

Zur Ultrastruktur und Cytochemie von eosinophil-myelomonocytären Leukämien

Uwe Wulfhekel, Jochen Düllmann, Heinrich Bartels und Kurt Hausmann

Abteilung für Mikroskopische Anatomie, Universität Hamburg,
Hämatologische Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses St. Georg, Hamburg
und I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Medizinischen Hochschule Lüneburg

Eingegangen am 23. Oktober 1974

On the Ultrastructure and Cytochemistry of Eosinophil-Myelomonocytic Leukemias

Summary. In the bone marrow of two patients with acute leukemia 46% and 55% of atypical eosinophilic cells were found, respectively. Blood eosinophilia was absent. The N-AS-D-Cl-Esterase reaction of the granules was positive in the first case in 58%, and in the second case in 3% of the eosinophils, as well as the PAS-reaction in all cells of this series.

The ultrastructure of the eosinophils reveals nuclear maturation up to hypersegmentation. The maturation of the granules, in part of abnormal size, is arrested at the primary stage. Typical secondary granules with cristalloid cores are lacking. Only in the first case a few, small, semicircular or circular profiles of lamellar substructure are seen in the granules. The cytoplasm of hypersegmentated eosinophils shows an abnormally high glycogen content.

Besides the eosinophils, monocytic cells and their precursors proliferate in the bone marrow of the first patient. In the second patient myeloblasts, promyelocytes with Auer rods, and monocytic cells characterize further neoplastic cell populations. The elements of the monocytic series can be identified by their ultrastructural features, such as irregular configuration of the nuclei, bundles of cytoplasmatic microfilaments, and numerous small electron-dense lysosomal granules. In both cases the Alpha-Naphthyl-Acetate-Esterase reaction is weakly positive.

The findings presented are summarized under the terms "eosinophil-monocytic leukemia" and "eosinophil-myelomonocytic leukemia" (collective term).

Key words: Acute Leukemia — Myelomonocytic Type — Eosinophils — Cytochemistry — Electronmicroscopy.

Zusammenfassung. Bei zwei Patienten mit akuter Leukämie wurden im Knochenmark 46% bzw. 55% atypische eosinophile Zellen gefunden. Eine Bluteosinophilie fehlte. Die N-AS-D-Cl-Esteraseaktivität der Granula war im ersten Fall in 58%, im zweiten in 3% der Eosinophilen, die PAS-Reaktion in allen Zellen dieser Reihe positiv.

Ultrastrukturell zeigen die Eosinophilen auch bei Kernreifung bis zur Hypersegmentation fast ausschließlich z.T. abnorm große Primärgranula. Typische Sekundärgranula mit kristalloiden Internia fehlen in beiden Fällen. Lediglich im ersten Fall sind vereinzelt kleine, haken- oder ringförmige lamelläre Strukturen in den Granula nachweisbar. Das Cytoplasma kleiner, übersegmentierter Eosinophiler weist einen abnorm großen Glykogengehalt auf.

Neben den Eosinophilen proliferieren im Knochenmark im ersten Fall ausschließlich monocytoide Zellen und deren Vorstufen, im zweiten Myeloblasten, Promyelocyten mit Auer-Stäbchen und monocytoide Zellen. Die Elemente der monocytären Reihe lassen sich aufgrund feinstruktureller Merkmale wie unregelmäßig konfigurierter und gelappter Kerne, Bündel cytoplasmatischer Mikrofilamente und zahlreicher, kleiner, elektronendichter lysosomaler Granula identifizieren. In beiden Fällen ist die Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase-Reaktion nur schwach ausgeprägt.

Die vorgelegten Befunde werden unter den Begriffen „eosinophil-monocytäre“ und „eosinophil-myelomonocytäre Leukämie“ (Sammelbegriff zusammengefaßt).

Als eosinophile Leukämien wurden immer wieder uneinheitliche Krankheitsbilder mit akutem oder chronischem Verlauf beschrieben (Friedmann *et al.*, 1944; Evans und Nesbit, 1949; Gray *et al.*, 1949; Piney, 1949; Hule, 1950; Carmel *et al.*, 1951; Dittrich, 1952; Hyman und Jarrold, 1952; Gross *et al.*, 1955; Fadell *et al.*, 1957; Chen und Smith, 1960; Bentley *et al.*, 1961; Panoff, 1962; Papageorgiou, 1962; Lakos *et al.*, 1963; Mallarmé *et al.*, 1964; Hauswaldt *et al.*, 1967; Ullmann und Heine, 1973).

Aus heutiger Sicht gelang in vielen der mitgeteilten Fälle keine klare Abgrenzung von hochgradigen Eosinophilien im Rahmen anderer myeloproliferativer Prozesse (Bousser, 1957), disseminierter eosinophiler Kollagenkrankheiten (Engfeldt und Zetterström, 1956; Bousser, 1957; Odeberg, 1965; Pierce *et al.*, 1967) oder leukämoider Reaktionen.

Neue Aspekte ergaben sich aus cytochemischen und ultrastrukturellen Befunden. Bei bisher 7 Patienten mit unreifzelligen Leukämien wurden Eosinophile mit positiver Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-Reaktion ihrer Granula beobachtet (Löffler, 1969, 1972; Leder, 1970; Schaefer *et al.*, 1972, 1973). Eine solche cytochemische Reaktion fehlt den normalen Eosinophilen und wurde auch bei Eosinophilien im Zusammenhang mit anderen myeloproliferativen Prozessen wie der CML, eosinophilen Kollagenkrankheiten und leukämoiden Reaktionen vermißt. Ultrastrukturell zeigten Eosinophile akuter Leukosen im Leukocytenkonzentrat eines N-AS-D-Cl positiven (Schaefer *et al.*, 1972, 1973) sowie im Knochenmark eines cytochemisch negativen Falls (Ackerman, 1964) als übereinstimmende Atypien eine asynchrone Kern- und Cytoplasmareifung, einen abnorm hohen Glykogengehalt ihres Cytoplasma und cytoplasmatische Filamente.

In dieser Untersuchung wird berichtet über zwei Patienten mit akuter Leukämie, die als gemeinsames Merkmal eine starke Vermehrung atypischer eosinophiler Zellen im Knochenmark aufweisen. Es ist die Aufgabe dieser Arbeit, die Eosinophilen und weitere am leukämischen Prozeß beteiligte Zellpopulationen des Knochenmarks cytologisch zu analysieren. Im ersten Fall, einer eosinophil-monocytären Leukämie, überwiegen eosinophile Granulocyten mit positiver Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-Reaktion, im zweiten Fall, einer eosinophil-myelomonocytären Leukämie, zeigen nur wenige Eosinophile dieses Verhalten. Im Gegensatz dazu ähneln sich die ultrastrukturellen Befunde an den leukämischen Eosinophilen beider Fälle bis auf eine unterschiedlich ausgeprägte Störung der Granulareifung. Die Elemente der monocytären Reihe zeigen die bei myelomonocytären und monocytären Leukämien beschriebenen feinstrukturellen Merkmale, jedoch nur eine schwach ausgeprägte Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase-Reaktion.

Material und Methode

Die Patienten wurden in der Hämatologischen Abteilung des Allgemeinen Krankenhauses St. Georg, Hamburg (Fall I) und in der I. Medizinischen Klinik der Medizinischen Hochschule Lübeck (Fall II) stationär und ambulant behandelt. Die hämatologische Diagnostik erfolgte mit den üblichen Standardmethoden. Über die Blutbilddaten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung informiert Tabelle 1. Die weiterführende hämatologische Diagnostik und Verlaufskontrollen an Knochenmarkpunktaten und Leukocytenkonzentraten erfolgte mit den folgenden Techniken: Lichtmikroskopisch-cytochemische Untersuchungen. Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase (Leder, 1967), Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase (Leder, 1967), Peroxydase (Leder, 1967), PAS-Reaktion, Eosinophilenfärbung mit Biebricher Scharlach (Schaefer und Fischer,

Tabelle 1. Blutbilddaten

Fall	Initialen Alter Geschlecht	Hämatokrit (%)	Thrombo- cyten (mm ³)	Leuko- cyten (mm ³)	Diff.-Blutbild
I	J.H. 31 J. ♂	22,7	2200	11570	Baso 3 Eo 6 Myel 2 Meta 1 Stab 4 Segm 9 Lymph 32 Mono 21 blastenähnliche Zellen 22
I Rezidiv	J.H. 31 J. ♂	40,4	41400	58000	Baso 1 Segm 3 Lymph 5 Mono 6 blastenähnliche Zellen 85
II	N.M. 35 J. ♂	21	31000	27800	Baso 1 Eo 4 Segm 1 Lympho 17 blastenähnliche Zellen 77

1968). Semidünnschnittshistologie und Elektronenmikroskopie. Immersionsfixierung des durch Sternalpunktion gewonnenen Knochenmarks in 6%igem gepufferten Glutaraldehyd. Nachfixierung in 1%igem Osmiumtetroxid (Phosphatpuffer 0,1 M unter Zusatz von 0,1 M Saccharose). Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, Einbettung in Epon 812. Anfertigung von Fein- und Semidünnschnitten mit dem Ultramikrotom Om U 2 der Fa. Reichert.

Kontrastierung der Feinschnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat nach Reynolds (1963). Färben der Semidünnschnitte mit Toluidinblau-Pyronin nach Ito und Winchester (1963). Elektronenmikroskope: Zeiss EM 9 und Philips EM 300.

Bei beiden Patienten konnten durch eine kombinierte Cytostatikatherapie Vollremissionen der Hämoblastose erreicht werden. 4 Wochen nach der letzten Gabe einer Cytostaticakombination kam es in Fall I zu einem Leukämie rezidiv (Blutbild s. Tabelle 1).

