basiert die Übereinstimmung der histologischen und durchflusszytometrischen Befunde jedoch nicht wie bei Tran et al. auf der Analyse der Klonalität der Plasmazellen, sondern auf der Diagnose, welche mittels einer nPZ-Grenze von 20% analog zu der Arbeit von Sezer et al. gestellt wurde. Eine Übereinstimmung der anhand der Zellmorphologie beurteilten zytologischen Befunde und den durchflusszytometrischen Befunden wurde von Tran et al. in nur 78% der Fälle beschrieben.

Interessanterweise zeigten Tran et al. in oben genannter Studie, dass die Durchflusszytometrie im Vergleich zur zytologischen und histologischen Untersuchung von MM-Patienten den Gesamtplasmazellanteil deutlich unterschätzt.<sup>64</sup> Ähnliche Ergebnisse stellten Manasanch et al. in ihrer Arbeit vor, welche sich unter anderem mit dem Einfluss der Biopsietechnik auf verschiedene Plasmazellfaktoren beschäftigte. Hier wurde kongruent zu den Daten der vorliegenden Studie sowie zu den Auswertungen von Tran et al. dargestellt, dass die Gesamtplasmazellmenge von MGUS- und SM-Patienten in der Durchflusszytometrie verglichen mit der histologischen Untersuchung deutlich geringer beurteilt wird.<sup>65</sup> Auch im Kollektiv der vorliegenden Studie zeigten alle MM- und MGUS-Patienten sowie gesunde Personen sowohl in der histologischen als auch in der zytologischen Untersuchung (PZ-Anteil im Median 30% bzw. 25% bei MM, PZ-Anteil im Median 10% bzw. 5% bei MGUS, PZ-Anteil im Median 10% bzw. 7,5% bei gP - Ergebnisse nicht dargestellt) einen größeren Plasmazellanteil als die durchflusszytometrische Untersuchung mit im Median 5% (MM) bzw. 0,8% (MGUS und gP) Plasmazellen (s. Abbildung 10).

Obwohl die Durchflusszytometrie den absoluten Plasmazellgehalt unterschätzt, kann sie relevante Aussagen bezüglich der Plasmazellqualität treffen, die im Rahmen der Diagnosestellung einen wichtigen Beitrag leisten können. So konnte die Überlegenheit der Durchflusszytometrie

gegenüber der Zytologie im Kontext der Diagnosestellung in der vorliegenden Arbeit dargelegt werden. In allen mittels abschließender Diagnosestellung definierten Gruppen ordneten die durchflusszytometrischen Befunde einen größeren Anteil der Patienten als die zytologischen Befunde korrekt ein (86% vs. 55% bei MM, 82% vs. 76% bei MGUS, 91% vs. 50% bei gP). Der durch unterschiedliche Arbeitsgruppen<sup>64-66</sup> in der Durchflusszytometrie beschriebene niedrigere Plasmazellanteil im Vergleich zur Zytologie scheint somit keine Auswirkungen auf die Qualität der Aussagekraft der durchflusszytometrischen Untersuchung bei der Diagnosestellung zu haben.

Einen möglichen Erklärungsansatz für die im Vergleich zur Zytologie niedrigeren durchflusszytometrisch ermittelten Gesamtplasmazellanteile legen Paiva et al. sowie Smock et al. in ihren Studien dar.<sup>66,67</sup> Die Autoren diskutieren als Ursache hierfür die Reihenfolge der Probengewinnung, da die erste Probe für die zytologische Untersuchung genutzt wurde und diese somit weniger stark mit peripherem Blut verdünnt wurde. Diese Erklärung scheint vor allem vor dem Hintergrund plausibel, dass die zytologische Untersuchung häufig anhand der mittels Aspirat gewonnenen Knochenmarkbröckchen durchgeführt und in diesen der relative Anteil von Plasmazellen an den Zellen innerhalb des Knochenmarks bestimmt wird, während die durchflusszytometrische Analyse meist die mit peripherem Blut verdünnten flüssigen Anteile der Proben untersucht.

Unabhängig hiervon zeigen die vorliegenden Ergebnisse das diagnostische Potential der Durchflusszytometrie bei den MM-Patienten ohne eindeutigen histologischen Befund. Sie war bei allen durch die abschließende Diagnose als MM-Patienten eingeordnet in der Lage diese anhand der festgelegten nPZ-Grenze von 20% als richtig erkrankt zuzuordnen. Ebenso ordnete die Durchflusszytometrie alle Patienten der MGUS-Gruppe mit histologisch nicht eindeutigem Befund korrekterweise als nicht erkrankt ein.

Obwohl die Durchflusszytometrie in der vorliegenden Arbeit bei allen Patienten mit unklarem histologischen Befund einen korrekten Befund liefert, diagnostiziert sie mit einer analog zu Sezer et al. festgelegten nPZ-Grenze von 20% als einzige Methode Personen der MGUS- und gP-Gruppe als an einem MM erkrankt. Eine solche absolute Grenze ist somit in Frage zu stellen (vgl. Abschnitt 4.4.2). Interessanterweise erfolgte eine solche Zuordnung in der MGUS-Gruppe bei einem deutlich größeren Anteil der Personen als bei der gP-Gruppe (17,9% vs. 8,7%) und ist somit eventuell am ehesten als Hinweis auf den möglicherweise bevorstehenden Krankheitsprogress der MGUS-Patienten zu werten. Dies wäre in weiteren Studien zu überprüfen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Bewertung einer Knochenmarkprobe mittels Durchflusszytometrie anhand der definierten Grenze von 20% nPZ-Anteil einer Beurteilung mittels zytologischer Untersuchung überlegen ist. Allerdings scheint die Durchflusszytometrie häufiger auch gesunde Personen bzw. MGUS-Patienten als an einem MM erkrankt zu bewerten. Im Falle eines nicht eindeutigen histologischen Befundes jedoch konnte der durchflusszytometrische Befund in allen betrachteten Fällen die Diagnose eines MM verifizieren.

#### **4.4 Bedeutung des Anteils phänotypisch normaler Plasmazellen im Kontext der Diagnosestellung mittels Durchflusszytometrie**

Obwohl die durchflusszytometrische Untersuchung, wie in Abschnitt 4.3 erläutert, bei einem Großteil der Fälle gute Ergebnisse bei der Diagnosestellung eines MM anhand der festgelegten nPZ-Grenze von 20% liefert, liegen doch unterschiedliche Ergebnisse im Hinblick auf die Verteilung von phänotypisch normalen Plasmazellen in der Literatur vor. Im Folgenden werden die in der vorliegenden Arbeit sowie in weiteren Studien genannten unterschiedlichen medianen bzw. relativen Anteile phänotypisch normaler Plasmazellen in den einzelnen Patientengruppen gegenübergestellt und im direkten Vergleich mit den Ergebnissen von Sezer et al. betrachtet.