Eigene Beobachtungen

Lichtmikroskopische Befunde

Die Knochenmarksausstriche beider Fälle sind zellreich. Fettmarkanteile fehlen. Normale Elemente der Erythro- und Myelopoese sowie Megakaryocyten sind hochgradig vermindert. Die Myelogramme gibt Tabelle 2 wieder. Auffällig ist die Größenvariabilität der Eosinophilen sowie ihrer Granula. Es finden sich alle Übergänge von Zellen mit basophilem Cytoplasma und großen, blassen sowie basophilen Progranula zu Zellen mit farblich stark ausgeprägter Eosinophilie. In vielen Zellen sind die Granula größer als in normalen Eosinophilen. In Fall I ist die Granulation oft so dicht, daß sie den Kern überdeckt. So ist das Auszählen der Kernsegmente vieler Zellen nicht möglich. Weniger dicht gepackt sind die Granula in Fall II. Obgleich hier Eosinophile mit basophilen Progranula häufiger sind, erscheinen sie, erkennbar an Kernstruktur und Zellgröße, ausgereifter. Häufig sind sie übersegmentiert: 19% enthalten zwei, 49% drei, 29% vier und 3% fünf Kernsegmente.

Bei den Monocytoiden, die in Fall I häufiger als in Fall II vorkommen (s. Tabelle 2), handelt es sich um große Zellen mit breitem basophilem Cytoplasma und feiner, azurophiler Granulation, deren Kerne vielfach gelappt sind (Promonocyten) und kleineren monocytähnlichen Zellen mit schwach basophilem

Tabelle 2. Knochenmark bei Diagnosestellung (Myelogramm des Pappenheimpräparats)

Zellart	Fall I (%)	Fall II (%)
Eosinophile	46	55
Monocytoide (Pro- und Paramonocyten)	20	6
Blastenähnliche Zellen	12	21
Promyelocyten mit Auerstäbchen	0	4
Zellen der neutrophilen Myelopoese	8	3
Lymphocyten	10	6
Restliche Zellen (Erythroblasten Plasmazellen Makrophagen)	4	5

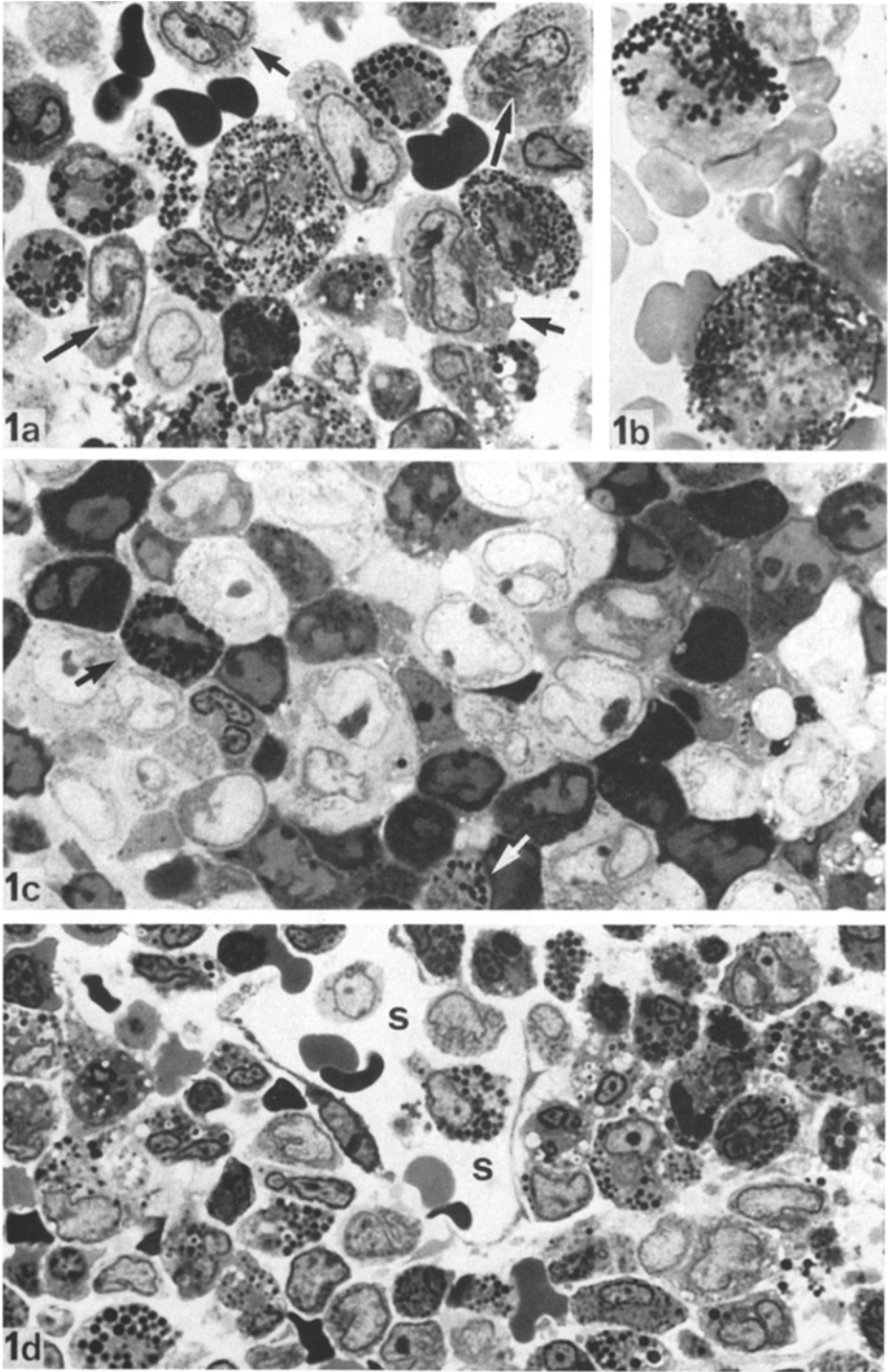
Cytoplasma und gleichartiger Kernlappung (Paramonocyten). Der Anteil blastenähnlicher, nicht näher zu differenzierender Zellen ist in Fall II größer (s. Tabelle 2).

Die Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-Reaktion ist in Fall I bei 58%, in Fall II bei 3% der Eosinophilen positiv (Abb. 1 b). Die Aktivität ist in Fall I bei $\frac{2}{3}$ der Zellen stark positiv und an die Granula gebunden; das restliche Drittel wie auch die positiven Eosinophilen von Fall II zeigen eine schwächere Reaktion. Die Peroxydasereaktion ist in den Eosinophilen beider Fälle kräftig positiv und läßt die Größenvariabilität der Granula besonders gut erkennen. Bei der PAS-Reaktion ergibt sich für beide Fälle am Ausstrich wie auch im Eponschnitt eine Positivität der eosinophilen Granula. Reifere Zellen zeigen zusätzlich einen ungewöhnlich starken Reaktionsausfall im Cytoplasma. Mit der spezifischen Eosinophilenfärbung durch Biebricher Scharlach stellen sich die Granula sämtlicher Eosinophilen kräftig dar.

Die restlichen Knochenmarkszellen weisen in beiden Fällen ein unterschiedliches cytochemisches Verhalten auf. In Fall I sind neben den Eosinophilen 24% der Zellen N-AS-D-Cl positiv. Es handelt sich überwiegend um Monocytoide, sehr wenige Blasten und die zahlenmäßig stark verminderten Elemente der neutrophilen Myelopoese. 70% zeigen eine überwiegend feingranuläre Reaktion der Peroxydase. Die Aktivität ist in der Mehrzahl der monocytoiden und blastenähnlichen Zellen sowie in den Resten der neutrophilen Reihe lokalisiert. Die Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase-Reaktion ist in den monocytoiden Zellen mit einem Stärkegrad 1—2 ungewöhnlich schwach ausgeprägt. 50% der im Pappenheimpräparat nicht differenzierbaren Zellen weisen dies Enzym in gleicher Reaktions-

Abb. 1 a—d. (a) und (b) Knochenmark, Fall I. (a) Eosinophile unterschiedlichen Reifegrades mit größenvariabler Granulation herrschen vor. Monocytoide Zellen (\uparrow). (b) Kräftige N-AS-D-Chloracetat-Esterase-Reaktion der eosinophilen Granula. (c) Knochenmark, Fall I, Rezidiv. Starke Vermehrung von monocytoiden Blasten und Promonocyten. Eosinophile (\uparrow) treten zahlenmäßig stark zurück. Beachte die dunklen Zellen und ihre Größenverminderung. (d) Knochenmark, Fall II. Eosinophile unterschiedlicher Reife und Granulagröße überwiegen. Im Sinuslumen (S) eine eosinophile Zelle und blastenähnliche Elemente. (a, c, d) Epon,

Toluidinblau-Pyronin, (b) N-AS-D-Chloracetat-Esterase. Vergr. 1260fach



stärke auf. Ein kräftigeres, körniges Reaktionsprodukt der Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase wird nur in 15% der Blasten erreicht. In Fall II sind neben den Eosinophilen 14% der Knochenmarkzellen N-AS-D-Cl positiv. Hierbei handelt es sich um Monocytoide und einzelne Blasten sowie um die spärlich vertretenen Elemente der neutrophilen Myelopoese. Eine positive Peroxydasereaktion zeigen 60% der nichteosinophilen Knochenmarkzellen. Die Aktivität ist lokalisiert in 75% der Blasten, in Promyelocyten, die z.T. Auer-Stäbchen enthalten, sowie vereinzelt in Monocytoiden und neutrophilen Granulocyten. Die Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase-Reaktion ist bei einem schwach positiven Ausfall des Stärkegrades 0—1 in 25% der Knochenmarkzellen ohne Aussagekraft.

Im Rezidiv von Fall I (Blutbild s. Tabelle 1) haben die blastenähnlichen Zellen des peripheren Bluts mit gelappten Kernen ein monocytoides Aussehen. Von ihnen zeigen 32% eine schwach positive Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase-Reaktion. 16% sind peroxydasepositiv.

Im Eponschnitt des Knochenmarks wird das Bild in beiden Fällen von atypischen Eosinophilen beherrscht, deren Granulation sich im Toluidinblau-Pyronin gefärbten Präparat kräftig blau darstellt (Abb. 1a, d). Die Kerne sind gelappt, segmentiert oder übersegmentiert. In Fall I ist die Größenvariabilität der Eosinophilen besonders ausgeprägt. Sie erstreckt sich von 18 μm großen Zellen mit feinen Granula bis zu kleinsten Elementen von 9 μm Durchmesser mit großen Granula (Abb. 1a). Die unregelmäßige Kernkonfiguration der monocytoiden Elemente tritt im Semidünnschnitt deutlicher als im Ausstrichpräparat in Erscheinung. Im Rezidiv von Fall I besteht das Knochenmark fast ausschließlich aus unreifen monocytoiden Elementen (Abb. 1c). Sie verhalten sich färberisch gegenüber Toluidinblau-Pyronin uneinheitlich. Neben großen, blassen Formen liegen kleine, dunkle Zellen mit intensiv blau gefärbtem Cytoplasma und Kern. Der Anteil eosinophiler Zellen ist gegenüber 46% bei Diagnosestellung auf 8% verringert.

Elektronenmikroskopische Befunde

Eosinophile Zellen

Die Eosinophilen beider Fälle besitzen überwiegend runde bis ovale, membran-gebundene, homogen elektronendichte Granula, die strukturell normalen eosinophilen Primärgranula (Cawley und Hayhoe, 1973) entsprechen (Abb. 2a, 3a, b, 7). Ihr Durchmesser beträgt maximal 1,9 μm . Sie formieren sich aus Vorstufen, deren zunächst lockeres, granuläres Material sich in großen, annähernd runden Vesikeln sammelt und kondensiert (Abb. 2a). Eine Beteiligung des Golgiapparates an der Granulabildung liegt nahe. In seinen Vesikeln wird häufig ähnlich elektronendichtes Material beobachtet (Abb. 3a, b). Das für reife eosinophile Granula (Sekundärgranula) charakteristische kristalloide Internum fehlt im Fall II völlig. Wenige eosinophile Granula von Fall I enthalten halbrunde oder ringförmige Strukturen mit periodischem, lamellären Aufbau, welche Vorstufen von Internum darstellen mögen (Abb. 2b, c, 3a). Die Periodizität beträgt 110 Å. Es kommen maximal 14 Lamellen vor.

Da die Granulogenese der Eosinophilen beider Fälle unvollständig ist, kann sie kein Kriterium zur Bestimmung des Reifegrades dieser Zellen sein. Auch Kern-

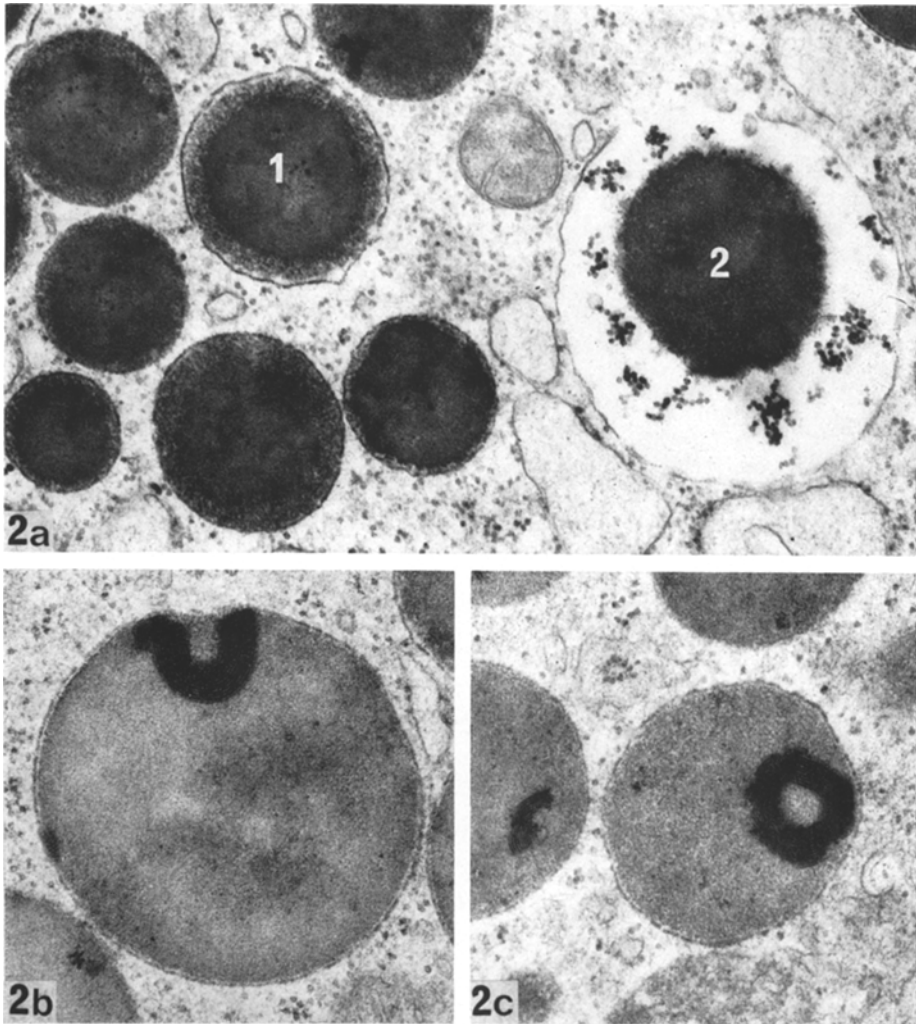
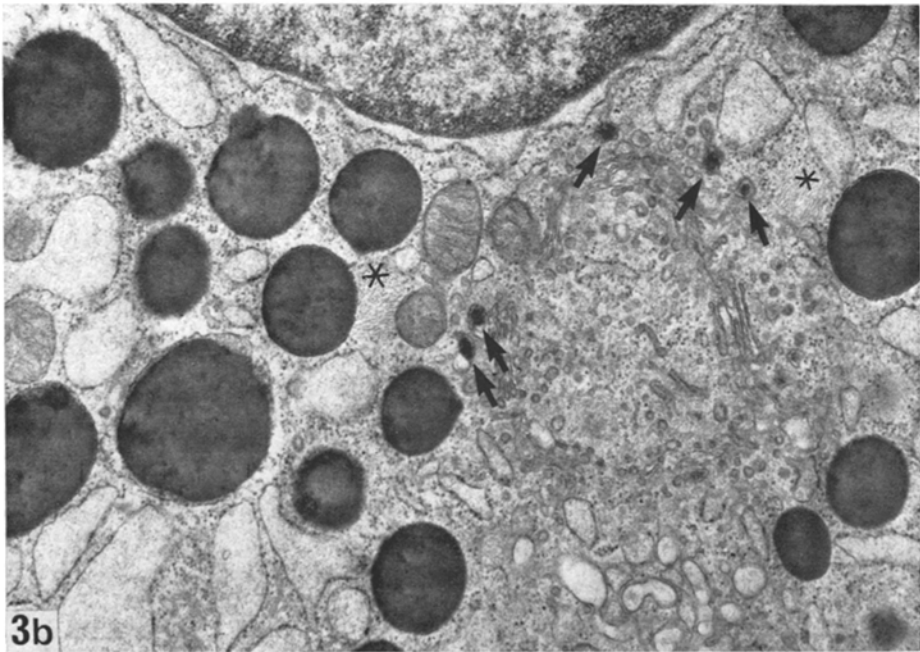
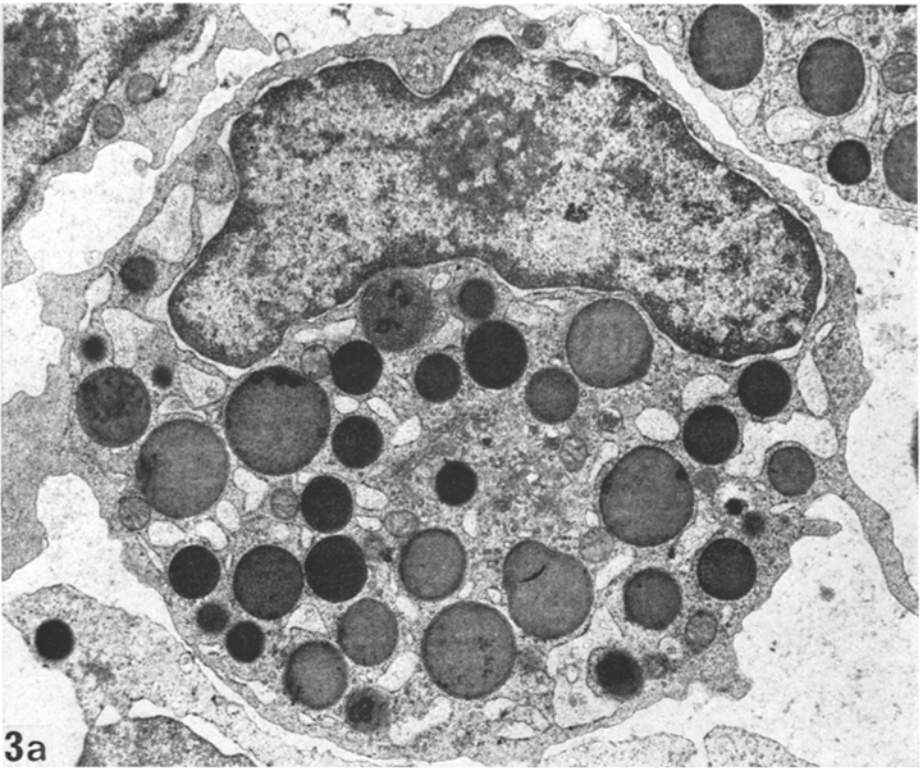


Abb. 2a—c. Knochenmark, Fall I. Eosinophile Granula. (a) 1 in der Peripherie noch nicht kondensiertes Primärgranulum, 2 Granulum mit hellem Hof, in dem Partikel liegen, die Glykogengranula gleichen. (b) und (c) Granula mit lamellären Strukturen, die unvollständig entwickelten Interna entsprechen. Vergr. 40000fach

struktur und Organellenausstattung des Cytoplasma lassen nur bedingt eine Zuordnung zu den bekannten Reifungsstufen der normalen Eosinophilenreihe zu.