##### **4.4.1 Vergleich der medianen Anteile phänotypisch normaler Plasmazellen in Bezug auf die Gesamtplasmazellmenge**

Im Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit weist die Literatur in Bezug auf den durchschnittlichen bzw. medianen Anteil phänotypisch normaler Plasmazellen teilweise divergierende Ergebnisse auf.

In einer Studie von Gupta et al. zeigten 16 MGUS-Patienten durchschnittlich einen nPZ-Anteil von 17,57% (Median 12,46%) und 22 MM-Patienten von 4,48% (Median 0,43%).<sup>68</sup> Im vorliegenden Kollektiv lagen die nPZ-Anteile mit jeweils durchschnittlich 43,45% (Median 34%) in der MGUS-Gruppe und 10,9% (Median 2%) in der MM-Gruppe deutlich höher. Allerdings erfolgte die Definition von normalen und aberranten Plasmazellen bei Gupta et al. nicht wie in der vorliegenden Arbeit anhand der CD19 und CD56-Expression der Plasmazellen, sondern anhand der Leichtkettenexpression und somit anhand der PZ-Klonalität. Eine differenzierte Betrachtung der Antigenexpression der Plasmazellen wurde von Gupta et al. nicht durchgeführt. Somit vergleichen die oben genannten Zahlen normale (CD19+/ CD56-) mit nicht klonalen Plasmazellen

und aberrante (CD19+/ 56+, CD19-/CD56- und CD19-/ CD56+) mit klonalen Plasmazellen und könnte die unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

Robillard et al. dagegen untersuchten die Antigenbeschaffenheit von CD19, CD56 und CD28 und somit den Anteil normaler und aberranter Plasmazellen von 26 Gesunden und 139 MM-Patienten mittels Durchflusszytometrie.<sup>51</sup> Die Autoren beschrieben einen sehr geringen Anteil an phänotypisch normalen Plasmazellen im Kollektiv der untersuchten MM-Patienten bei gleichzeitig überwiegendem Vorliegen von (aberranten) CD19-/ CD56+ Plasmazellen. Wie Tabelle 15 zeigt, ist eine Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen der vorliegenden Arbeit im Hinblick auf die Verteilung der jeweiligen Antigenkonstellation gegeben.

Tabelle 15: Vergleich der medianen PZ-Verteilung normaler und aberranter PZ des vorliegenden Kollektivs mit der medianen PZ-Verteilung bei Robillard et al.<sup>51</sup>

Antigenkonstellation Robillard et al.	Antigenkonstellation vorliegende Arbeit	MM Robillard et al.	MM vorliegende Arbeit	gP Robillard et al.	gP vorliegende Arbeit
19+/ 56- oder 28-	19+/ 56-	0,3%	2%	53,7%	57%
19+/ 56+ oder 28+	19+/56+	0,5%	4%	7%	22%
19-/ 56+ oder 28+	19-/ 56+	96,5%	80%	12%	4%
19-/ 56- oder 28-	19-/ 56-	1,2%	1,9%	23%	10%

Somit zeigt sich eine klare Tendenz der nPZ-Verteilung in den unterschiedlichen Gruppen. Diese liegt bei in allen drei Arbeitsgruppen untersuchten MM-Patienten im Median deutlich unter der von Sezer et al. definierten Grenze von <20% nPZ-Anteil. Während die in zwei Arbeiten betrachteten gesunden Personen sowie die im vorliegenden Kollektiv untersuchten MGUS-Patienten einen analog zu Sezer et al. deutlich über dieser Grenze liegenden medianen nPZ-Anteil aufwiesen, zeigten die von Gupta et al. untersuchten MGUS-Patienten einen medianen nPZ-Anteil von nur 12%. Der nPZ-Anteil scheint somit auch in den genannten Arbeiten zum Großteil eine ähnliche Verteilungstendenz zu zeigen wie bei Sezer et. al.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass neben des nPZ-Anteils auch der Anteil der aberranten Plasmazellen mit der Antigenkonstellation CD19-/ CD56+ im Rahmen der Diagnosestellung eines MM von Bedeutung ist. So konnte das, wie von Robillard et al. bei MM-Patienten bereits beschriebene starke Vorkommen von CD19-/ CD56+ Plasmazellen in Abschnitt 3.5.5 im vorliegenden Kollektiv der MM-Patienten bestätigt werden. Ein großer Anteil (aberranter) CD19-

/ CD56+ Plasmazellen in einer Knochenmarkprobe kann somit die Diagnose eines MM untermauern.

#### **4.4.2 Bedeutung des Anteils phänotypisch normaler Plasmazellen für die Differenzierung von MGUS und MM**

In den oben genannten Arbeiten konnten bereits klare Tendenzen des medianen nPZ-Anteils in den einzelnen Patientengruppen gezeigt werden, welche die Ergebnisse von Sezer et al. zunächst stützen. Die Arbeitsgruppe zeigte 2001, dass mittels einer Grenze des Nachweises von 20% phänotypisch normaler Plasmazellen eine sichere Differenzierung zwischen MM und MGUS in dem von ihnen untersuchten Kollektiv möglich war. So konnte bei allen MGUS-Patienten ein nPZ-Anteil von  $\geq 20\%$  und bei allen MM-Patienten ein nPZ-Anteil von  $< 20\%$  ermittelt werden.<sup>37</sup>

Obwohl die medianen nPZ-Anteile in der vorliegenden Arbeit oberhalb (gP und MGUS) bzw. unterhalb (MM) dieser Grenze von 20% lagen, kann eine wie von Sezer et al. beschriebene Differenzierung zwischen MGUS- und MM-Patienten bei absoluter Betrachtung der einzelnen nPZ-Anteile der Patienten im vorliegenden Kollektiv nicht vollständig bestätigt werden. Lediglich 82% der MGUS-Patienten zeigten einen nPZ-Anteil von  $\geq 20\%$ . Somit fallen 18% der MGUS-Patienten außerhalb des von Sezer et al. definierten Bereiches.

Der kleinste nPZ-Anteil betrug in dieser Gruppe 2%. Die übrigen sechs Patienten lagen mit einem nPZ-Anteil von 11%, 16%, 16%, 17%, 18% und 19% nur oberhalb einer nPZ-Grenze von 10%.

Auch in der Gruppe der Gesunden wiesen nicht alle, sondern nur 91% der Personen einen nPZ-Anteil von  $\geq 20\%$  auf. Im Vergleich zur MM- und MGUS-Gruppe umfasste die gP-Gruppe aus 23 Personen bestehend deutlich weniger Befunde, sodass absolut betrachtet nur zwei Personen mit einem nPZ-Anteil von 13% und 17% einen nPZ-Anteil unterhalb der 20%-Grenze zeigten.