Promyelocytäre Zellen lassen sich jeweils abgrenzen. Sie besitzen einen noch nicht segmentierten, aber meist eingebuchteten Kern mit großem Nucleolus und lockerem, an der Kernmembran angedeutet kondensierten Chromatin (Abb. 3a, b). Wie bei normalen Promyelocyten finden sich zahlreiche, weitgestellte Zisternen des endoplasmatischen Reticulum, das einen nur spärlichen Ribosomenbesatz aufweist. Freie Ribosomen sind reichlich und gleichmäßig im Cytoplasma verteilt.



Ein kräftig entwickelter Golgiapparat und die Hauptmasse der Granula liegen dem Kern gegenüber (Abb. 3a, b). Weiterhin werden selten Granula angetroffen, die aus einem elektronendichten Kern mit hellem Hof bestehen (Abb. 2a). Dieser enthält in unterschiedlichem Ausmaß dichte Partikel, die in ihrer Struktur, Größe und Anordnung Glykogengranula gleichen. Die von Scott und Horn (1970) bei normalen Eosinophilenvorstufen beschriebenen „intracellulären Sinusoide“ mit Ansammlungen von Granulamaterial und deren Exocytose werden in diesen promyelocytären Formen gesehen. Der Zelltyp enthält weiterhin Bündel cytoplasmatischer Mikrofilamente (Abb. 3b).

Jenseits des promyelocytären Stadiums führt die Kernreifung, erkennbar am Schwinden der Nucleolen und zunehmender Heterochromatinkondensation, über eine vielfache Kernlappung zu übersegmentierten Zellen, die in Fall II besonders häufig sind. Ihr Cytoplasma enthält ebenfalls eosinophile Primärgranula, Granula mit inkompletten Internumstrukturen kommen nur in Fall I gelegentlich vor. Wie reife Granulocyten weisen diese Zellen einen geringen Gehalt an rauhem endoplasmatischem Reticulum, freien Ribosomen und Mitochondrien auf. Während die Einlagerung paraplasmatischer Substanzen in Form von Lipoidtropfen das übliche Maß in reifen Eosinophilen nicht übersteigt, ist der Glykogengehalt des Cytoplasma vieler Zellen abnorm groß (Abb. 11). Auch bei den reifsten Zellen bleibt der Golgiapparat relativ groß. Das fast ausschließliche Vorkommen von Primärgranula in Eosinophilen mit bizarr übersegmentierten und kondensierten Kernen macht eine Dissoziation von Kern- und Granulareifung besonders deutlich.

Monocytoide Blasten und Myeloblasten

Ultrastrukturell lassen sich unter den blastenähnlichen Elementen in beiden Fällen zwei Formen unterscheiden: monocytoide Blasten und Myeloblasten. Die monocytoiden Blasten sind gekennzeichnet durch unregelmäßig konfigurierte, oft mehrfach eingebuchtete und Invaginationen aufweisende Kerne, deren Chromatin locker ist. Ihre prominenten Nucleolen zeigen ein deutliches Nucleolonema. Das breite Cytoplasma enthält reichlich freie und zu Polysomen aneinander gelagerte Ribosomen, in wechselndem Umfang kurze Mitochondrien, enge Schläuche des rauhen endoplasmatischen Reticulum und gelegentlich Bündel von Mikrofilamenten (Abb. 10). Davon abzugrenzen sind Myeloblasten mit annähernd rundem Kern, lockerem Chromatin und prominenten, überwiegend der Kernmembran anliegenden Nucleolen, deren Nucleolonema gleichfalls klar hervortritt. Ihr schmales Cytoplasma enthält mit Ausnahme von Mikrofilamenten eine ähnliche Organellenausstattung wie das der monocytoiden Blasten. Als Myeloblasten geben sich diese Zellen auch dadurch zu erkennen, daß sich von ihnen Übergangsformen zu eosinophilen und nur in Fall II auch zu neutrophilen Promyelocyten mit Auer-Stäbchen finden lassen.

Abb. 3. (a) Knochenmark, Fall I. Eosinophiler Promyelocyt mit charakteristisch weitem rauhen endoplasmatischen Reticulum. Einige Granula enthalten unvollständig entwickelte Internumstrukturen (vgl. Abb. 2b, c). Vergr. 9000fach. (b) Knochenmark, Fall I. Eosinophiler Promyelocyt mit Primärgranula. Bündel cytoplasmatischer Mikrofilamente (*).

Elektronendichtes Material in Vesikeln des Golgiapparates (†)

Monocytoide Zellen

Die monocytoiden Blasten differenzieren sich, wie an verschiedenen Zwischenformen abzulesen ist, zu promonocyten- und monocytenähnlichen Zellen, die wir als Monocytoide zusammenfassen. Hauptmerkmal dieser Zellen ist ihr ebenfalls mehrfach eingebuchteter, segmentierter und Invaginationen aufweisender Kern. Sie unterscheiden sich von den monocytoiden Blasten durch eine mit der Reifung zunehmende Kondensation des Heterochromatins an der inneren Kernmembran und durch das Vorkommen von kleinen, runden, membrangebundenen und elektronendichten Granula, welche gleichmäßig über das Cytoplasma verteilt sind. Es enthält außerdem einen großen Golgiapparat, reichlich Mitochondrien und zahlreiche Profile eines rauhen endoplasmatischen Reticulum (Abb. 4a, b, 5, 7, 9). Weitere Hinweise für die Zugehörigkeit dieser Zellen zur monocytären Reihe ergeben sich aus dem häufigen Vorkommen gebündelter cytoplasmatischer Mikrofilamente (Abb. 5, 6) und dem Fortsatzreichtum ihrer Oberfläche. In Fall II differenzieren sich die monocytoiden Blasten nur selten über ein promonocytäres Stadium hinaus. Elektronenoptisch zeigt sich, daß im Rezidiv von Fall I der überwiegende Anteil der Knochenmarkszellen den beschriebenen monocytoiden Blasten und Promonocyten entspricht. Die dunklen Zellen stellen keine gesonderte Population dar. Es handelt sich um Verdichtungen von Cytoplasma und Karyoplasma, von denen nicht nur die pathologischen Zellen, sondern auch die verbliebenen normalen Elemente des Knochenmarks betroffen sind (Abb. 9). Die Größenverminderung der dunklen Zellen läßt auf Schrumpfungsvorgänge schließen.

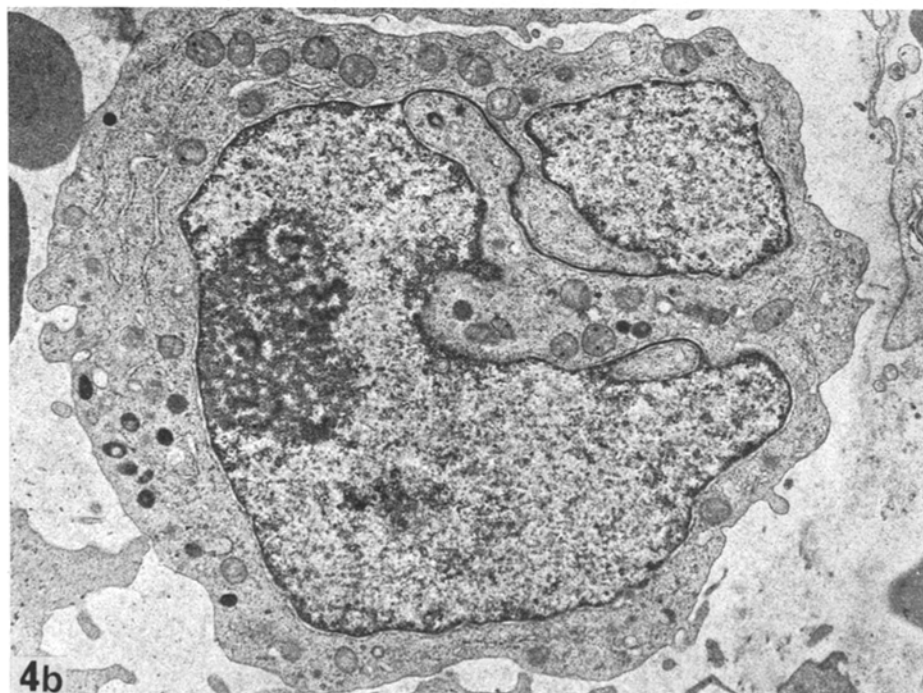
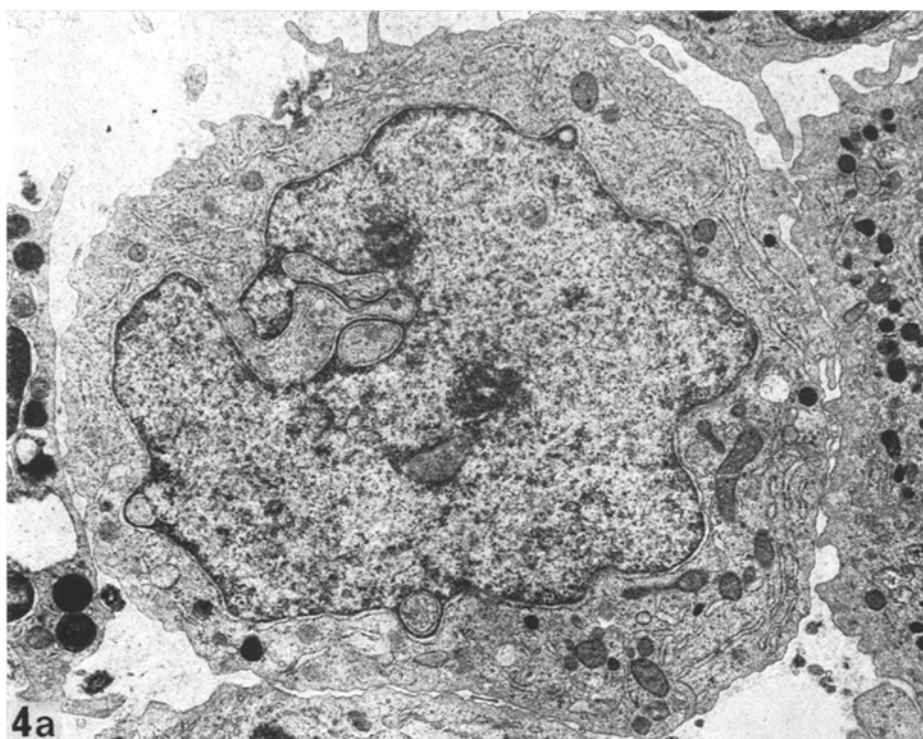
In beiden Fällen werden häufig Knochenmarksmakrophagen angetroffen, in deren Cytoplasma phagocytierte, unterschiedlich weit abgebaute eosinophile Zellen, Reste phagocytierte Erythrocyten und große Lysosomen liegen (Abb. 8). Charcot-Leydensche Kristalle als Abbauprodukte eosinophiler Granula finden sich nicht.

Auffällig ist, daß alle genannten pathologischen Zellen sich auch im Sinusystem des Knochenmarks finden lassen. Gelegentlich sieht man sie in Lücken der aus einer dünnen, diskontinuierlichen Cytoplasmaschicht von Endothelzellen bestehenden Sinuswand. Cytoplasma und Kern erfahren beim Durchtritt eine Einschnürung, wie sie für migrierende Leukocyten typisch ist (Abb. 7).

Diskussion

Die von uns untersuchten Leukämien haben als gemeinsames Merkmal eine starke Vermehrung atypischer eosinophiler Zellen im Knochenmark. Daneben kommen eine ebenfalls stark ausgeprägte monocytäre (Fall I) und myelomonocytäre Komponente (Fall II) vor. Eine Bluteosinophilie wird wie in vergleichbaren anderen Fällen (Panoff, 1962; Hauswaldt *et al.*, 1967; Leder, 1970; Schaefer *et al.*, 1972, 1973) vermißt. Ausgeschwemmt werden lediglich blastenähnliche und monocytoide Zellen.

Abb. 4a u. b. Knochenmark, Fall I. (a) Übergangsform zwischen monocytoidem Blasten und Promonocyten. Typisch konfigurierter Kern mit zahlreichen Einbuchtungen und Invaginationen. Hinweis für Differenzierung zum promonocytären Stadium gibt vereinzelt Vorkommen kleiner, elektronendichter Granula. (b) atypischer Promonocyt mit Kernbrücke und -invagination. Vergr. 7500fach



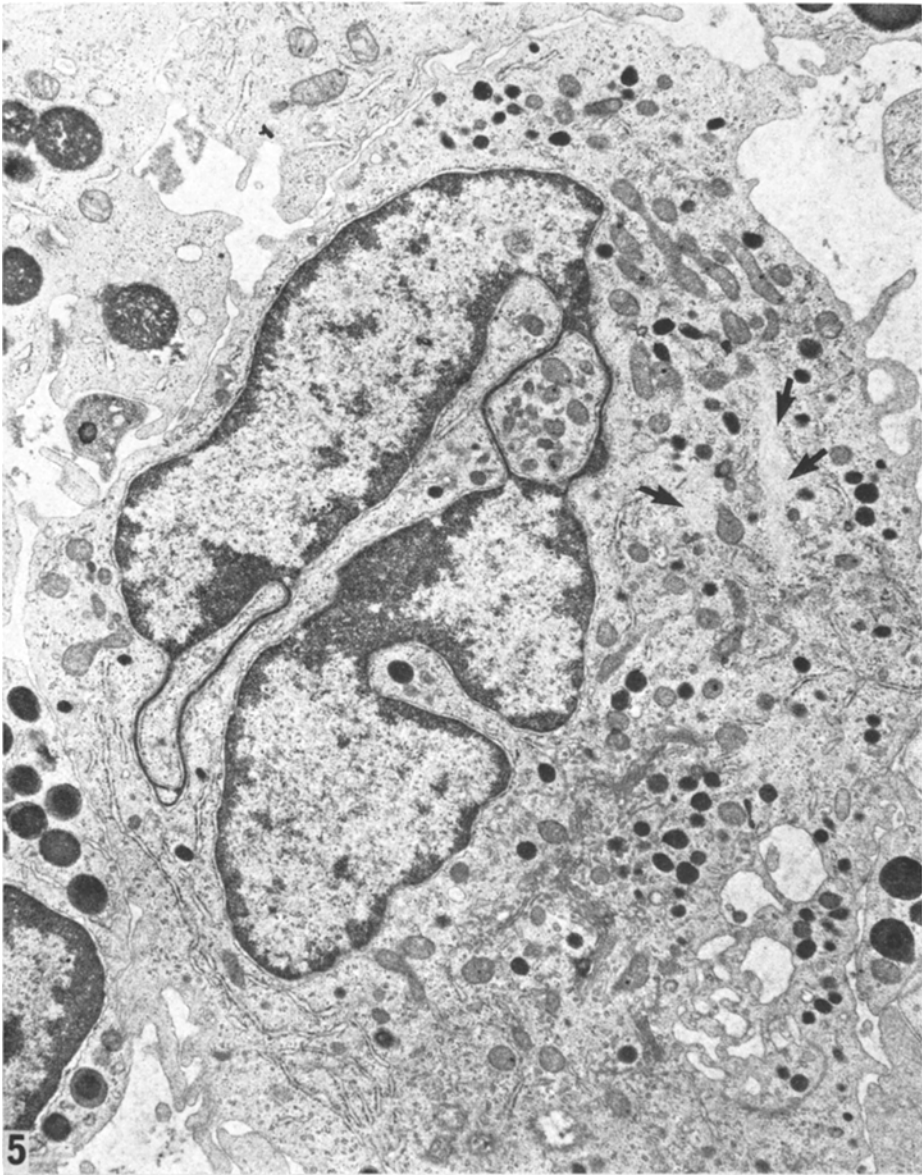


Abb. 5. Knochenmark, Fall I. Paramonocyt mit spezifischer Granulation. Beachte den bizarr gestalteten Kern und die Mikrofilamentenbündel (↑). Vergr. 7500fach

Fall I weist bei 58% der Eosinophilen die erstmals von Löffler beschriebene, für Eosinophile abnorme, positive Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-Reaktion auf, welche bisher bei 7 akuten Leukosen mit Eosinophilie des Knochenmarks beobachtet wurde (Löffler, 1969, 1972; Leder, 1970; Schaefer *et al.*, 1972, 1973). In Fall II ist diese cytochemische Atypie nur an 3% der Eosinophilen nachweisbar. Übereinstimmend ergibt die PAS-Reaktion an beiden Eosinophilenpopula-