Auch bei Betrachtung der MM-Patienten sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht vollständig kongruent mit denen von Sezer et al. 2001 publizierten. In dieser Gruppe wiesen 14% der Patienten einen nPZ-Anteil von  $\geq 20\%$  und sogar 9,5% einen nPZ-Anteil von  $> 50\%$  auf (Ergebnisse explizit nicht dargestellt). Der größte beobachtete nPZ-Anteil eines MM-Patienten betrug 96%, während die weiteren fünf Patienten 73%, 55%, 52%, 24% und 21% normale Plasmazellen aufwiesen.

Eine allgemein gültige definitive Differenzierung anhand des durchflusszytometrisch bestimmten Anteils normaler Plasmazellen ist im vorliegenden Kollektiv somit nicht möglich. Allerdings wiesen vor allem die MGUS-Patienten und gesunden Personen ähnliche Tendenzen der nPZ-Verteilung wie von Sezer et al. beschrieben auf. So zeigten alle gesunde Personen und mit Ausnahme eines Patienten alle MGUS-Patienten einen nPZ-Anteil von  $> 10\%$ .

Die von Sezer et al. beschriebenen Ergebnisse könnten durch eine unterschiedliche Plasmazellverteilung normaler Plasmazellen in einem von der vorliegenden Studie abweichenden MM-Kollektiv bedingt sein. Während dort ein großer Anteil der Patienten mit 61% (Gruppe A) und 72% (Gruppe B) gar keine normalen Plasmazellen aufwies, konnten in der vorliegenden Arbeit lediglich bei 9,5% der MM-Patienten keine normalen Plasmazellen mehr nachgewiesen werden. Auch im MGUS-Kollektiv konnten Abweichungen in der Plasmazellverteilung normaler Plasmazellen beobachtet werden. Zwar zeigten sowohl alle MGUS-Patienten im Sezer-Kollektiv als auch im Kollektiv der vorliegenden Analyse phänotypisch normale Plasmazellen, jedoch lag der von Sezer et al. ermittelte nPZ-Anteil mit 60% im Median fast doppelt so hoch wie der in dieser Arbeit ermittelte nPZ-Anteil von im Median 34%.

Den hier ermittelten Ergebnissen stehen jedoch weitere in der Literatur beschriebene Zusammenhänge von nPZ-Anteil mit der Diagnose eines MGUS bzw. MMs gegenüber. Bereits 1998 untersuchten Ocqueteau et al. inwiefern der durchflusszytometrisch bestimmte nPZ-Anteil eine Differenzierung von MGUS und MM ermöglicht, indem sie Knochenmarkproben von 76 MGUS- und 65 MM-Patienten analysierten. Die Untersuchung zeigte, dass dies anhand einer im Vergleich zu Sezer et al. deutlich niedrigeren Grenze von 3% normaler Plasmazellen fast immer möglich ist, da 98% der MGUS-Patienten und lediglich 1,5% der MM-Patienten einen nPZ-Anteil von >3% aufwiesen. Allerdings erfolgte die Einteilung der Plasamzellen als normal oder aberrant hier (wie auch bei Gupta et al.) anhand ihrer Klonalität. Dennoch wurden polyklonale und somit normale Plasmazellen zumeist als CD19+/ CD56- beschrieben.<sup>69</sup>

Die Ergebnisse von Ocqueteau et al. konnten nur zum Teil durch oben genannte neuere Untersuchungen von Gupta et al. bestätigt werden. Hier wiesen 81,3% der MGUS-Patienten und 31,8% der MM-Patienten einen nPZ-Anteil von >3% auf. Wie bereits erläutert wurden auch hier polyklonale Plasmazellen als immunphänotypisch normale Plasmazelle definiert.<sup>68</sup>

Eine weitere Arbeit von Gressier et al. untersuchte den Nutzen der Durchflusszytometrie in der Routinediagnostik von Plasmazellerkrankungen unter Berücksichtigung von 45 MGUS- und 52 MM-Patienten. Die Arbeitsgruppe kam zu denen von Gupta et al. ähnlichen Ergebnissen. Allerdings untersuchten sie die Differenzierbarkeit von MGUS und MM mittels einer Grenze von 95% aberranter bzw. 5% normalen Plasmazellen. Es zeigte sich, dass 82% der MGUS-Patienten einen aPZ-Anteil <95% und somit  $\geq 5\%$  nPZ aufwiesen, während 84% der MM-Patienten einen aPZ-Anteil  $\geq 95\%$  und somit 16% einen nPZ-Anteil von >5% zeigten. Als aberrant wurden Plasmazellen definiert, die einen CD19- und/oder CD56+ Phänotyp exprimierten und/oder ein Ungleichgewicht der Leichtkettenexpression (mit einer Ratio von >4 oder <0,5) aufwiesen.<sup>70</sup>

Mittels derselben Grenze ermittelten Pérez-Persona et al. den Anteil von aberranten Plasmazellen im Kollektiv der untersuchten MGUS-Patienten. 18% der MGUS-Patienten wiesen einen aPZ-Anteil von  $\geq 95\%$  und somit 82%, wie auch in der Arbeit von Gressier et al., einen nPZ-Anteil  $\geq 5\%$  auf. Zusätzlich fanden Pérez-Persona et al. heraus, dass ein solcher nPZ-Anteil  $\geq 5\%$  mit einer fünf-Jahres-Progression einer MGUS zu einem MM von 5% assoziiert ist, während dies mit einem Progressionsrisiko von 25% bei einem nPZ-Anteil  $< 5\%$  der Fall ist. In dieser Arbeit erfolgte die Definition eines aberranten Phänotypes anhand einer fehlenden CD19- und/oder CD45-Expression, verminderter CD 38-Expression oder einer Überexpression von CD56.<sup>50</sup>

Tabelle 16 gibt einen Überblick über die oben diskutierten nPZ-Anteile und deren Auftreten bei MGUS- und MM-Patienten.

Tabelle 16: Übersicht über den nPZ-Anteil von MGUS- und MM-Patienten der einzelnen Arbeitsgruppen (in % der Fälle)<sup>37,50,68-70</sup>

	nPZ-Anteil	MGUS	MM
Sezer et al.	$\geq 20\%$	100%	0%
vorliegende Arbeit	$\geq 20\%$	82%	14%
Ocqueteau et al.	$> 3\%$	98%	1,5%
Gupta et al.	$> 3\%$	81%	31,8%
Gressier et al.	$> 5\%$	82%	16%
Pérez-Persona et al.	$> 5\%$	82%	nicht untersucht

Schlussendlich lässt sich festhalten, dass eine klare Differenzierung mittels eines absoluten Grenzwertes vom Anteil normaler Plasmazellen am Gesamtplasmazellgehalt wie durch Sezer et al. postuliert, nicht sicher möglich ist. Die in den verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedlich definierten Grenzwerte des nPZ-Anteils zur Unterscheidung von MGUS- und MM-Patienten von 20%, 5% und 3% zeigen, dass auch eine sonstige allgemein gültige Definition zur klaren Differenzierung von MGUS- und MM-Patienten nicht etablierbar erscheint. Selbst innerhalb der durch die jeweilige Arbeitsgruppe untersuchten Kollektive konnte mittels absolut definierten Grenzwert keine klare Diagnosestellung allein auf dem Boden des Anteils normaler Plasmazellen erfolgen. Dennoch zeigen die Ergebnisse der jeweiligen Studien eine gute Differenzierung von MGUS- und MM-Patienten anhand der unterschiedlichen nPZ-Anteile. Diese absolut betrachtet divergierenden nPZ-Anteile resultieren am ehesten aus methodischen Unterschieden der einzelnen Studien.