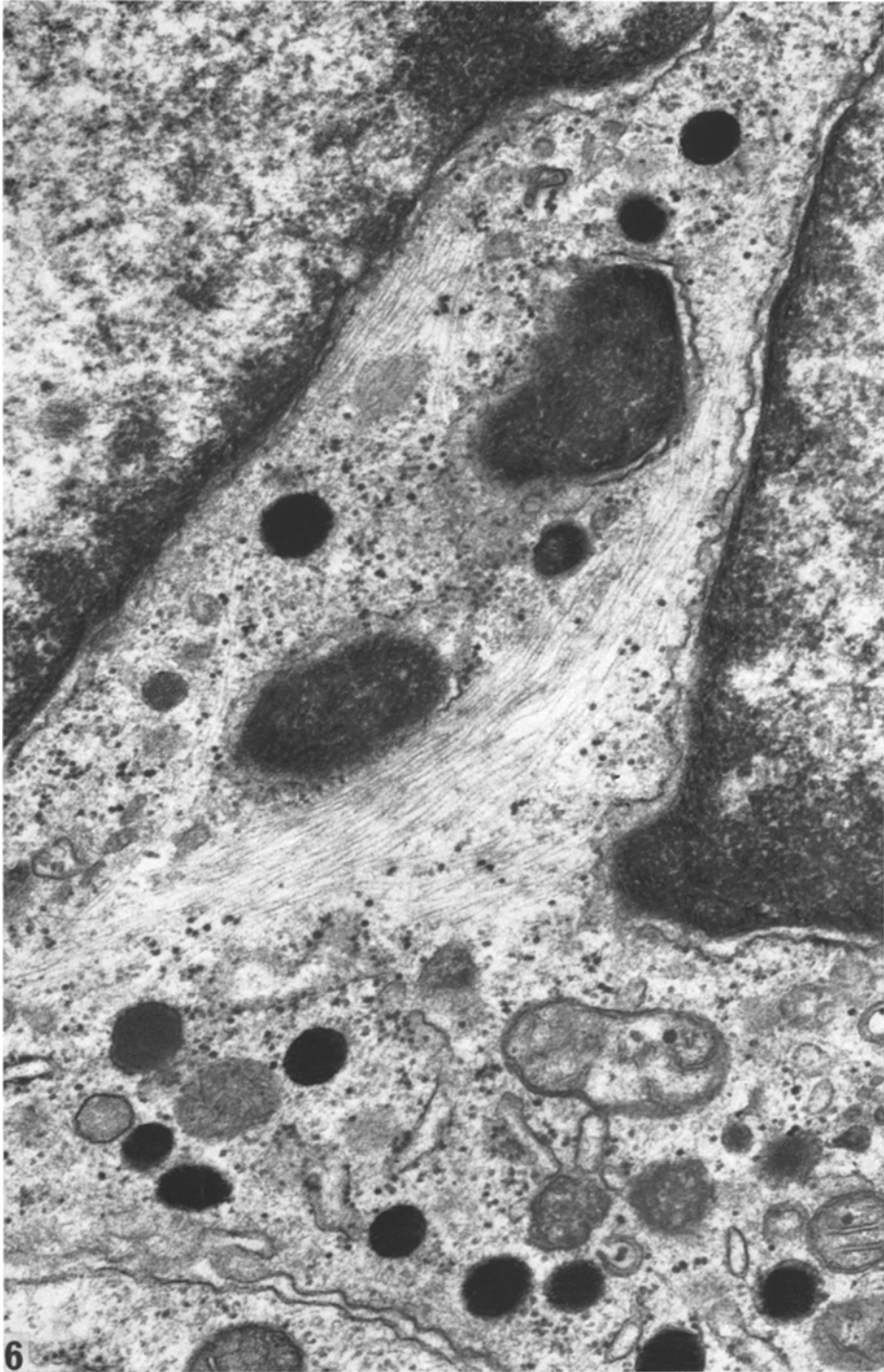


Abb. 6. Knochenmark, Fall I. Paramonocyt mit Mikrofilamenten in Kernnähe. Vergr. 40000fach

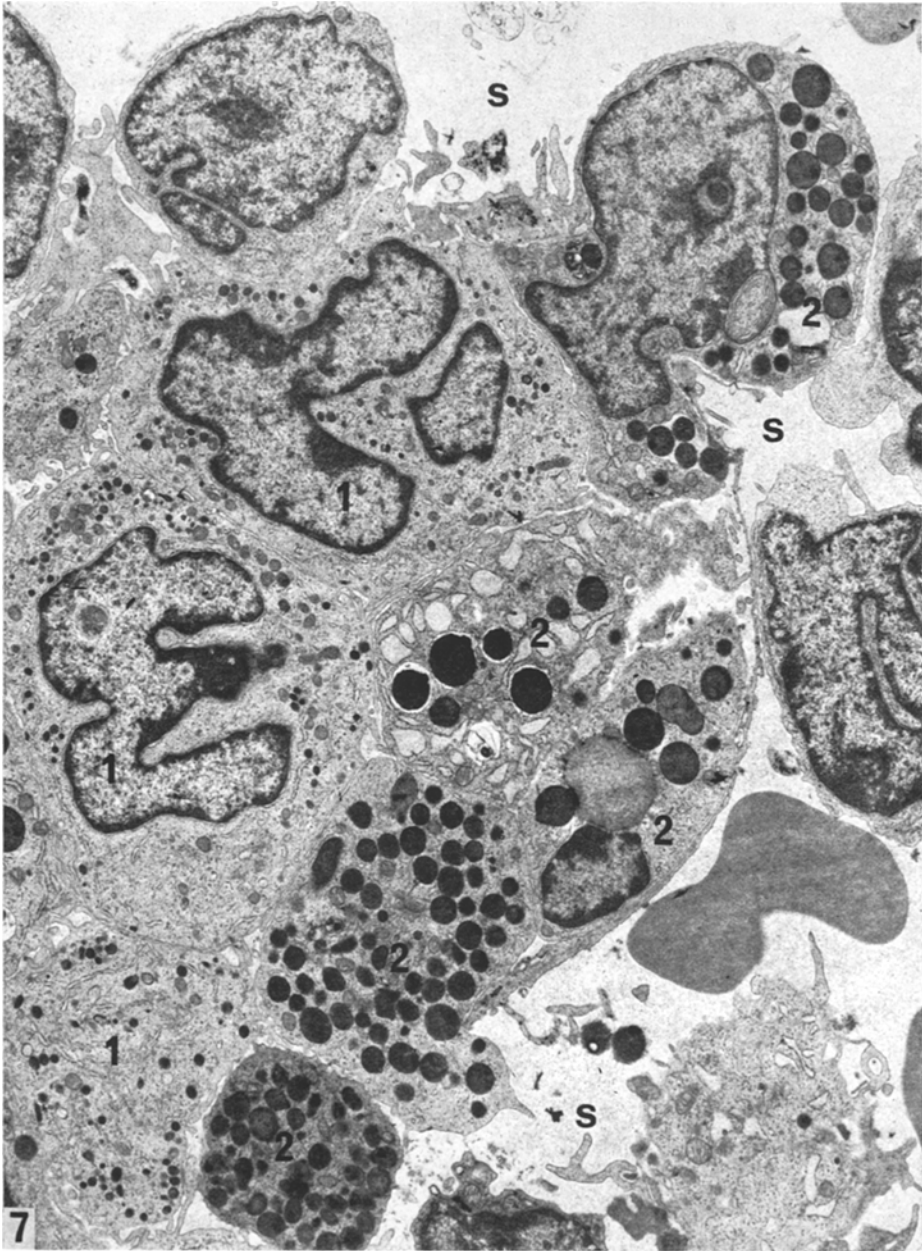
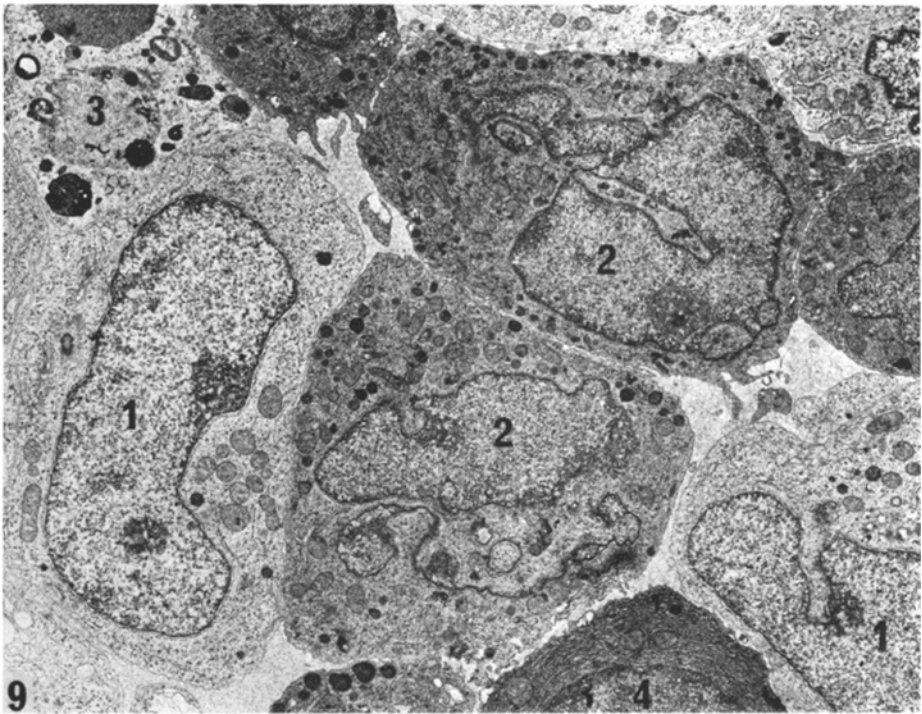
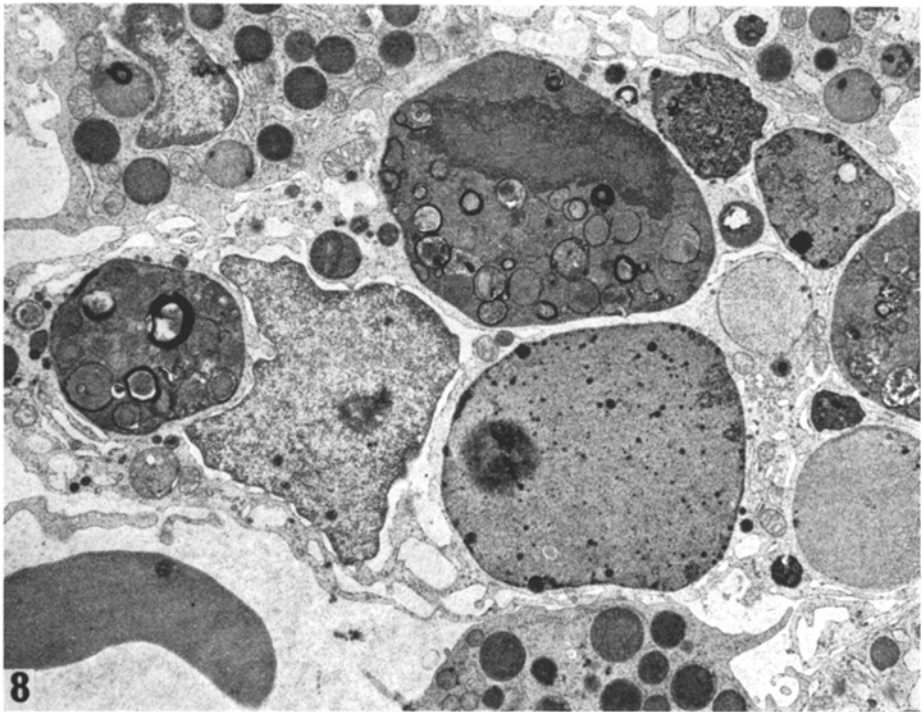
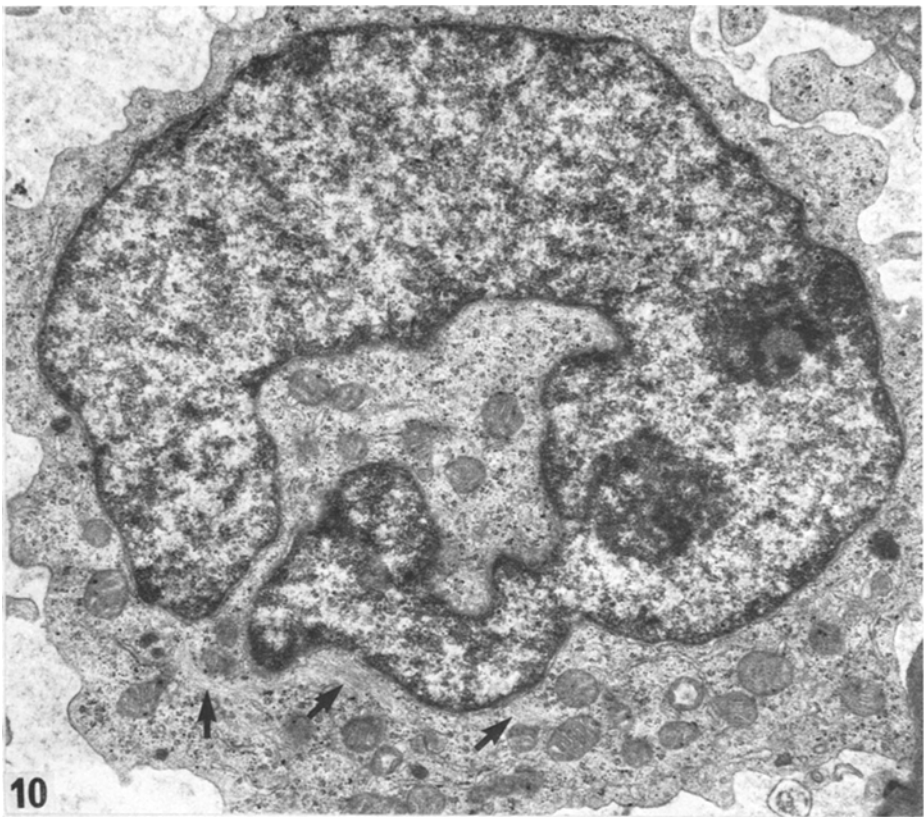