Vor allem unter Berücksichtigung der im Abschnitt 4.3 diskutierten Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung, welche mittels der von Sezer et al. festgelegten nPZ-Grenze von 20% erhoben worden sind, sollte eine solche Grenze im Kontext der Diagnosestellung eines MM in Betracht gezogen werden.

#### **4.5 Möglichkeiten der Diagnosestellung mittels Durchflusszytometrie anhand der Gesamtplasmazellmenge**

Wie die vorliegenden Ergebnisse zeigen, lassen sich deutliche Verteilungsunterschiede der Gesamtplasmazellmenge zwischen MM- und MGUS-Patienten feststellen. Obwohl sich die Plasmazellverteilung mit im Median 5% bzw. 0,8% in den beiden Gruppen deutlich voneinander unterscheidet, gibt es insbesondere im Bereich eines Plasmazellanteils von 1% bis 2% Überschneidungen zwischen den Gruppen. Der Anteil der Gesamtplasmazellmenge von gesunden Personen, MGUS- und MM-Patienten wurde bereits durch weitere Arbeitsgruppen untersucht.

Im Kontext der phänotypischen Unterschiede analysierten Ocqueteau et al. in der bereits in Abschnitt 4.4.2 erwähnten Arbeit Knochenmarkproben MGUS- und MM-Patienten mittels Durchflusszytometrie.<sup>69</sup> Im Hinblick auf die Gesamtplasmazellmenge von MGUS- und MM-Patienten zeigte sich, dass sich diese wie auch in der vorliegenden Arbeit voneinander unterscheiden. Allerdings wichen die durch Ocqueteau et al. ermittelten gPZ-Anteile mäßig von denen aus der vorliegenden Arbeit ab. So zeigten gesunde Personen im Durchschnitt 0,25% (vorliegende Arbeit 1,38%) und MGUS-Patienten 1,76% (vorliegende Arbeit 0,91%) Plasmazellen in der durchflusszytometrischen Untersuchung der Knochenmarkprobe.<sup>69</sup> Die Frage nach einer abschließenden Differenzierung von MGUS- und MM-Patienten mittels der Gesamtplasmazellmenge wurde von Ocqueteau et al. nicht beleuchtet. In beiden Arbeiten war vor allem der Anteil der untersuchten gesunden Personen recht klein (n=10 bei Ocqueteau et al., n=23 in der vorliegenden Arbeit) sodass keine allgemein gültigen Schlussfolgerungen auf Basis des kleinen Kollektivs erfolgen sollten.

In der bereits in Abschnitt 4.4.2 erwähnten Arbeit von Gressier et al. lag der PZ-Anteil der MGUS-Patienten mit durchschnittlich 1,2% zwischen denen von Ocqueteau et al. und denen der vorliegenden Analyse. Der durchflusszytometrisch ermittelte PZ-Anteil in der Gruppe der MM-Patienten lag mit durchschnittlich 7,5% unter dem im vorliegenden Kollektiv mit 13,84%.<sup>70</sup>

Deutlich höhere Plasmazellanteile beschrieben Tembhare et al. in ihrer Arbeit, in welcher sie die Antigenexpression von normalen und aberranten Plasmazellen von 14 MGUS-, 35 SM- und 10

MM-Patienten analysierten. Hier zeigten MGUS-Patienten durchschnittlich 7,8%, SM-Patienten 20,9% und MM-Patienten 40,8% Gesamtplasmazellanteil.<sup>71</sup> Das von Tembhare et al. analysierte Kollektiv von 24 MGUS- und MM-Patienten beinhaltet jedoch deutlich weniger Patienten mit Plasmazelldyskrasien im Vergleich zu den anderen genannten Studien, sodass die Aussagekraft im Hinblick auf die absoluten Plasmazellgehalte in Frage gestellt werden sollte.

Während Ocqueteau, Gressier und Tembhare durchschnittliche Plasmazellanteile darstellten, untersuchten Pérez-Persona et al. in ihrer Arbeit mediane Plasmazellanteil in der durchflusszytometrischen Untersuchung, während sie den Einfluss des Anteils aberranter Plasmazellen auf das Progressionsrisiko von 407 MGUS- und 93 SM-Patienten eruierten.<sup>50</sup> Hier zeigten MGUS-Patienten mit im Median 1% ähnliche gPZ-Anteile wie in der vorliegenden Arbeit (0,8%). Die von Pérez-Persona et al. untersuchten SM-Patienten wiesen mit im Median 2,9% weniger Plasmazellen auf.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Arbeiten sowie den im Rahmen dieser Studie vorliegenden Ergebnissen scheint eine Differenzierung von gesunden Personen, MGUS- und MM-Patienten anhand der Gesamtplasmazellmenge, insbesondere im Hinblick auf eine absolute Plasmazellgrenze zur Diagnosestellung, somit nicht ohne weiteres möglich. Sie kann lediglich einen ersten Anhalt für einen bereits malignen Krankheitsprozess bei erhöhter Gesamtplasmazellmenge geben. Hingegen scheinen sich die Plasmazellanteile von MGUS- und MM-Patienten, wenn auch bei absoluter Betrachtung divergierend, relativ betrachtet in den jeweils untersuchten Kollektiven eindeutig zu unterscheiden. Die unterschiedlichen Anteile des Gesamtplasmazellgehaltes in den einzelnen Arbeitsgruppen lassen sich am ehesten auf die unterschiedlichen Methoden der Probenaufarbeitung zurückführen. In allen betrachteten Studien zeigten MGUS-Patienten stets einen kleineren gPZ-Anteil als MM-Patienten.

Darüber hinaus fällt bei der Analyse des Plasmazellgehaltes im vorliegenden Kollektiv auf, dass alle MGUS-Patienten und fast alle gesunden Personen einen PZ-Anteil von  $\leq 3\%$  aufweisen. Nur eine gesunde Person zeigte einen darüberliegenden PZ-Anteil von 9%. In diesem Kontext sollte eine Überprüfung dieser Grenze an einem größeren Kollektiv erfolgen.

Obwohl anhand der Gesamtplasmazellmenge keine sichere Diagnose gestellt werden kann, sollte dennoch eine Bestimmung derselben erfolgen. Wie Cesana et al. durch ihre Analyse von 1104 MGUS-Patienten herausfanden, spielt die durchflusszytometrisch ermittelte Gesamtplasmazellmenge bei der Risikoabschätzung einer eventuellen Progression der MGUS zu einem MM, wie auch schon von Pérez-Persona et al. für den nPZ-Anteil dargestellt (vgl. Abschnitt 4.4.2), eine bedeutende Rolle. Es zeigte sich, dass ein Gesamtplasmazellanteil von  $>5\%$  mit einem

erhöhten Progressionsrisiko einer MGUS zu einem MM verbunden ist.<sup>72</sup> Im vorliegenden Kollektiv zeigte kein einziger MGUS-Patient einen gPZ-Anteil von  $\geq 5\%$ . Während Cesana et al. einen medianen gPZ-Anteil von 5% bei den untersuchten MGUS-Patienten nachwies, wurde ein solcher Anteil in der vorliegenden Arbeit bei den MM-Patienten beobachtet. Allerdings war das von Cesana et al. untersuchte Kollektiv von 1104 MGUS-Patienten deutlich größer als das mit nur 39 untersuchten MGUS-Patienten in der vorliegenden Arbeit. Eine Nachverfolgung der MGUS-Patienten zur Evaluation einer möglichen Progression zu einem MM ist am vorliegenden Kollektiv nicht erfolgt, sodass keine Aussagen über das Progressionsrisiko der MGUS-Patienten getroffen werden kann.

#### **4.6 Kritische Auseinandersetzung mit der eigenen Arbeit**

Aufgrund des retrospektiven Charakters der Datenerhebung sowie der geringen Anzahl an Patienten können die Ergebnisse lediglich eine eingeschränkte Aussagekraft erreichen. Insbesondere die Gruppe von Patienten im Alter  $< 55$  Jahren sowie die Gruppe der Gesunden weist einen kleineren Anteil an Personen als die jeweils anderen Gruppen auf. Eine retrospektive Datenanalyse liefert allgemein nur Hypothesen oder bestärkt diese. Sie kann jedoch die Korrektheit einer solchen Hypothese nicht wissenschaftlich beweisen.

Des Weiteren war die Datenerhebung aufgrund von unvollständigen Unterlagen, vor allem im Hinblick auf die durchgeführten laborchemischen Untersuchungen, sowie die teilweise mangelhafte Dokumentation des weiteren Krankheitsverlaufs erschwert. Eine Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen prospektiver Studien, welche eine deutlich höhere Reliabilität und Validität besitzen, kann somit nur eingeschränkt erreicht werden.

Hinzu kommt eine limitierte Vergleichbarkeit der Ergebnisse der einzelnen betrachteten Studien aufgrund der unterschiedlichen Kriterien und Methoden anhand derer die Diagnosen einer MGUS bzw. eines MM gestellt wurden. Dennoch liefert die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zur Diagnosestellung des MM mittels Durchflusszytometrie und kann als wichtige Grundlage für weitere Untersuchungen, welche die Bedeutung des Plasmazellanteils zur Differentialdiagnose von MGUS und MM analysieren, dienen.

#### 4.7 Schlussfolgerungen

In Zusammenschau mit der aktuellen Literatur liefert die vorliegende Arbeit weitere Evidenz, dass die zytologische Untersuchung im Vergleich zur Histologie die weniger valide Methode bei der Diagnostik des Multiplen Myeloms darstellt. Sie kann häufig keine klare Aussage über eine mögliche Erkrankung liefern. Eine alleinige Diagnosestellung auf Basis der Zytologie ist daher nicht sinnvoll. Dennoch sollten die Ergebnisse der zytologischen Untersuchung bei erfolgreicher Zellgewinnung in Betracht gezogen werden, insbesondere da die zytologischen Befunde im Vergleich zur histologischen Auswertung der Knochenmarkbiopsie deutlich schneller verfügbar sind.

Die durchflusszytometrischen Befunde zeigen hingegen eine größere Übereinstimmung mit denen der Histologie und liefern somit im Durchschnitt weitaus verlässlichere Ergebnisse als die zytologische Untersuchung. Insbesondere im Falle eines nicht eindeutigen histologischen Befundes stellt die durchflusszytometrische Untersuchung eine zusätzliche Informationsquelle in der Diagnostik dar. Dennoch diagnostiziert die Durchflusszytometrie in Einzelfällen gesunde Personen sowie MGUS-Patienten als erkrankt und gibt somit ebenfalls keine abschließende diagnostische Sicherheit.

Außerdem scheint eine Diagnosestellung anhand der Gesamtplasmazellmenge mittels absoluter Plasmazellgrenze nicht ohne weiteres möglich. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen jedoch, dass alle MGUS-Patienten und fast alle gesunden Personen einen PZ-Anteil von  $\leq 3\%$  aufweisen. Eine Überprüfung dieser Grenze an einem größeren Kollektiv erscheint sinnvoll.

Eine Bestimmung des Gesamtplasmazellanteils sollte routinemäßig in der Klinik erfolgen, da es außerdem in der Literatur Hinweise gibt, dass diese bei der Risikoabschätzung einer eventuellen Progression der MGUS zu einem MM eine bedeutende Rolle spielt.

Ebenfalls sollte der Anteil normaler Plasmazellen im klinischen Alltag durchflusszytometrisch bestimmt werden. Allerdings zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse, dass eine klare Differenzierung mittels eines absoluten Grenzwertes vom Anteil normaler Plasmazellen am Gesamtplasmazellgehalt, wie durch Sezer et al. postuliert, nicht abschließend möglich ist. Obwohl verschiedene Arbeitsgruppen gezeigt haben, dass im bei jeweiligen Kollektiv definierten nPZ-Anteil von  $\geq 20\%$  (Sezer et al.),  $>5\%$  (Gressier et al., Pérez-Persona et al.) oder  $>3\%$  (Ocqueteau et al., Gupta et al.) mit großer Wahrscheinlichkeit eine MGUS vorliegt, sollte nach vergleichender Betrachtung der unterschiedlichen Grenzwerte keine Diagnosestellung einer MGUS oder eines MMs allein auf dem Boden des Anteils normaler Plasmazellen erfolgen.

Die durchflusszytometrische Analyse liefert im Vergleich zu zytologischen Untersuchung einen größeren Mehrwert im Kontext der Diagnosestellung des Multiplen Myeloms und sollte somit

zusätzlich zur histologischen Untersuchung in der klinischen Routinediagnostik durchgeführt werden.