Abb. 7. Knochenmark, Fall I. Die Übersichtsaufnahme veranschaulicht die Zusammensetzung des Knochenmarks aus Zellen der eosinophilen und monocytären Reihe. 1 Paramonocyten, 2 Eosinophile unterschiedlicher Reife. In das Sinuslumen (S) dringt eine eosinophile Zelle vor, deren Kern eine typische, hantelförmige Verformung bei der Passage der Sinuswand erfährt. Vergr. 4900fach

Abb. 8. Knochenmark, Fall I. Makrophage mit phagocytisierten Eosinophilen unterschiedlich fortgeschrittenen Abbaus. Vergr. 6500fach

Abb. 9. Knochenmark, Fall I. Rezidiv. 1 monocytoide Blasten, 2 atypische Promonocyten mit mehrfach segmentierten und invaginierten Kernen, 3 Makrophage, 4 Plasmazelle. Vergr. 5100fach





tionen eine Positivität der Granula, wie in den von Ackerman (1964), Löffler (1969, 1972), Leder (1970), und Schaefer *et al.* (1972, 1973) mitgeteilten Fällen.

Schaefer *et al.* (1972) beschreiben als ultrastrukturelles Substrat dieses Reaktionsausfalls intragranuläres Glykogen. Elektronendichte Partikel, die in ihrer Struktur, Größe und Anordnung Glykogengranula gleichen, sehen wir nur in wenigen Granula mit hellem Hof. Quantitativ stimmen somit PAS-Reaktion und elektronenoptischer Glykogennachweis an den eosinophilen Granula nur wenig überein. Anders verhält es sich im Cytoplasma kleiner, reifzellig erscheinender Eosinophiler. Hier entspricht dem starken Ausfall der PAS-Reaktion ein ungewöhnlicher Reichtum an Glykogengranula.

In beiden Fällen bestehen ultrastrukturell ähnliche Atypien der Eosinophilen im Knochenmark. Ihre Granula reifen nicht aus. Es werden lediglich, zum Teil abnorm große, Primärgranula gebildet. Das für Sekundärgranula charakteristische kristalloide Internum fehlt. Nur in Fall I werden vielgestaltige Komplexe lamellären Aufbaus beobachtet, die unvollständig entwickelten Internumstrukturen entsprechen könnten. Ähnliche Strukturen in den Eosinophilen des Menschen wurden bisher nur wenig beachtet, wir meinen sie andeutungsweise in den Abbildungen von Miller *et al.* (1966) erkennen zu können. Mit ihrer meist zirkulären Anordnung erinnern sie an die Interna von Eosinophilen der Katze (Bargmann und Knoop, I, II 1956, 1958). Die übrigen Organellen des Cytoplasma — Endoplasmatisches Retikulum, freie Ribosomen und Mitochondrien — werden wie bei der Ausreifung normaler Granulocyten in zunehmendem Maße reduziert. Es besteht eine Dissoziation der Reifung, die vorwiegend Kern und Granula betrifft. Die von Ackerman (1964) als Merkmal leukämischer Eosinophiler angesehenen cytoplasmatischen Mikrofilamente werden in beiden Fällen bevorzugt im promyelocytären Stadium angetroffen.

Neben den Eosinophilen überwiegen schon im Ausstrichpräparat des Knochenmarks von Fall I monocytoide Zellen, die eine Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase-Reaktion in der zu erwartenden Stärke vermissen lassen. Diese Zellen besitzen jedoch feinstrukturelle Merkmale, wie sie für die Monocytenreihe und ihre leukämischen monocytoiden Varianten beschrieben wurden (Fedorko und Hirsch, 1970; Freeman und Journey, 1971; Horn und Scott, 1971; Nichols *et al.*, 1971; Schumacher *et al.*, 1973; Glick und Horn, 1974). Es handelt sich um große Zellen mit breitem Cytoplasma, charakteristisch eingebuchteten, teilweise bizarr segmentierten und invaginierten Kernen, welche im Cytoplasma Bündel von Mikrofilamenten, kurze Profile des rauen endoplasmatischen Retikulum und in reifen Formen kleine, elektronendichte und membrangebundene Granula enthalten. Die granulierten Zellen zeigen je nach Prominenz des Nukleolus bzw. dem Ausmaß der Chromatinkondensation des Kerns Ähnlichkeiten mit Promonocyten oder Monocyten. Der überwiegende Teil der im Pappenheimpräparat sowie cytochemisch nicht eindeutig zu differenzierenden blastenähnlichen Zellen läßt sich ultrastrukturell der monocytären Reihe zuordnen. Neben diesen monocytoiden

Abb. 10. Knochenmark, Fall II. Monocytoider Blast mit tiefer Kerneinbuchtung und in Kernnähe gelegenen Mikrofilamentbündeln (↑). Vergr. 10600fach

Abb. 11. Knochenmark, Fall II. Übersegmentierte eosinophile Zelle mit Primärgranulation und Aggregaten von Glykogenpartikeln. Vergr. 8500fach

Blasten sind undifferenzierte Elemente mit rundem Kern und schmalem Cytoplasma seltener zu beobachten. Daß es sich bei ihnen um Myeloblasten handelt, wird durch Übergangsformen zu eosinophilen Promyelocyten belegt. Somit findet sich im Knochenmark von Fall I neben der eosinophilen eine monocytoide Population.

In Fall II besteht nach dem cytochemischen Befund — 75% der Blasten sind peroxydasepositiv — und dem Nachweis von Auer-Stäbchen kein Zweifel über die Beteiligung unreifer neutrophiler Zellen an dieser Leukämie. Im Ausstrichpräparat und auch cytochemisch tritt die monocytäre Komponente nicht deutlich in Erscheinung. Ihre Identifikation wird wie in Fall I erst ultrastrukturell möglich. Damit dürften die Kriterien einer myelomonocytären Leukämie gegeben sein.

In den bisher mitgeteilten und unseren Fällen vergleichbaren akuten Leukosen mit N-AS-D-Cl-positiver Knochenmarkeosinophilie (Löffler, 1969, 1972; Leder, 1970; Schaefer *et al.*, 1972, 1973) wurden neben den atypischen Eosinophilen weitere leukämische Populationen beschrieben. Sie wurden aufgrund cytologischer und cytochemischer Kriterien als monocytär (ein Fall von Löffler, 1972) oder als myelomonocytär (Leder, 1972) bezeichnet. Aus den Befunden von Schaefer *et al.* (1972, 1973) ergeben sich in einem Fall Hinweise auf eine myelomonocytäre — (Vorkommen von Auerstäbchen und monocytoiden Blasten) und in dem anderen Fall auf eine monocytoide Population (26% der peripheren Blasten zeigen eine starke Reaktion der unspezifischen Esterase).

Bei schwachem oder negativem Ausfall der unspezifischen Esterase-Reaktion kann, wie unsere Fälle zeigen, die Feinstruktur die Zugehörigkeit einer leukämischen Population zur monocytären Reihe sichtbar machen. Besonderer Beachtung bedürfen Monocytenleukämien mit nur schwacher Alpha-Naphthyl-Acetat-Esterase-Reaktion (Heckner, 1969). Es bleibt zu untersuchen, ob es sich um einen Esteraseverlust handelt, der dem Verlust der Peroxydase bei myeloischen Leukämien vergleichbar wäre.

Das rein zahlenmäßige Überwiegen einer leukämischen Eosinophilenpopulation im Knochenmark neben monocytären bzw. myelomonocytären Komponenten rechtfertigt unseres Erachtens nicht die Bezeichnung „Eosinophilenleukämie“, zumal auch die monocytoide Population im Verlauf einer solchen Erkrankung quantitativ überwiegen kann (s. Rezidiv Fall I). In dieser Hinsicht scheint uns bedeutsam, daß in myelomonocytären Leukämien nicht selten Eosinophile mit unvollständig ausgereiften Granula vorkommen (Cawley und Hayhoe, 1974). Die beiden beschriebenen akuten Hämoblastosen lassen sich am genauesten mit den Begriffen eosinophil-monocytäre (Fall I) und eosinophil-myelomonocytäre Leukämie (Fall II) charakterisieren. Die letzte Bezeichnung könnte auch als übergeordneter Terminus für beide Krankheitsbilder gewählt werden.

Literatur

- Ackerman, G. A.: Eosinophilic leukemia. A morphologic and histochemical study. *Blood* **24**, 372—388 (1964)
- Bargmann, W., Knoop, A.: Über das elektronenmikroskopische Bild des eosinophilen Granulocyten. I. *Z. Zellforsch.* **44**, 282—291 (1956)
- Bargmann, W., Knoop, A.: Über das elektronenmikroskopische Bild des eosinophilen Granulocyten II. *Z. Zellforsch.* **44**, 692—696 (1956)

- Bargmann, W., Knoop, A.: Über das Granulum des Eosinophilen. *Z. Zellforsch.* **48**, 130—136 (1958)
- Bentley, H. P., Reardon, A. E., Knoedler, J. P., Krivit, W.: Eosinophilic leukemia, report of a case, with review and classification. *Amer. J. Med.* **30**, 310—322 (1961)
- Boussier, J.: Eosinophilie et leucémie. *Sang* **28**, 553—580 (1957)
- Carmel, W. J., Minno, A. M., Cook, W. L.: Eosinophilic leukemia with report of a case. *Arch. intern. Med.* **87**, 280—286 (1951)
- Cawley, J. C., Hayhoe, F. G. J.: Ultrastructure of haemic cells, a cytological atlas of normal and leukemic blood and bone marrow. London-Philadelphia-Toronto: Saunders 1973
- Chen, H. P., Smith, H. S.: Eosinophilic leukemia. *Ann. intern. Med.* **52**, 1343—1352 (1960)
- Dittrich, H.: Zur Frage der eosinophilen Leukämie. (Zugleich ein Beitrag zur Pathogenese der Leukosen.) *Acta haemat. (Basel)* **7**, 230—256 (1952)
- Engfeldt, B., Zetterström, R.: Disseminated eosinophilic "collagen disease". *Acta med. scand.* **153**, 337—353 (1956)
- Evans, T. S., Nesbit, R. R.: Eosinophilic leukemia. *Blood* **4**, 603—613 (1949)
- Fadell, E. J., Crone, R. I., Leonard, M. E., Altamirano, M. D.: Eosinophilic leukemia. *Arch. intern. Med.* **99**, 819—823 (1957)
- Fedorko, M. E., Hirsch, J. G.: Structure of monocytes and macrophages. *Semin. Hemat.* **7**, 109—124 (1970)
- Freeman, A. I., Journey, L. J.: Ultrastructural studies on monocytic leukaemia. *Brit. J. Haemat.* **20**, 225—231 (1971)
- Friedman, M., Wolman, I. J., Tyner, H. H.: Eosinophil leukemia with report of a case. *Amer. J. med. Sci.* **208**, 333—343 (1944)
- Glick, A. D., Horn, R. G.: Identification of promonocytes and monocytoïd precursors in acute leukemia of adults: ultrastructural and cytochemical observations. *Brit. J. Haemat.* **26**, 395—403 (1974)
- Gray, J. D., McGill, M. D., Shaw, S.: Eosinophil leukemia and familial eosinophilia: two illustrative cases. *Lancet* **257**, 1131—1134 (1949)
- Gross, R., Hellweg, G., Lambers, K.: Zur Frage der eosinophilen Leukämie. *Z. Kinderheilk.* **77**, 208—226 (1955)
- Hauswaldt, Ch., Raju, S., Bianchi, L., Hunstein, W.: Kasuistischer Beitrag zum Krankheitsbild der akuten Eosinophilen Leukämie. *Acta haemat. (Basel)* **37**, 143—149 (1967)
- Heckner, F.: Cytochemie und Therapie bei Monocytenleukose. In: Stacher, A. (Hrsg.), Chemo- und Immunotherapie der Leukosen und malignen Lymphome, S. 168—169. Wien: Bohmann 1969
- Horn, R. G., Scott, R. E.: Ultrastructural features of monocytes and monocytoïd precursors in normal and leukemic bone marrow (Abstract). *Amer. J. Path.* **62**, 71a (1971)
- Hule, V.: Die akuten basophilen und eosinophilen Leukosen. *Sang* **21**, 423—436 (1950)
- Hyman, H. L., Jarrold, T.: Eosinophilic leukemia: report of a case with autopsy. *Ann. intern. Med.* **36**, 1541—1547 (1952)
- Ito, S., Winchester, R. J.: The fine structure of the gastric mucosa in the bat. *J. Cell Biol.* **16**, 541—578 (1963)
- Lakos, A., Szabo, M., Monus, Z., Toszegi, A.: Der Fall von eosinophiler Leukose. *Folia haemat., N.F.* **7**, 141—147 (1963)
- Leder, L. D.: Der Blutmonocyt. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1967
- Leder, L. D.: Akute myelo-monocytäre Leukämie mit atypischen Naphthol-AS-D-Chloracetat-Esterase-positiven Eosinophilen. *Acta haemat. (Basel)* **44**, 52—62 (1970)
- Löffler, H.: Cytochemische Klassifizierung der akuten Leukosen. In: Stacher, A. (Hrsg.), Chemo- und Immunotherapie der Leukosen und malignen Lymphome, S. 120—127. Wien: Bohmann 1969
- Löffler, H.: Cytochemie bei Leukosen. In: R. Gross u. J. van de Loo (editores), Leukämie, S. 119—126. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1972
- Mallarmé, J., Varay, A., Orcel, L., Roland, J., Berthelot, J., Blondon, J.: Leucémie à éosinophiles. A propos d'une étude clinique hématologique et anatomique. *Presse méd.* **72**, 1199—1204 (1964)
- Miller, F., Harven, E. de, Palade, G. E.: The structure of eosinophil leucocyte granules in rodents and in man. *J. Cell Biol.* **31**, 349—362 (1966)

- Nichols, B. A., Bainton, D. F., Farquhar, M. G.: Differentiation of monocytes: origin, nature and fate of their azurophil granules. *J. Cell Biol.* **50**, 498—515 (1971)
- Odeberg, B.: Eosinophilic leukemia and disseminated eosinophilic collagen disease—a disease entity? *Acta med. scand.* **177**, 129—144 (1965)
- Panoff, A.: Über die eosinophile Leukose. *Arch. Kinderheilk.* **166**, 177—185 (1962)
- Papageorgiou, A.: Zur Differentialdiagnose der eosinophilen Leukämie. *Blut* **8**, 338—347 (1962)
- Pierce, L. E., Hosseinian, A. H., Constantine, A. B.: Disseminated eosinophilic collagen disease. *Blood* **29**, 540—549 (1967)
- Piney, A.: La leucémie a éosinophiles existe-t-elle? *Rev. Hémat.* **4**, 3—5 (1949)
- Reynolds, E. S.: The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **17**, 208—212 (1963)
- Schaefer, H. E., Fischer, R.: Eine spezifische Färbung eosinophiler Granulocyten mit Biebricher Scharlach. *Klin. Wschr.* **46**, 396—397 (1968)
- Schaefer, H. E., Hellriegel, K. P., Hennekeuser, H. H., Hübner, G., Zach, J., Fischer, R., Gross, R.: Unreife myeloische Leukose mit Chloroacetatesterase-positiver Eosinophilie („Eosinophilenleukämie“). In: G. Gross u. J. van de Loo (editores), *Leukämie*, S. 155—160. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1972
- Schaefer, H. E., Hellriegel, K. P., Hennekeuser, H. H., Hübner, G., Zach, J., Fischer, R., Gross, R.: Eosinophilenleukämie, eine unreife Myelose mit Chloroacetatesterase-positiver Eosinophilie. *Blut* **26**, 7—19 (1973)
- Schumacher, H. R., Szekely, I. E., Park, S. A.: Monoblast of acute monoblastic leukemia. *Cancer (Philad.)* **31**, 209—220 (1973)
- Scott, R. E., Horn, R. G.: Fine structural features of eosinophil granulocyte development in human bone marrow. *J. Ultrastruct. Res.* **33**, 16—28 (1970)
- Ullmann, W., Heine, W.-D.: Chronische NASDCI-negative Eosinophilen-Leukämie mit Herzinfarkten. *Virchows Arch. Abt. A Path. Anat.* **358**, 265—271 (1973)

Dr. Uwe Wulfhekel
Abteilung für Mikroskopische Anatomie
Universität Hamburg
D-2000 Hamburg 20
Martinistraße 52
Bundesrepublik Deutschland