## Literaturverzeichnis

1. Peest D, Goldschmidt H. Multiples Myelom Moderne Diagnoseverfahren, aktuelle Behandlungsoptionen und Supportivtherapie; mit 33 Tabellen: Dt. Ärzte-Verlag; 2012.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:7-30.
3. Dimopoulos MA, Terpos E. Multiple myeloma. *Ann Oncol* 2010;21 Suppl 7:vii143-50.
4. Herold G. Innere Medizin: eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis: Eigenverl.; 2011.
5. Krebs in Deutschland 2011/ 2012. 2015. (Accessed 15.05.2016, at [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2015/krebs\\_in\\_deutschland\\_2015.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2015/krebs_in_deutschland_2015.pdf?__blob=publicationFile).)
6. Multiples Myelom. 2013. (Accessed 10.12.2017, at <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@view/html/index.html>.)
7. Hochrechnung des institut für Krebs epidemiologie e.V., Lübeck für icd10: C90 auf Basis der Daten der Krebsregister BY, BR, HB, HH, MV, NI, NW (Reg.Bez. Münster) SL, SN, SH (2005-2009). 2013. at <http://www.gekid.de/>.)
8. Kariyawan CC, Hughes DA, Jayatilake MM, Mehta AB. Multiple myeloma: causes and consequences of delay in diagnosis. *QJM* 2007;100:635-40.
9. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2003;78:21-33.
10. Giuliani N, Rizzoli V, Roodman GD. Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood* 2006;108:3992-6.
11. Solomon A, Weiss DT, Kattine AA. Nephrotoxic potential of Bence Jones proteins. *N Engl J Med* 1991;324:1845-51.
12. Kastiris E, Zagouri F, Symeonidis A, Roussou M, Sioni A, Pouli A, Delimpasi S, Katodritou E, Michalis E, Michael M, Hatzimichael E, Vassou A, Repousis P, Christophoridou A, Kartasis Z, Stefanoudaki E, Megalakaki C, Giannouli S, Kyrtsolis MC, Konstantopoulos K, Spyroupoulou-Vlachou M, Terpos E, Dimopoulos MA, Greek Myeloma Study G. Preserved levels of uninvolved immunoglobulins are independently associated with favorable outcome in patients with symptomatic multiple myeloma. *Leukemia* 2014;28:2075-9.
13. Clinical features, laboratory manifestations, and diagnosis of multiple myeloma - Pathologic features. 2017. (Accessed 26.12.2017, at [https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-laboratory-manifestations-and-diagnosis-of-multiple-myeloma?search=multiple%20myeloma%20IgG%20IgA&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-laboratory-manifestations-and-diagnosis-of-multiple-myeloma?search=multiple%20myeloma%20IgG%20IgA&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1).)

14. Laboratory methods for analyzing monoclonal proteins. 2017. (Accessed 26.12.2017, at [https://www.uptodate.com/contents/laboratory-methods-for-analyzing-monoclonal-proteins?source=see\\_link](https://www.uptodate.com/contents/laboratory-methods-for-analyzing-monoclonal-proteins?source=see_link).)
15. Bartl R, Frisch B. Clinical significance of bone marrow biopsy and plasma cell morphology in MM and MGUS. *Pathol Biol (Paris)* 1999;47:158-68.
16. Rawstron AC, Orfao A, Beksac M, Bezdickova L, Brooimans RA, Bumbea H, Dalva K, Fuhler G, Gratama J, Hose D, Kovarova L, Lioznov M, Mateo G, Morilla R, Mylin AK, Omede P, Pellat-Deceunynck C, Perez Andres M, Petrucci M, Ruggeri M, Rymkiewicz G, Schmitz A, Schreder M, Seynaeve C, Spacek M, de Tute RM, Van Valckenborgh E, Weston-Bell N, Owen RG, San Miguel JF, Sonneveld P, Johnsen HE, European Myeloma N. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008;93:431-8.
17. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, Kumar S, Hillengass J, Kastritis E, Richardson P, Landgren O, Paiva B, Dispenzieri A, Weiss B, LeLeu X, Zweegman S, Lonial S, Rosinol L, Zamagni E, Jagannath S, Sezer O, Kristinsson SY, Caers J, Usmani SZ, Lahuerta JJ, Johnsen HE, Beksac M, Cavo M, Goldschmidt H, Terpos E, Kyle RA, Anderson KC, Durie BG, Miguel JF. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2014;15:e538-48.
18. Smoldering multiple myeloma. 2016. (Accessed 28.12.2017, at [https://www.uptodate.com/contents/smoldering-multiple-myeloma?search=smoldering%20myeloma&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/smoldering-multiple-myeloma?search=smoldering%20myeloma&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1).)
19. Group IMW. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003;121:749-57.
20. Clinical features, laboratory manifestations, and diagnosis of multiple myeloma - Diagnosis. 2017. (Accessed 25.09.2017, at [https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-laboratory-manifestations-and-diagnosis-of-multiple-myeloma?source=search\\_result&search=multiples%20myelom&selectedTitle=1~150](https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-laboratory-manifestations-and-diagnosis-of-multiple-myeloma?source=search_result&search=multiples%20myelom&selectedTitle=1~150) - H10.)
21. Kastritis E, Terpos E, Moulopoulos L, Spyropoulou-Vlachou M, Kanellias N, Eleftherakis-Papaiakovou E, Gkotzamanidou M, Migkou M, Gavriatopoulou M, Roussou M, Tasidou A, Dimopoulos MA. Extensive bone marrow infiltration and abnormal free light chain ratio identifies patients with asymptomatic myeloma at high risk for progression to symptomatic disease. *Leukemia* 2013;27:947-53.
22. Larsen JT, Kumar SK, Dispenzieri A, Kyle RA, Katzmann JA, Rajkumar SV. Serum free light chain ratio as a biomarker for high-risk smoldering multiple myeloma. *Leukemia* 2013;27:941-6.
23. Rajkumar SV, Kyle RA. Haematological cancer: Treatment of smoldering multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10:554-5.

24. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975;36:842-54.
25. Staging and prognostic studies in multiple myeloma. 2017. (Accessed 25.09.2017, at [https://www.uptodate.com/contents/staging-and-prognostic-studies-in-multiple-myeloma?source=search\\_result&search= multiples%20myelom&selectedTitle=3~150](https://www.uptodate.com/contents/staging-and-prognostic-studies-in-multiple-myeloma?source=search_result&search= multiples%20myelom&selectedTitle=3~150).)
26. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, Richardson P, Caltagirone S, Lahuerta JJ, Facon T, Bringhen S, Gay F, Attal M, Passera R, Spencer A, Offidani M, Kumar S, Musto P, Lonial S, Petrucci MT, Orłowski RZ, Zamagni E, Morgan G, Dimopoulos MA, Durie BG, Anderson KC, Sonneveld P, San Miguel J, Cavo M, Rajkumar SV, Moreau P. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2015;33:2863-9.
27. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:3412-20.
28. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, Melton LJ, 3rd. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002;346:564-9.
29. Vrethem M, Cruz M, Wen-Xin H, Malm C, Holmgren H, Ernerudh J. Clinical, neurophysiological and immunological evidence of polyneuropathy in patients with monoclonal gammopathies. *J Neurol Sci* 1993;114:193-9.
30. Diagnosis of monoclonal gammopathy of undetermined significance. 2016. (Accessed 25.09.2017, at [https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-of-monoclonal-gammopathy-of-undetermined-significance?source=search\\_result&search=MGUS&selectedTitle=1~61](https://www.uptodate.com/contents/diagnosis-of-monoclonal-gammopathy-of-undetermined-significance?source=search_result&search=MGUS&selectedTitle=1~61).)
31. Bida JP, Kyle RA, Therneau TM, Melton LJ, 3rd, Plevak MF, Larson DR, Dispenzieri A, Katzmann JA, Rajkumar SV. Disease associations with monoclonal gammopathy of undetermined significance: a population-based study of 17,398 patients. *Mayo Clin Proc* 2009;84:685-93.
32. Gregersen H, Madsen KM, Sorensen HT, Schonheyder HC, Ibsen JS, Dahlerup JF. The risk of bacteremia in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Eur J Haematol* 1998;61:140-4.
33. Rajkumar SV, Kyle RA, Therneau TM, Melton LJ, 3rd, Bradwell AR, Clark RJ, Larson DR, Plevak MF, Dispenzieri A, Katzmann JA. Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2005;106:812-7.
34. Kyle RA, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Kumar S, Cerhan JR, Rajkumar SV. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 2018;378:241-9.
35. Clinical course and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance - Management. 2016. (Accessed 25.12.2017, at <https://www.uptodate.com/contents/clinical->



course-and-management-of-monoclonal-gammopathy-of-undetermined-significance?search=MGUS&source=search\_result&selectedTitle=2~59&usage\_type=default&display\_rank=2 - H22391041.)

36. Bianchi G, Kyle RA, Colby CL, Larson DR, Kumar S, Katzmann JA, Dispenzieri A, Therneau TM, Cerhan JR, Melton LJ, 3rd, Rajkumar SV. Impact of optimal follow-up of monoclonal gammopathy of undetermined significance on early diagnosis and prevention of myeloma-related complications. *Blood* 2010;116:2019-25; quiz 197.
37. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Possinger K. Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica* 2001;86:837-43.
38. Paiva B, Vidriales MB, Cervero J, Mateo G, Perez JJ, Montalban MA, Sureda A, Montejano L, Gutierrez NC, Garcia de Coca A, de Las Heras N, Mateos MV, Lopez-Berges MC, Garcia-Boyer R, Galende J, Hernandez J, Palomera L, Carrera D, Martinez R, de la Rubia J, Martin A, Blade J, Lahuerta JJ, Orfao A, San Miguel JF, Groups GPCS. Multiparameter flow cytometric remission is the most relevant prognostic factor for multiple myeloma patients who undergo autologous stem cell transplantation. *Blood* 2008;112:4017-23.
39. de Tute RM, Jack AS, Child JA, Morgan GJ, Owen RG, Rawstron AC. A single-tube six-colour flow cytometry screening assay for the detection of minimal residual disease in myeloma. *Leukemia* 2007;21:2046-9.
40. Rawstron AC, Child JA, de Tute RM, Davies FE, Gregory WM, Bell SE, Szubert AJ, Navarro-Coy N, Drayson MT, Feyler S, Ross FM, Cook G, Jackson GH, Morgan GJ, Owen RG. Minimal residual disease assessed by multiparameter flow cytometry in multiple myeloma: impact on outcome in the Medical Research Council Myeloma IX Study. *J Clin Oncol* 2013;31:2540-7.
41. Cannizzo E, Bellio E, Sohani AR, Hasserjian RP, Ferry JA, Dorn ME, Sadowski C, Bucci JJ, Carulli G, Preffer F. Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry in multiple myeloma: The diagnostic utility of defining ranges of normal antigenic expression in comparison to histology. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78:231-8.
42. Cannizzo E, Carulli G, Del Vecchio L, Ottaviano V, Bellio E, Zenari E, Azzara A, Petrini M, Preffer F. The role of CD19 and CD27 in the diagnosis of multiple myeloma by flow cytometry: a new statistical model. *Am J Clin Pathol* 2012;137:377-86.
43. Cho YU, Park CJ, Park SJ, Chi HS, Jang S, Park SH, Seo EJ, Yoon DH, Lee JH, Suh C. Immunophenotypic characterization and quantification of neoplastic bone marrow plasma cells by multiparametric flow cytometry and its clinical significance in Korean myeloma patients. *J Korean Med Sci* 2013;28:542-9.
44. Dal Bo S, Pezzi A, Amarin B, Valim V, Isabel Bittencourt R, Silla L. Detection of minimal residual disease by flow cytometry for patients with multiple myeloma submitted to autologous hematopoietic stem cell transplantation. *ISRN Hematol* 2013;2013:847672.
45. Gupta R, Bhaskar A, Kumar L, Sharma A, Jain P. Flow cytometric immunophenotyping and minimal residual disease analysis in multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 2009;132:728-32.

46. Jeong TD, Park CJ, Shim H, Jang S, Chi HS, Yoon DH, Kim DY, Lee JH, Lee JH, Suh C, Lee KH. Simplified flow cytometric immunophenotyping panel for multiple myeloma, CD56/CD19/CD138(CD38)/CD45, to differentiate neoplastic myeloma cells from reactive plasma cells. *Korean J Hematol* 2012;47:260-6.
47. Liu H, Yuan C, Heinerich J, Braylan R, Chang M, Wingard J, Moreb J. Flow cytometric minimal residual disease monitoring in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: a retrospective study. *Leuk Lymphoma* 2008;49:306-14.
48. Paiva B, Vidriales MB, Rosinol L, Martinez-Lopez J, Mateos MV, Ocio EM, Montalban MA, Cordon L, Gutierrez NC, Corchete L, Oriol A, Terol MJ, Echeveste MA, De Paz R, De Arriba F, Palomera L, de la Rubia J, Diaz-Mediavilla J, Granell M, Gorosquieta A, Alegre A, Orfao A, Lahuerta JJ, Blade J, San Miguel JF. A multiparameter flow cytometry immunophenotypic algorithm for the identification of newly diagnosed symptomatic myeloma with an MGUS-like signature and long-term disease control. *Leukemia* 2013;27:2056-61.
49. Peceliunas V, Janiulioniene A, Matuzeviciene R, Griskevicius L. Six color flow cytometry detects plasma cells expressing aberrant immunophenotype in bone marrow of healthy donors. *Cytometry B Clin Cytom* 2011;80:318-23.
50. Perez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G, Garcia-Sanz R, Mateos MV, de Coca AG, Galende J, Martin-Nunez G, Alonso JM, de Las Heras N, Hernandez JM, Martin A, Lopez-Berges C, Orfao A, San Miguel JF. New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007;110:2586-92.
51. Robillard N, Wuilleme S, Moreau P, Bene MC. Immunophenotype of normal and myelomatous plasma-cell subsets. *Front Immunol* 2014;5:137.
52. Spears MD, Olteanu H, Kroft SH, Harrington AM. The immunophenotypic stability of plasma cell myeloma by flow cytometry. *Int J Lab Hematol* 2011;33:483-91.
53. Multiple Myeloma Diagnostic Criteria. 2017. (Accessed 28.12.2017, at <https://www.mdapp.co/multiple-myeloma-diagnostic-criteria-calculator-341/>.)
54. Bortz J, Lienert GA. *Kurzgefasste Statistik für die klinische Forschung: Leitfaden für die verteilungsfreie Analyse kleiner Stichproben*: Springer-Verlag; 2008.
55. Buss DH, Prichard RW, Hartz JW, Cooper MR. Comparison of the usefulness of bone marrow sections and smears in diagnosis of multiple myeloma. *Hematol Pathol* 1987;1:35-43.
56. Terpstra WE, Lokhorst HM, Blomjous F, Meuwissen OJ, Dekker AW. Comparison of plasma cell infiltration in bone marrow biopsies and aspirates in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 1992;82:46-9.
57. Stifter S, Babarovic E, Valkovic T, Seili-Bekafigo I, Stemberger C, Nacinovic A, Lucin K, Jonjic N. Combined evaluation of bone marrow aspirate and biopsy is superior in the prognosis of multiple myeloma. *Diagn Pathol* 2010;5:30.

58. Ely SA, Knowles DM. Expression of CD56/neural cell adhesion molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance and lymphomas with plasmacytoid differentiation. *Am J Pathol* 2002;160:1293-9.
59. Veillon DM, Cotelingam JD. Pathologic studies useful for the diagnosis and monitoring of plasma cell dyscrasias. *Contrib Nephrol* 2007;153:25-43.
60. Matsue K, Matsue Y, Kumata K, Usui Y, Suehara Y, Fukumoto K, Fujisawa M, Narita K, Takeuchi M. Quantification of bone marrow plasma cell infiltration in multiple myeloma: usefulness of bone marrow aspirate clot with CD138 immunohistochemistry. *Hematol Oncol* 2017;35:323-8.
61. Babarovic E, Valkovic T, Stifter S, Budisavljevic I, Seili-Bekafigo I, Duletic-Nacinovic A, Lucin K, Jonjic N. Assessment of bone marrow fibrosis and angiogenesis in monitoring patients with multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 2012;137:870-8.
62. Kaur M, Singh Rana AP, Kapoor S, Puri A. Diagnostic value of bone marrow aspiration and biopsy in routine hematology practice. *J Clin Diagn Res* 2014;8:FC13-6.
63. Scudla V, Adam Z. [Diagnostic importance and pitfalls of evaluating bone marrow smear preparation in multiple myeloma]. *Vnitr Lek* 2006;52 Suppl 2:55-65.
64. Tran DN, Smith SA, Brown DA, Parker AJ, Joseph JE, Armstrong N, Sewell WA. Polychromatic flow cytometry is more sensitive than microscopy in detecting small monoclonal plasma cell populations. *Cytometry B Clin Cytom* 2017;92:136-44.
65. Manasanch EE, Salem DA, Yuan CM, Tajeja N, Bhutani M, Kwok M, Kazandjian D, Carter G, Steinberg SM, Zuchlinski D, Mulquin M, Calvo K, Maric I, Roschewski M, Korde N, Braylan R, Landgren O, Stetler-Stevenson M. Flow cytometric sensitivity and characteristics of plasma cells in patients with multiple myeloma or its precursor disease: influence of biopsy site and anticoagulation method. *Leuk Lymphoma* 2015;56:1416-24.
66. Paiva B, Vidriales MB, Perez JJ, Mateo G, Montalban MA, Mateos MV, Blade J, Lahuerta JJ, Orfao A, San Miguel JF. Multiparameter flow cytometry quantification of bone marrow plasma cells at diagnosis provides more prognostic information than morphological assessment in myeloma patients. *Haematologica* 2009;94:1599-602.
67. Smock KJ, Perkins SL, Bahler DW. Quantitation of plasma cells in bone marrow aspirates by flow cytometric analysis compared with morphologic assessment. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:951-5.
68. Gupta S, Karandikar NJ, Ginader T, Bellizzi AM, Holman CJ. Flow cytometric aberrancies in plasma cell myeloma and MGUS - correlation with laboratory parameters. *Cytometry B Clin Cytom* 2018.
69. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, Gonzalez M, Garcia-Sanz R, Lopez-Berges C, Moro MJ, Hernandez J, Escribano L, Caballero D, Rozman M, San Miguel JF. Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol* 1998;152:1655-65.

70. Gressier M, Chaquin M, Lhermitte L, Asnafi V, Macintyre E, Brouzes C. [Utility of 8-colours multiparameter flow cytometry immunophenotyping of plasma cells for the management of monoclonal gammopathy]. *Ann Biol Clin (Paris)* 2013;71:313-23.
71. Tembhare PR, Yuan CM, Venzon D, Braylan R, Korde N, Manasanch E, Zuchlinsky D, Calvo K, Kurlander R, Bhutani M, Tajeja N, Maric I, Mulquin M, Roschewski M, Kwok M, Liewehr D, Landgren O, Stetler-Stevenson M. Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases. *Leuk Res* 2014;38:371-6.
72. Cesana C, Klersy C, Barbarano L, Nosari AM, Crugnola M, Pungolino E, Gargantini L, Granata S, Valentini M, Morra E. Prognostic factors for malignant transformation in monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2002;20:1625-34.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, *Katharina Kunz*, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Bedeutung der Durchflusszytometrie im Kontext der Diagnostik des Multiplen Myeloms* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn PD. Dr. med. Jan Eucker, für die gut strukturierte Betreuung sowie für die Unterstützung bei der Themenfindung und der anschließenden Umsetzung danken.

Dr. med. Jan-Piet Habbel danke ich für das hervorragende Mentoring und für die Geduld während der Datenerhebung und -auswertung im Rahmen dieser Dissertation. Ebenfalls möchte ich mich für die mühevollen Arbeit des wiederholten Korrekturlesens herzlich bedanken.

Ebenfalls möchte ich meinem Ehemann danken, der mir bei der statistischen Auswertung und der Erstellung der Graphiken zur Seite stand und mich stets motiviert und mental unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mein Studium in dieser Form ermöglicht haben und meine Entscheidungen immer unterstützt und respektiert haben.